



UNIVERSIDAD  
DE GUANAJUATO

Campus Guanajuato  
División de Ingenierías



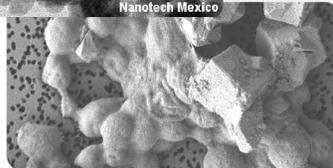
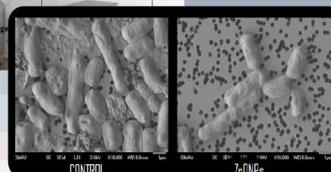
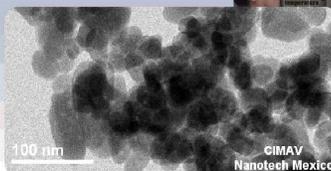
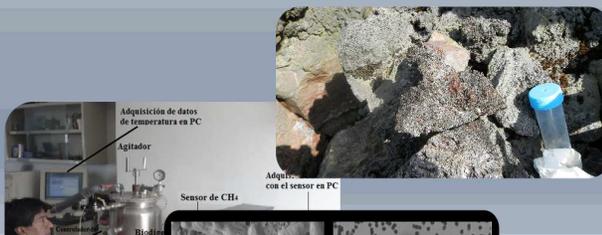
# 3er. Simposio Internacional de Tecnología y Biotecnología aplicada a la resolución de problemas ambientales

31 de Agosto a 2 de Septiembre de 2015

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



- Metodologías Innovadoras aplicadas a Bioprocesos
- Tratamiento de Residuos
- Tecnologías Aerobias y Anarobias
- Energía
- Bioprocesos
- Biorremediación
- Biotecnología
- Nanotecnología
- 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>





# “TECNOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA APLICADA A LA RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS AMBIENTALES”

ISBN: 978-607-441-446-2



D.R. © 2016 Universidad de Guanajuato

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

Guanajuato, Guanajuato. México  
31 de Agosto a 2 de Septiembre de 2015



**“TECNOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA APLICADA A LA  
RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS AMBIENTALES”**

Primera edición 2016

D.R. © 2016 Universidad de Guanajuato  
Lascuráin de Retana 5, Zona Centro.  
Guanajuato, Gto. CP. 3600

Edición: Grupo de Investigación “Bioingeniería, Biotecnología y Gestión Ambiental”  
Julio César Valerdi Negreros  
Arodi Bernal Martínez  
Gemma Cervantes  
Germán Cuevas Rodríguez  
Sergio Antonio Silva Muñoz  
Elcia Margareth Souza Brito

ISBN: 978-607-441-446-2





**UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO**

y

**Cuerpo académico**

**“Bioingeniería, Biotecnología y Gestión Ambiental”**

31 de Agosto al 2 de Septiembre de 2015



**COMITÉ ORGANIZADOR**

Dra. Arodi Bernal Martínez  
Dr. Germán Cuevas Rodríguez  
Dr. Sergio Antonio Silva Muñoz  
Dra. Gemma Cervantes  
Dra. Elcia Margareth Souza Brito



## Índice

- 1** | CAPÍTULO 1  
PREFACIO
- 3** | CAPÍTULO 2  
LA BIOINFORMÁTICA Y SUS APLICACIONES EN LA ECOLOGÍA MICROBIANA  
Bertin, P.
- 9** | CAPÍTULO 3  
EFFECT OF CuONPs OVER BACTERIAL COMMUNITIES OF AGRICULTURAL SOIL  
Concha-Guerrero, Sandra-I.; Souza-Brito, Elcia-Margareth; Gassie, C.; Bertin, P.; Caretta, César-A.; Durán, Robert; Orrantia-Borunda, Erasmo
- 19** | CAPÍTULO 4  
MODELAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN BIODIGESTOR ANAEROBIO PARA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS A PARTIR DE RESIDUOS DE CABRA Y DE CONEJO  
M.-García, Martín-T.; G.-García, Jessica-J.; M.-Ramírez, Jose-L.
- 27** | CAPÍTULO 5  
DEGRADACIÓN DE LIGNINA MEDIANTE EL PROCESO FENTON  
Olivo-Toledo, Jenifer; Martínez-Herrera, Gabriel
- 33** | CAPÍTULO 6  
PHYSIOLOGIC CHARACTERIZATION OF ANAEROBIC STRAINS ISOLATED FROM EXTREME SITES  
Pérez-Bernal, María-Fernanda; Souza-Brito, Elcia-Margareth; Cuevas-Rodríguez, Germán; Hirschler-Réa, Agnès; Guyoneaud, Rémy
- 41** | CAPÍTULO 7  
AISLMIENTO DE BACTERIAS ANAÉROBICAS DE FUMAROLAS DEL VOLCÁN PARICUTÍN  
Romero Nuñez, Victor-Manuel; Souza-Brito, Elcia-Margareth; Caretta, César-Augusto

- 47** | CAPÍTULO 8  
ESTUDIO FILOGENÉTICO DE CEPAS AISLADAS DEL LAGO-CRÁTER  
"RINCÓN DE PARANGUEO"  
Rivera-Martínez, Laura-Guadalupe; Bertin, Pierre; Caretta, César-Augusto;  
Guyoneaud, Rémy; Goni, Marisol; Malm, Olaf; Valerdi-Negreros, Julio-  
César; Souza-Brito, Elcia-Margareth
- 55** | CAPÍTULO 9  
ESTUDIO DE BACTERIAS MAGNETOTÁCTICAS EN LAGOS-CRÁTER:  
CÍNTORA Y LA JOYA  
Zatarain-P., Eva-Cecilia; Pérez-Vázquez, Miriam-Evelia; Valerdi-Negreros,  
Julio-César; Brito-S., Elcia-Margareth
- 63** | CAPÍTULO 10  
STUDY OF MAGNETOTACTIC BACTERIA IN ALKALINE ENVIRO-  
MENTS OF VOLCANIC CRATER LAKES FROM *LAS SIETE LUMI-  
NARIAS*  
Pérez-Vázquez, Miriam-Evelia; Zatarain-P., Eva-Cecilia; Valerdi-Negreros,  
Julio-César; Souza-Brito, Elcia-Margareth
- 69** | CAPÍTULO 11  
TOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC EN AISLA-  
DOS DE SUELOS AGRÍCOLAS  
Rico-Herrera, Mauricio-I.; Concha-Guerrero, Sandra-I.; Orrantia, E.; Luna-  
Velazco, Antonia; Souza-Brito, Elcia-Margareth
- 77** | CAPÍTULO 12  
TOXICIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC (ZnO)  
EN LEVADURAS PRESENTES EN UNA PLANTA DE TRATAMIENTO  
DE AGUAS RESIDUALES  
González-Paniagua, Yutzil; Cervantes-Avilés, Pabel-A.; Concha-Guerrero,  
Sandra-I.; Luna-Velazco, Antonia, Souza-Brito, Elcia-Margareth
- 87** | CAPÍTULO 13  
CONCRETO HIDRÁULICO CON PET DE BOTELLAS  
Chávez-Valencia, L.-E.; Ruiz-Jaime, C.-L.; Sánchez-Cadena, L.-E.

- 91** | CAPÍTULO 14  
PAPERCRATE  
Chávez-Valencia, L.-E.; Saucedo-Estrada, C.-A.; Mendoza-Puga, L.-E.
- 95** | CAPÍTULO 15  
MICROORGANISMOS NATIVOS EN UN PROCESO DE BIOLIXIVIACIÓN  
PARA RECUPERACIÓN DE PLATA A PARTIR DE RELAVES MINEROS  
CON ALTO CONTENIDO DE MANGANESO  
Huerta-Rosas, Brenda; Cano-Rodríguez, I.; Gamiño-Arroyo, Z.; Gómez-  
Castro, F.-I.; Carrillo-Pedroza, F.-R.; Romo-Rodríguez, P.; Gutiérrez-  
Corona, F.; Santiago-Sernas, P.-I.
- 103** | CAPÍTULO 16  
PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE SECRETABLE  
GOX ENZYME FROM Ed8 STRAIN OF *A. TUBINGENSIS*  
Flores-Amaro, Oscar-Abraham; Romo-Rodríguez, Pamela; Corrales-  
Escobosa, Alma-Rosa; Wrobel, Kazimierz; Wrobe, Katarzyna; Villagómez-  
Castro, Julio-Cesar; Gutiérrez-Corona, Félix



## 1. PREFACIO

Es un honor para la Universidad de Guanajuato y el grupo de investigación de Bioingeniería, Biotecnología y Gestión Ambiental del Departamento de Ingeniería Civil de la División de Ingenierías, Campus Guanajuato, el poder realizar esta Edición de las memorias del Tercer Simposio Internacional de Bioingeniería Ambiental, cuyo objetivo fue el intercambio de conocimiento entre expertos, investigadores y estudiantes, en el área de la Ingeniería Ambiental, hacia la búsqueda de nuevas tecnologías para lograr un ambiente sustentable.

En el SIBA 2015 se presentaron: tres conferencias magistrales, la primera a cargo del M. en C. Pierre Bertin (Universit Paris Sud XI, Francia, Capítulo 2), la segunda a cargo del M. en C. Victor Hugo Cely Niño (Universidad Nacional de Colombia) y la tercera a cargo de la Dra. Sandra I. Concha Guerrero (CIMAV-Chihuahua, Capítulo 3). 2 conferencias invitadas y 24 conferencias en presentaciones de trabajos libres (orales). Además, se inscribió un total de 129 personas incluyendo estudiantes, profesores e investigadores de distintas universidades. Durante este evento fueron abordados temas actuales de importancia en la bioingeniería, tales como: manejo y disposición de residuos, tratamiento y gestión del agua, nanotecnología, contaminación del aire, aprovechamiento y protección de acuíferos.

Este documento, es una compilación de los trabajos presentados durante el tercer SIBA, que cada uno de los autores ha autorizado para su publicación. De antemano, se le agradece a cada uno, la disposición para la integración de éstas memorias.

ATENTAMENTE

COMITÉ ORGANIZADOR  
SIBA 2015



## 2. LA BIOINFORMÁTICA Y SUS APLICACIONES EN LA ECOLOGÍA MICROBIANA

*Bertin, Pierre*<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup>Université Paris Sud XI, Orsay  
e-mail: ✉[bertinp71@gmail.com](mailto:bertinp71@gmail.com)

### RESUMEN

La bioinformática ha tomado un lugar primordial en el análisis de datos en diversas áreas de la biología. La generación de datos ha aumentado en los últimos años y la gran cantidad de información necesita ser analizada, ordenada y almacenada. Estos datos provienen de varios lugares como pueden ser: imágenes de microscopía, conteo de células, secuencias de ADN a partir de los secuenciadores, resultados de simulaciones computacionales por ejemplo a partir de las interacciones entre proteínas etc. En cada una de estas aplicaciones, la bioinformática propone soluciones para dar sentido a esos datos. En esta revisión se describirá una aplicación directa de la bioinformática en la ecología microbiana que se denomina Next Generation Sequencing (NGS).

**Palabras clave:** *Bioinformática, pipeline, NGS, filogenia*

### INTRODUCCIÓN

La bioinformática es una ciencia joven introducida en los años 1970 [1]. Es una combinación entre las matemáticas, las informática y la biología, tiene un amplio rango de aplicaciones. La generación de datos en biología aumentó significativamente en los últimos años, debido a los avances tecnológicos (por ejemplo, microscopios electrónicos, secuenciadores, técnicas avanzadas de biología molecular) y con el desarrollo de la bioinformática se ha hecho frente al procesamiento y análisis de la enorme cantidad de datos [2]. Adquirir, filtrar, procesar, organizar y almacenar datos son los objetivos completados gracias a programas, scripts y análisis estadísticos. La ecología microbiana, quien lleva a cabo análisis sobre las comunidades microbianas dentro diferentes ecosistemas, conoció un cambio radical desde 2007 con la llegada de los secuenciadores nueva generación:

NGS [3,4]. Sin embargo, con un acceso a mas secuencias, nuevas soluciones tienen que estar desarrolladas para llevar a cabo una análisis adecuado de esos datos.

Para determinar la identidad y abundancia de microorganismos en una muestra definida, existen dos enfoques por medio de la secuenciación: «amplicon sequencing» y «whole-genome shotgun sequencing». Amplicon secuenciación se basa en la amplificación por PCR y secuenciación de una región del genoma, por ejemplo de la secuencia del gen ARNr 16S, usado como marcador [5]. Mientras que por otra parte el «Whole-genome shotgun sequencing» se refiere a realizar cortes al azar del ADN extraído y luego se lleva a cabo la secuenciación de los pequeños fragmentos de ADN. Ambos enfoques ofrecen distintas ventajas y desventajas y la selección de un enfoque adecuado depende del tipo de información requerida. El en-

foque presentado en este resumen es el «amplicon sequencing», el cual es usado para producir una información sobre la composición taxonómica y la estructura de las comunidades en Operational Taxonomic Units (OTU) de la muestra.

La caracterización de uno solo marcador genético (como el gen ARNr 16S), es muy usado para acceder a la diversidad de las poblaciones microbianas por el medio de estudios filogenéticos y taxonómicos. Este gen ARNr 16S existe en todas las bacterias y está compuesto de regiones variables espaciadas las cuales están flanqueadas por regiones muy conservadas [6]. Las sondas usadas para amplificar este gen con PCR (Polymerase Chain Reaction) se hibridizan en las regiones conservadas (como ancla común a todas las bacterias) para luego amplificar las regiones variables las cuales serán agregadas en clusters dentro de un OTU dependiendo del porcentaje de similitud entre ellas. Estas regiones variables contienen la información de diversidad.

¿Cuáles son las herramientas para acceder a este tipo de secuencias?

La secuenciación es una técnica que permite leer cada una de las bases del ADN. Antes 2007, Sanger sequencing [7] y Pyrosequencing [8] eran las técnicas de secuenciación más usadas en biología. El Pyrosequencing fue mejorada realizando varias amplificaciones en paralelo llegando a producir 1 millón de secuencias en 24 horas, en comparación al Sanger sequencing la cual permite analizar secuencias de 400 a 900 pares de bases en algunas horas. Desde 2007, los NGS permiten generar 6 mil millones de secuencias en 24 horas, dando una información considerable sobre la mues-

tra. Desde entonces, la ecología microbiana usa la secuenciación para generar la mayor cantidad de datos posibles sobre las comunidades microbianas de los ecosistemas. Entonces, mil millones de secuencias (llamada «reads») representan una información de diversidad, estructura de comunidades y abundancia pero esta información se encuentra encriptada en archivos de computadora la cual necesita ser analizada para revelarse. Sin embargo, aunque estas nuevas técnicas dan acceso a una información mucho más grande, una gran desventaja es que poseen sesgos [9]. Entre estos sesgos es que cuando se encuentran bases de baja calidad en los reads como resultado del proceso de secuenciación, la probabilidad que la base secuenciada sea errónea es grande. También, los reads pueden ser quimeras, que son secuencias las cuales se compone de dos secuencias del juego de datos y que entonces, no tiene relevancia biológica, es decir, que no son secuencias de la muestra biológica, pero fueron creadas por “errores de síntesis” del método de secuenciación.

Es por ello que varios programas [10-12] (o pipelines) como USEARCH o QIIME fueron desarrollados por la bioinformática para la ecología microbiana. Estos pipelines funcionan con una implementación diferente (diferentes lenguajes de programación) pero llevan a cabo las mismas etapas para analizar estos datos:

- 1) El control de calidad: En primer lugar, se debe estudiar la calidad de los reads. El formato de archivo «fastQ» contiene por cada base secuenciada un score de calidad asociado (de 1 a 34). Entre más grande es la calidad, más pequeña es la probabilidad que este base sea mal leída durante la secuenciación.

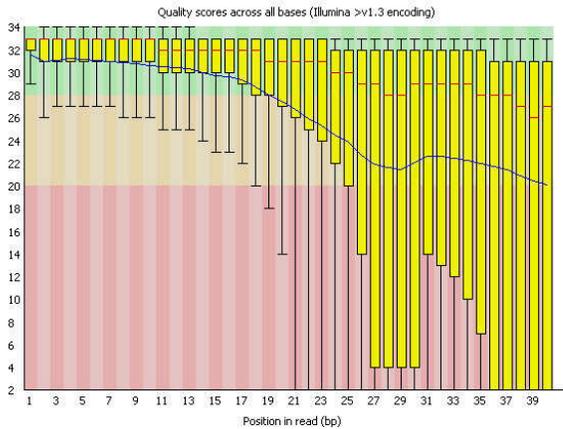


Figura 2.1: FastQC [13] per base analysis.

En la Figura 2.1, se muestra estadísticas (box-plot) sobre la calidad de las bases a cada posición de los reads. Las cajas amarillas representan los inter-cuartiles (25 - 75%), la línea roja es el valor de la mediana, la azul el promedio y las barras negras representan el 10% and 90%.

2) Etiquetado: Generalmente, se analizan varias muestras a la vez para comparar las estructuras de las comunidades microbianas entre diferentes sitios o cultivos in vitro de bacteria bajo diferentes condiciones. Para llevar a cabo las próximas etapas de los pipelines, los reads deben ser juntados en un solo juego de datos. Para no perder la información de «cual es el origen de cada secuencia», cada secuencia de cada muestra se ve etiquetada con el nombre de la muestra.

3) «Clustering»: Consiste en formar grupos de secuencias que tienen entre ellas una similitud superior a un valor establecido por el investigador. Las secuencias agrupadas tienen debido a sus similitudes, un supuesto origen común en la afiliación taxonómica. En ecología microbiana, los grupos formados después los pasos del clustering se llaman «OTU»

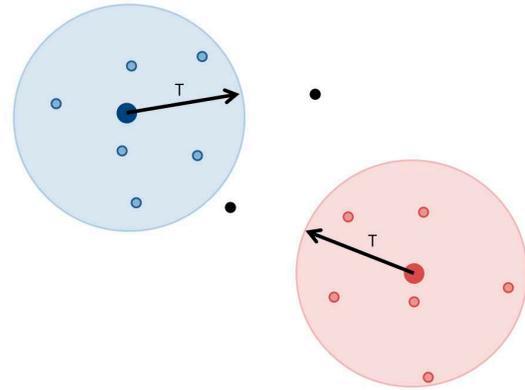


Figura 2.2: Clustering idea.

por *Operational Taxonomic Unit*. Cada OTU está organizado alrededor de una secuencia «consensus» que es la secuencia central.

El clustering puede ser visualizado como un círculo. El valor establecido de similitud se puede traducir como el radio del círculo. Cada secuencia que tiene una similitud con la secuencia central (el centro del círculo) superior al valor establecido será agrupada a este cluster (Figura 2.2).

4) Taxonomía: Para identificar los OTUs generados en el paso anterior, la secuencia «consensus» de cada OTU será comparada con las secuencias del gen del ARN16S conocidas en los bases de datos. Algunos bases de datos que contienen una colección amplia y filtrada de secuencias son SILVA [14], RDP [15] y NCBI [16]. Con el alineamiento de secuencia, cada secuencia «consensus» de un OTU se deberá atribuir a una taxonomía. En algunos casos, ninguna secuencia de referencia será encontrada, lo cual puede ser debido a: i) un error de secuenciación, ii) los parámetros establecidos por la búsqueda en los bases de datos y iii) al descubrimiento de una nueva especie o nueva secuencia del gen la cual

pertenece a un organismo no caracterizado.

5) Visualización de los resultados: El objetivo de los pipelines es dar al final del tratamiento de los datos la abundancia de cada OTU en cada muestra. Estos resultados sirven como comparación entre dos muestras y permiten distinguir cuales cambios ocurren en las comunidades bacterianas. De acuerdo a la pregunta original, estos cambios pueden ser relevantes para comprender y tratar de resolver algunos problemas ambientales.

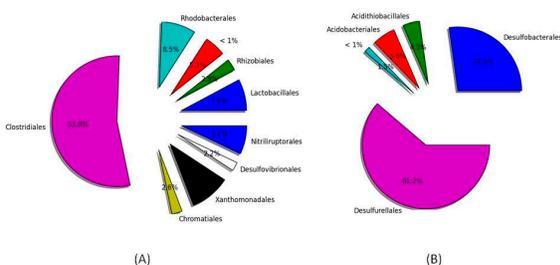


Figura 2.3: Composición de dos muestras de suelo.

La Figura 2.3 muestra graficas conteniendo la repartición de los órdenes de la clasificación filogenética en dos muestras de suelo (fuente: Elcia M. Souza Brito). Al utilizar como un único marcador el gen del ARNr 16S para la secuenciación se pueden detectar grandes cambios de diversidad dentro las comunidades bacterianas. Además, este método tiene su ventaja debido al menor costo de la secuenciación, ya que solo una pequeña parte del genoma esta secuenciado. Sin embargo, «amplicon sequencing» no da una información al respecto de las posibles funciones genéticas de la comunidad bacteriana y por eso se tiene que re-

alizar un análisis más para la afiliación taxonómica.

## CONCLUSIONES

La bioinformática, y aquí mas especialmente la bioinformática de las secuencias, permite el desarrollo de técnicas adecuadas para el tratamiento de datos la cual proviene de las nuevas técnicas de secuenciación. Hoy en día, esta ciencia es una herramienta indispensable para la biología y está en constante evolución para contestar a las necesidades de los biólogos.

## REFERENCIAS

- [1] Hesper, B., & Hogeweg, P. (1970). Bioinformatica: een werkconcept. *Kameleon*, 1(6), 28-29.
- [2] Marx, V. (2013). Biology: The big challenges of big data. *Nature*, 498(7453), 255-260.
- [3] Metzker, M. L. (2010). Sequencing technology the next generation. *Nature reviews genetics*, 11(1), 31-46.
- [4] Mardis, E. R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 9, 387-402.
- [5] Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., & Pace, N. R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(20), 6955-6959.
- [6] Vinje, H., Almy, T., Liland, K. H., & Snipen, L. (2014). A systematic search for discriminating sites in the 16S ribosomal RNA gene. *Microbial informatics and experimentation*, 4(1), 2.
- [7] Sanger, F., & Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA poly-

- merase. *Journal of molecular biology*, 94(3), 441-448.
- [8] Ronaghi, M., Uhln, M., & Nyren, P. (1998). A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*, 281(5375), 363-365.
- [9] Schwartz, S., Oren, R., & Ast, G. (2011). Detection and removal of biases in the analysis of next-generation sequencing reads. *PLoS one*, 6(1), e16685.
- [10] Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., ... & Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, 7(5), 335-336.
- [11] Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19), 2460-2461.
- [12] Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., ... & Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology*, 75(23), 7537-7541.
- [13] Andrews, S. (2010). FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. *Reference Source*.
- [14] Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., ... & Glckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, gks1219.
- [15] Maidak, B. L., Cole, J. R., Lilburn, T. G., Parker Jr, C. T., Saxman, P. R., Farris, R. J., ... & Tiedje, J. M. (2001). The RDP-II (ribosomal database project). *Nucleic acids research*, 29(1), 173-174.
- [16] Pruitt, K. D., Tatusova, T., & Maglott, D. R. (2005). NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic acids research*, 33(suppl 1), D501-D504.



### 3. EFFECT OF CuONPs OVER BACTERIAL COMMUNITIES OF AGRICULTURAL SOIL

*Concha-Guerrero, Sandra-I.<sup>1</sup>✉; Souza-Brito, Elcia-Margareth<sup>2</sup>; Gassie, C.<sup>3</sup>; Bertin, P.<sup>4</sup>; Caretta, César-A.<sup>5</sup>; Durán, Robert<sup>3</sup>; Orrantia-Borunda, Erasmo<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Center for Research in Advanced Materials, Chihuahua, Chih., Mexico;

<sup>2</sup>Environmental Engineering, Department of University of Guanajuato, Guanajuato, Gto. , Mexico; <sup>3</sup>Equipe Environment et Microbiologie UMR IPREM5254, IBEAS Université de Pau et des Pays de l'Adour, Pau, France;

<sup>4</sup>Université Paris Sud XI, Orsay; <sup>5</sup>Departamento de Astronomía, DCNyE, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Gto., México.

e-mail: <sup>1</sup>✉[ixmucame.guerrero@gmail.com](mailto:ixmucame.guerrero@gmail.com)

#### ABSTRACT

*The copper oxide nanoparticles (CuONPs) are widely used in the industrial for their excellent physicochemical properties and cost effectiveness. Their produced wastes affect the microorganisms present in the soil triggering ecological imbalance. This study evaluates the effects of CuONPs over soil microbial communities. All microcosms triplicates (control and exposed to CuONPs) were made using 100g of soil and 250mg of CuONPs[Kg·soil]<sup>-1</sup>, the incubation was performed for 30 days and the analyses were carry out in 0, 15 y 30 days. We evaluated the total microbial activity and observed a light variation immediately after the exposition to NPs ( $19.2 \pm 0.038$  to  $33 \pm 0.094 \mu\text{gFDA} \cdot \text{mL}^{-1}$  for control and CuONPs microcosm, respectively). Small variation was observed in the determination of soil metabolic capacity (28/31 carbon sources was used) comparing the microcosm control to CuONPs exposed. Terminal restriction fragment length polymorphism analyses (T-RFLP) were performed to evaluate the response of the bacterial communities, this result showed a small change on soil microbial communities composition. The results suggest that the deposition of CuONPs over soils modified the bacterial communities presents even in short times, and confirm the importance of enhance the eco-toxicological studies in order to evaluated the possible damage in the different ecosystems.*

**Keywords:** *CuONPs, Soil, bacterial communities, T-RFLP, microcosm.*

#### RESUMEN

Las nanopartículas de óxido de cobre (CuONPs) son ampliamente usadas por sus excelentes propiedades físico-químicas y su bajo costo. Sus residuos producidos afectan a los microorganismos presentes en el suelo provocando un desequilibrio ecológico. Este estudio evalúa el efecto de las CuONPs sobre las comunidades microbianas de suelo. Todos los microcosmos (control y expuestos a CuONPs) se realizaron por triplicado usando 100g de suelo y 250mg of CuONPs[Kg·soil]<sup>-1</sup>, la incubación fue llevada a cabo por 30 días y los análisis se realizaron en los días 0, 15 y 30. Se evaluó la actividad microbiana total

y se observó una ligera variación inmediatamente después de la exposición a NPs ( $19.2 \pm 0.038$  a  $33 \pm 0.094 \mu\text{gFDA} \cdot \text{mL}^{-1}$  microcosmos control y CuONPs, respectivamente). Pequeñas variaciones se observaron en la determinación de la capacidad metabólica (28/31 fuentes de carbono fueron usadas) comparando los microcosmos control y los de CuONPs. Análisis de T-RFLP (Terminal restriction fragment length polymorphism) fueron realizados para evaluar la respuesta de las comunidades bacterianas, estos resultados mostraron cambios en la composición de las comunidades microbianas. Los resultados sugieren que la deposición de CuONPs en el suelo modifica las comunidades bacterianas presentes en cortos tiempos y reafirma la importancia de realizar mayores estudios ecotoxicológicos para evaluar el posible daño en los diferentes ecosistemas.

**Palabras clave:** *CuONPs, suelo, comunidades bacterianas, T-RFLP, microcosmos.*

## INTRODUCCIÓN

Se considera NPs aquellas partículas que son menores a 100nm en tamaño [1]. Estas pueden ser agrupadas dentro de 3 categorías principales: naturales, antropogénicas y fabricadas. Las NPs fabricadas son clasificadas de acuerdo al tipo de material base y/o sus usos, además poseen una amplia variedad de morfologías, estructuras cristalinas, tamaños, áreas, entre otras características que definen sus propiedades físicas y químicas[2].

Una de las NPs óxido metálicas que ha generado gran interés a nivel industrial son las NPs de CuO (Óxido de cobre) debido a que poseen propiedades como superconductor a altas temperaturas [3], agente microbiano [4], fungicida [5], entre otras aplicaciones. Sin embargo los residuos generados por las industrias así como el deslave y desgaste de productos, la deposición, etc., trae consigo un aumento importante de la entrada de NPs en los diferentes ecosistemas. El principal ecosistema afectado es el suelo junto con sus componentes. Este es considerado como el mayor reservorio de diversidad microbiana en el planeta, con

factores abióticos y bióticos y posee una diversidad microbiana compleja [6]. Las comunidades microbianas en suelos son importantes por su relación con la fertilidad del suelo y con los ciclos biogeoquímicos de los elementos. Una vez que las NPs son depositadas en el suelo, el daño a los microorganismos pueden alterar la estructura de las comunidades, modificando la biomasa bacteriana y la taxonomía asociada a los diferentes ciclos geoquímicos produciendo desequilibrios en los diferentes micro-ecosistemas.

El estudio de la Eco-nanotoxicidad ha contribuido a describir la toxicidad de NPs en los ecosistemas [7]. La mayoría de estos análisis se han realizado con Ag-NPs, los cuales mostraron efectos negativos en las comunidades bacterianas de suelo y han sido clasificadas como altamente tóxicas [2, 8-10]. Otros efectos negativos han sido descritos para NPs de cobre, y zinc ya que estas poseen efectos antimicrobianos [11-13]. Así mismo se conoce que las NPs de óxido de titanio y oro no producen efecto sobre las comunidades bacterianas en suelo [14]. Debido a que hay resultados contradictorios acerca del efecto de las NPs sobre las comu-

nidades nativas de suelo, es de gran relevancia evaluar el efecto de CuONPs sobre las comunidades bacterianas en suelos agrícolas para establecer si hay cambios en la conformación, abundancia así como establecer las posibles interacciones de las comunidades microbianas con los Nanomateriales.

## METODOLOGÍA

### Síntesis y Caracterización de CuONPs

La síntesis de CuONPs se llevó a cabo por precipitación química y la caracterización fue llevada a cabo previamente por Concha-Guerrero *et al.* (2014) [15]. Las CuONPs obtenidas fueron esféricas con un rango de tamaño primario de 10-17 nm. El perfil de SEM-EDX indicó una alta pureza ya que en el análisis elemental solo se detectó la presencia de Cu y O.

### Sitio de muestreo y estrategia experimental

Las muestras de suelo se colectaron de una huerta de nuez en el estado de Chihuahua. La caracterización fisicoquímica del suelo se realizó previamente por Concha-Guerrero *et al.* (2014)[15]. Para la realización de los microcosmos se utilizó 100g de suelo y se colocaron en viales de 1L conteniendo una capacidad de retención de agua (CRA) inicial ajustada al 18%. Posteriormente se adicionaron las CuONP (250 mg CuONP<sup>-1</sup>Kg<sup>-1</sup>suelo suspendidas en agua tridestilada). El volumen de agua requerido para ajustar la CRA fue usado para preparar la suspensión de NPs. Para los controles (sin NPs) se adicionó

agua tridestilada para ajustar la CRA en 18%. Cada microcosmo se realizó por triplicado y se incubó por 30 días a temperatura ambiente sin agitación.

### Determinación de la actividad microbiana total activa

La evaluación de la actividad microbiana total del suelo se midió mediante la determinación de esterasas, a través de la hidrólisis del Diacetato de Fluoresceína, siguiendo el protocolo descrito por Adam y Duncan (2001) [16].

### Determinación de la actividad metabólica

La actividad metabólica fue realizada utilizando el test Biolog<sup>®</sup> Ecoplates (Biolog, Inc., Hayward, CA, USA). Se utilizó el protocolo descrito por Floch *et al.* (2011)[17].

### Extracción de ADN total de suelo de microcosmos

La extracción del ADN genómico total del suelo mediante el kit comercial PowerSoil<sup>®</sup> DNA Isolation Kit (MoBio Lab. Inc.), siguiendo las instrucciones del fabricante. La extracción se realizó por triplicado en los tiempos de incubación 0, 15 y 30 días.

### Amplificación de ADN total del suelo y T-RFLP

El gen 16S rDNA fue amplificado por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) usando los oligonucleótidos 8F (AGAGTTTGATCCTGGCTAG) marcado con FAM (Carboxifluoresceína) [18] y el oligonucleótido

1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) [19]. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización (95 °C por 10 min) seguido por 34 ciclos de desnaturalización (95 °C por 45s), alineamiento (55 °C por 45s) y elongación (72 °C por 1min) y finalmente un paso de elongación (72 °C por 10min). Los productos de PCR fueron purificados con el kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare). La amplificación se realizó de cada una de los ADN extraídos en los tiempos de incubación 0, 15 y 30 días. Para la creación de los perfiles del T-RFLP los productos de PCR purificados se sometieron a una restricción enzimática. Las enzimas utilizadas fueron AluI con sitio de reconocimiento AG/CT e HinfI con sitio de reconocimiento G/ANTC. Para llevar a cabo la restricción se prepararon 10L (volumen final) de mezcla de reacción conteniendo 3U de la enzima AluI e HinfI (Takara, Enzimas, bioLabs, Inc.), diluidos en el buffer recomendado por el fabricante. La mezcla se incubó por 3h a 37 °C. Las muestras digeridas (1L) se mezclaron con 8.75L de formamida ionizada y 0.25L de ROX (patrón de tamaños interno marcado con GS500, Applera, Italia). Volúmenes de 1.5L de las muestras se separaron mediante electroforesis capilar en un secuenciador ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem), bajo condiciones no desnaturalizantes. Los perfiles de T-RFLP se analizaron usando el software Genescan (versión 3.1; Applied Biosystems, USA). El tamaño en pares de bases, de los fragmentos separados se estimó por comparación con el patrón interno ROX GS500. Los datos obtenidos por debajo del 0.05% de intensidad de fluorescencia

absoluta fueron eliminados debido a que se consideran ruido del instrumento. Después los datos de T-RFs fueron normalizados (removiendo aquellos <1% de fluorescencia) [20]. Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo mediante el Software MVSP (Multi-Variance Statistical Package 3.1, Kovach Computing Services, UK).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Sitio de muestreo

Se realizó un muestreo en una huerta nogalera en el municipio de Delicias, Chihuahua. La caracterización fisicoquímica del sitio de muestreo fue reportada anteriormente por Concha-Guerrero *et al.*, 2014.

### Síntesis y caracterización de CuONPs

La síntesis de NPs se llevó a cabo usando el protocolo establecido por Concha-Guerrero *et al.*, 2014. El producto final obtenido fue un polvo de CuONPs el cual se caracterizó posteriormente. Las micrografías de MEB y MET de las CuONPs mostraron que estas presentaban una forma primaria esférica con un tamaño entre 10 y 17 nm. Los análisis elementales obtenidos por EDX mostraron que las síntesis de las nanopartículas no contenía ningún residuo de los componentes usados para la síntesis. Con estos resultados se comprueba que las NPs obtenidas fueron puras, ya que se encontró únicamente de cobre y oxígeno. El espectro de UV-Visible mostró un pico de emisión en 280nm. También se realizó un análisis por Rayos X para identificar la fase cristalina y al igual que el análisis de

EDX , se confirmó la presencia solamente de CuO.

### Determinación de la actividad microbiana total activa en microcosmos

La hidrólisis de FDA fue utilizada para evaluar el posible estrés generado por las CuONPs sobre las comunidades microbianas en los diferentes microcosmos. La determinación de la actividad de esterasas no resultó significativa en los microcosmos control con respecto a los microcosmos expuestos a CuONPs en los tiempo 15 y 30 días de exposición. Sin embargo, al inicio del experimento, una vez que las NPs fueron agregadas a los microcosmos se observó un incremento en la actividad microbiana. Los microcosmos sin exposición a NPs tuvieron

una actividad de FDA de  $19.16 \pm 3.53 \mu\text{gFDA}\cdot\text{mL}^{-1}$  en comparación a los microcosmos expuestos a CuONPs en los cuales se observo un aumento hasta  $32.97 \pm 0.50 \mu\text{gFDA}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Tabla 1). El aumento en la actividad de las comunidades es probablemente debido a una respuesta inmediata al estrés generado por las NPs. Posiblemente debido a la capacidad de adaptación que poseen los microorganismos, el efecto de las NPs en tiempos mas largos (15 y 30 días) no fue significativo para que pudiera detectarse una respuesta en la actividad enzimática de estas comunidades. Es posible que en el periodo estudiado las comunidades bacterianas de los microcosmos se encuentren adaptadas al nuevo microambiente impuesto y/o probablemente estan en un periodo de resiliencia.

Tabla 3.1: Determinación de la actividad microbiana total.

Tiempo de incubación	$\mu\text{gFDA}[\text{mL}]^{-1}$	
	Control	CuONPs
0 días	$19.16 \pm 3.53$	$32.97 \pm 0.50$
15 días	$23.16 \pm 0.43$	$22.83 \pm 1.42$
30 días	$16.09 \pm 2.36$	$15.75 \pm 1.93$

### Actividad metabólica

Las placas *Biolog EcoPlate* contienen 31 de las más comunes fuentes de carbón utilizadas por las comunidades en suelo. Estas 31 fuentes de carbón se encuentran por triplicado para un análisis más preciso. La capacidad de degradación de las fuentes de carbón presentes en la muestra de suelo proporciona un patrón

característico que se denomina la huella metabólica de la muestra. Los resultados obtenidos mediante este test nos indican que las comunidades presentes en los microcosmos poseían una alta capacidad metabólica ya que fueron capaces de degradar 28 de las 31 fuentes de carbón presentes, independientemente de la presencia o ausencia de NPs. En-

tonces, las CuONPs afectaron la habilidad de las comunidades microbianas en degradar únicamente 3 fuentes de carbón: el ácido 2-hidroxibenzoico cuyo efecto fue observado después de los 15 días de incubación, el ácido -hidroxibutírico y el ácido -cetobutírico, en estos últimos el efecto se observó hasta los 30 días de exposición (Figura 3.1). Es probable que si las comunidades cambian con la presencia de CuONPs, otras que se encuentran formando parte de la comunidad sean capaces de complementar las funciones de las comunidades mas sensibles, que se

perdieron con la exposición a NPs. Es bien sabido que las comunidades microbianas que componen los diferentes tipos de suelo son diversas y heterogéneas y que la diversidad de estas depende de factores ambientales como el clima, el tipo de suelo, el pH, de las propiedades químicas de suelo, entre otros. Por lo que la capacidad de adaptación de las comunidades nativas de una muestra ambiental, probablemente es mayor que la observada en los microorganismos aislados, y mas aún en cepas de colección como las ATCC.

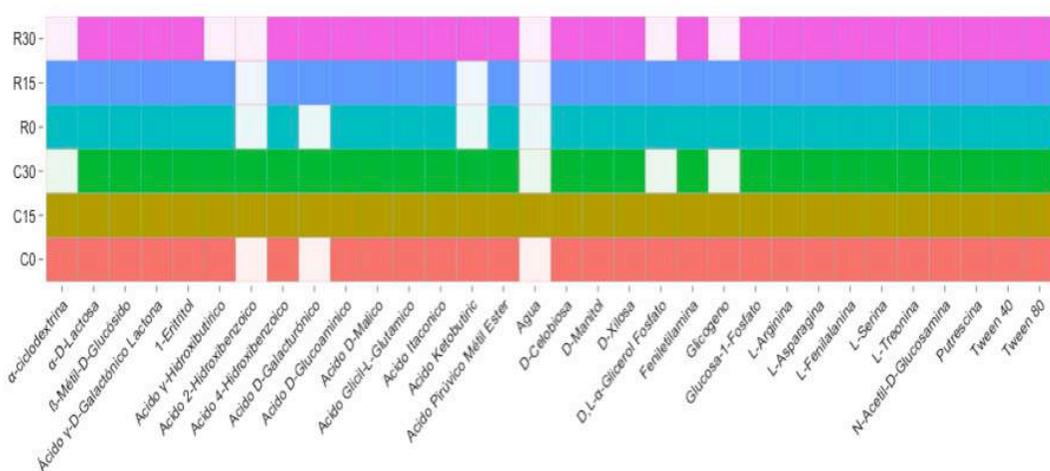


Figura 3.1: Huella metabólica de los microcosmos en tiempo 0, 15 y 30 días. C1, C2 y C3 representan las réplicas biológicas control sin exposición a NPs y R1, R2 y R3 son la réplicas biológicas expuestas a CuONPs. En el eje de las X se disponen las 31 fuentes de carbón disponibles en el ensayo.

### Análisis de comunidades microbianas en microcosmos – T-RFLP

El análisis de T-RFLP es una técnica útil para comparar cambios en las comu-

nidades microbianas sometidas a distintos tratamientos. Se estudió la diversidad bacteriana de microcosmos comparando aquellos que se expusieron a CuONPs con los que no fueron expuestos.

El T-RFLP se realizó a partir del ADN total extraído de las muestras de los microcosmos control (No expuestos a NPs) y los expuestos a CuONPs en los tiempos de 0, 15 y 30 días de incubación. Estos se utilizaron para amplificar el gen ADNr 16S con un total de 72 muestras. Se identificó el tamaño de los fragmentos los cuales fueron cuantificados en función de la intensidad de fluorescencia. En este análisis cada fragmento está relacionado a una unidad Taxonómica (OTU), mientras que la intensidad de fluorescencia equivale a la abundancia relativa de cada población presente en la muestra.

La enzimas de restricción *AluI* mostró ser más eficiente para la identificación de poblaciones bacterianas que la enzima *HinfI* (datos no mostrados). Por ejemplo con la enzima *AluI* se obtuvieron en los diferentes tiempos de incubación 74, 67 y 55 T-RFs para las muestras de los controles y 76, 71 y 34 T-RFs para los microcosmos expuestos a CuONPs, comparado con 32, 28 y 14 T-RFs en los controles y 36, 21 y 7 T-RFs en los expuestos a NPs, obtenidas con la enzima *HinfI*. La menor eficiencia observada por la enzima *HinfI* probablemente es porque para ésta enzima, el gen ADNr 16S de las diferentes poblaciones tiene el mismo

sitio de restricción terminal. De modo general, en todos los microcosmos se observó un decremento en las poblaciones con respecto al tiempo de exposición de las CuONPs. Se observó una disminución del 45% de las comunidades con la enzima *AluI* de los microcosmos control en el tiempo 0 días de incubación (74 T-RFs), con respecto a los microcosmos expuestos a CuONPs (34 T-RFs) a los 30 días de exposición. (datos no mostrados).

Se utilizó el Análisis de Componentes Principales (PCA) para evaluar todo el conjunto de datos obtenidos con el análisis de T-RFLP, con las dos enzimas (Figura 3.2). Este análisis construye una tabla de similitud, graficando los datos en dos dimensiones, por medio del cual se puede asumir que cuanto mas cercanas estén las muestras mas similares son entre sí. En nuestros resultados se puede observar una mayor similitud entre las comunidades bacterianas del control con respecto a las expuestas a NPs hasta los 15 días (Observar grupo 1C, 2R; 4C y 3R y el 5C de la Figura 2). Estos análisis también sugieren que las comunidades expuestas a 30 días formaron un grupo separado (Observar grupo: 6R: 31 y 32, 33 y 34, 35 y 36 de la Figura 30).

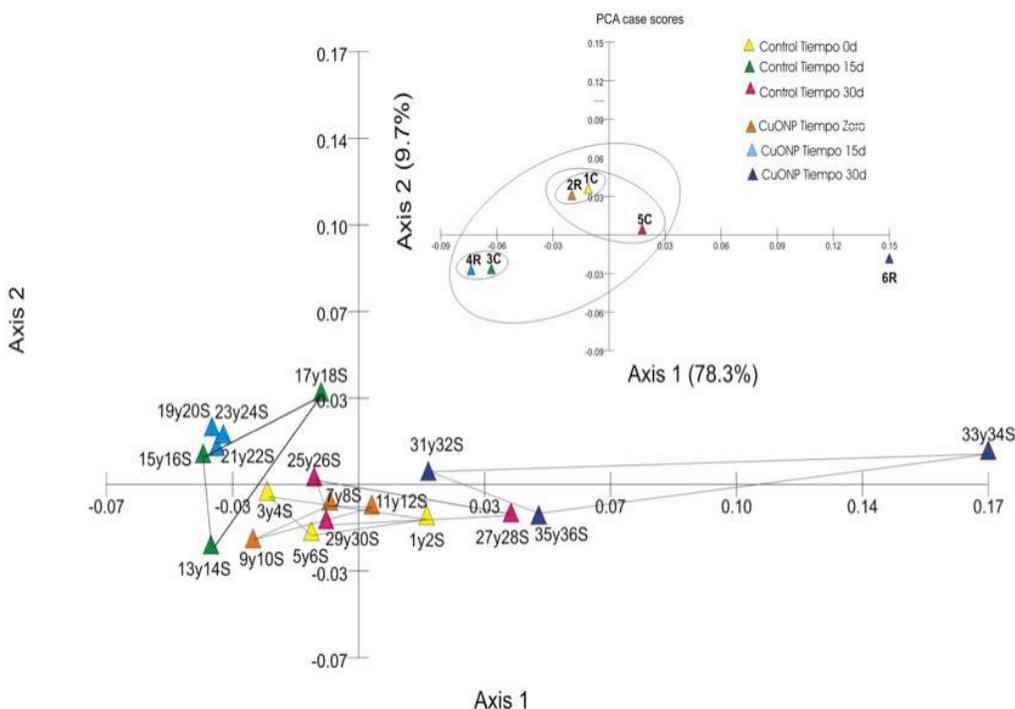


Figura 3.2: Análisis de componentes principales con datos de T-RFLP de los microcosmos control y los expuestos a CuONPs, digeridos con las enzimas *AluI* e *HinfI* I. El eje 1 representa el 78.3% de la variabilidad y el eje 2 el 9.7%.

## CONCLUSIONES

Este estudio evidencia los cambios en la composición de las comunidades microbianas debido a la exposición con CuONPs. Aún cuando los cambios producidos por el medio ambiente sobre las comunidades son importantes el efecto de las NPs es remarcable, lo que produce cambios en el microambiente del suelo. Es probable que la combinación de efectos ambientales y los producidos por las NPs sobre la composición del suelo puedan favorecer la disponibilidad del metal y en este sentido el exceso puede producir la citotoxicidad en los microorganismos del suelo.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es financiado por el proyecto CONACYT- CNPq MOD.ORD.44/2012 (42-205000-CB3O040113), Universidad de Guanajuato-DAIP (0195/2013), y Sandra I. Concha Guerrero recibió beca por CONACYT. Los autores agradecen el apoyo del Regional Platform for Environmental Microbiology PREMICE apoyado por Aquitaine Regional Government Council and the urban community of Pau-Pyrénées (France).

## REFERENCIA

[1] Nowack, B., & Bucheli, T. D. (2007). Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental pol-*

- lution, 150(1), 5-22.
- [2] Kumar, S., Tamura, K., & Nei, M. (2004). MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in bioinformatics*, 5(2), 150-163.
- [3] Jadhav, S., Gaikwad, S., Nimse, M., & Rajbhoj, A. (2011). Copper oxide nanoparticles: synthesis, characterization and their antibacterial activity. *Journal of Cluster Science*, 22(2), 121-129.
- [4] Ren, G., Hu, D., Cheng, E. W., Vargas-Reus, M. A., Reip, P., & Allaker, R. P. (2009). Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *International journal of antimicrobial agents*, 33(6), 587-590.
- [5] He, L., Lui, Y., Mustapha, Z., Lin, M. Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Microb. Res.* (2011). 166, 207e215.
- [6] Stefanis, C., Alexopoulos, A., Voidarou, C., Vavias, S., & Bezirtzoglou, E. (2013). Principal methods for isolation and identification of soil microbial communities. *Folia microbiologica*, 58(1), 61-68.
- [7] Maurer-Jones, M. A., Gunsolus, I. L., Murphy, C. J., & Haynes, C. L. Toxicity of engineered nanoparticles in the environment. *Analytical chemistry*. (2013). 85(6), 3036-3049.
- [8] Bradford, A., Handy, R. D., Readman, J. W., Atfield, A., & M'uhling, M. (2009). Impact of silver nanoparticle contamination on the genetic diversity of natural bacterial assemblages in estuarine sediments. *Environmental science & technology*, 43(12), 4530-4536.
- [9] Chunjaturas, W., Ferguson, J. A., Rattanapichai, W., Sadowsky, M. J., & Sajjaphan, K. Shift of bacterial community structure in two Thai soil series affected by silver nanoparticles using ARISA. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. (2014). 30(7), 2119-2124.
- [10] Carbone, S., Antisari, L. V., Gaggia, F., Baffoni, L., Di Gioia, D., Vianello, G., & Nannipieri, P. Bioavailability and biological effect of engineered silver nanoparticles in a forest soil. *Journal of hazardous materials*. (2014). 280, 89-96.
- [11] Neal, A. L. (2008). What can be inferred from bacteriumnanoparticle interactions about the potential consequences of environmental exposure to nanoparticles?. *Ecotoxicology*, 17(5), 362-371.
- [12] Fabrega, J., Fawcett, S. R., Renshaw, J. C., & Lead, J. R. (2009). Silver nanoparticle impact on bacterial growth: effect of pH, concentration, and organic matter. *Environmental science & technology*, 43(19), 7285-7290.
- [13] Dinesh, R., Anandaraj, M., Srinivasan, V., & Hamza, S. (2012). Engineered nanoparticles in the soil and their potential implications to microbial activity. *Geoderma*, 173, 19-27.
- [14] Nogueira, V., Lopes, I., Rocha-Santos, T., Santos, A. L., Rasteiro, G. M., Antunes, F., & Pereira, R. (2012). Impact of organic and inorganic nanomaterials in the soil microbial community structure. *Science of the total environment*, 424, 344-350.
- [15] Concha-Guerrero, S. I., Brito, E. M. S., Piñón-Castillo, H. A., Tarango-Rivero, S. H., Caretta, C. A., Luna-Velasco, A., Duran, R. & Orrantia-Borunda, E. Effect of CuO Nanoparticles over Isolated Bacterial Strains from Agricultural Soil. *Journal of Nanomaterials*. (2014). Vol. 2014.
- [16] Adam, G., & Duncan, H. (2001). Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(7), 943-951.
- [17] Floch, C., Chevremont, A. C., Joanico, K., Capowiez, Y., & Criquet, S. (2011). Indicators of pesticide contamination: soil enzyme compared to functional diversity of bacterial communities via

- Biolog<sup>®</sup> Ecoplates. *European Journal of Soil Biology*, 47(4), 256-263.
- [18] Lane, D. J. (1991). rRNA sequencing, in *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic*, G. M. E. Stachenbradt, Wiley, Chichester, UK Ed., pp. 115-175.
- [19] Wang, L., Wang, W., Lai, Q., & Shao, Z. (2010). Gene diversity of CYP153A and AlkB alkane hydroxylases in oildegrading bacteria isolated from the Atlantic Ocean. *Environmental microbiology*, 12(5), 1230-1242.
- [20] Hewson, I., & Fuhrman, J. A. (2004). Richness and diversity of bacterioplankton species along an estuarine gradient in Moreton Bay, Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3425-3433.

## 4. MODELAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN BIODIGESTOR ANAEROBIO PARA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS A PARTIR DE RESIDUOS DE CABRA Y DE CONEJO

*M.-García, Martín-T.*<sup>1</sup>; *G.-García, Jessica-J.*<sup>1</sup>; *M.-Ramírez, Jose-L.*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ingeniería Química, División de Ciencias Naturales y Exactas.  
Universidad de Guanajuato, Guanajuato México  
Cerro de la Venada S/N, Guanajuato, Gto.  
e-mail: <sup>1</sup>garciamt@ugto.mx

### ABSTRACT

*Study of biodigestion was developed with various organic materials in a bioreactor of stainless steel built and implemented in the chemical Engineering laboratory (DCNE, Campus Guanajuato). The reactor was implemented with temperature, pressure and methane sensors that allow monitoring the concentration of produced gas and the operating conditions during the digestion time. The main objective is to analyze the process of digestion quantitatively to optimize the operating conditions of the equipment used to test different materials and to apply these results to the possible escalation to higher capacity biodigesters. experimental data for the production of biogas from manure goat using methane production models and kinetics batch. Experimental data were fitted with different models and also describing the process kinetics (biomass, substrate and product), to measure the amount of CH<sub>4</sub> produced theoretically.*

**Keywords:** *Anaerobic technology, Biogas Production, models for the biodigestion process.*

### RESUMEN

Se ha desarrollado el estudio de la biodigestión con materiales orgánicos, en un bioreactor de acero inoxidable construido e instrumentado en el laboratorio de Ingeniería química de la DCNE, Campus Guanajuato. El reactor se acondicionó con sensores de temperatura, presión y de gas metano que permiten monitorear la concentración del gas y las condiciones de operación durante el tiempo de digestión. El objetivo principal es analizar el proceso de la digestión cuantitativamente con la intención de optimizar las condiciones de operación y funcionamiento del equipo utilizado, para probar diferentes materiales y poder aplicar estos resultados al posible escalamiento a biodigestores de mayor capacidad. Mediante datos experimentales para producción de biogás a partir de estiércol de cabra haciendo uso de modelos para producción de metano y para la cinética del proceso por lotes. Se ajustaron los datos experimentales con diferentes modelos y también abordando la cinética del proceso (biomasa, sustrato y producto), para medir la cantidad de CH<sub>4</sub> producido de forma teórica.

**Palabras clave:** *Tecnología anaerobia, Producción de Biogás, modelos para el proceso de biodigestión.*

## INTRODUCCIÓN

El uso global de la energía ha ido aumentando desde la Revolución Industrial en forma creciente. Las fuentes principales de energía son los combustibles fósiles: carbón, gas natural y petróleo, que aportan entre el 75% y el 85% del total de la energía utilizada. Las reservas de combustibles fósiles son limitadas y, a corto o mediano plazo, se necesitarán fuentes alternativas de combustible. Una forma de generar energía es la biodigestión anaerobia. Los procesos de tratamiento anaeróbicos son procesos microbiológicos complejos, que implican varios pasos biológicos realizados por grupos específicos de bacterias que funcionan sólo en la ausencia de aire. Tales procedimientos se utilizan a menudo para el tratamiento y eliminación de residuos, al mismo tiempo que se generan productos con cierta utilidad [1,2]. Las excretas de las actividades agropecuarias son una forma alternativa de biomasa que poseen las características bioquímicas necesarias para el desarrollo de la actividad microbiana, que es aprovechada para la obtención de biogás mediante degradación anaerobia [3]. Además de que aprovechando estos residuos, como materia prima para la producción de biogás, se puede reducir en un 20% las emisiones de gas metano que son producidas por las actividades ganaderas [4]. La digestión anaerobia, es un proceso biológico degradativo, el cual parte de los materiales orgánicos presentes en el sustrato (residuos vegetales o animales) que son transformados a biogás. Los residuos agropecuarios sin aprovechar aportan un alto porcentaje a las emisiones de metano ( $\text{CH}_4$ ),

dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) a la atmósfera, con lo que el aumento de las concentraciones de estos gases en la atmosfera contribuye al calentamiento global [3,5]. Todos los compuestos orgánicos convertibles al biogás se conocen como sólido volátil (S). Los Sólidos volátiles representan una porción de la alimentación para formar metano. La primera etapa del proceso de producción de biogás es la conversión de estos compuestos orgánicos en los ácidos carboxílicos simples, como el resultado de actividades hidrolíticas de microorganismos. La segunda fase es la formación de biogás, que es un proceso anaerobio debido a bacterias metanogénicas [6]. La conversión de los ácidos carboxílicos tiene dos posibilidades. La primera y deseada es la conversión a metano ( $\text{CH}_4$ ). Sin embargo, en la segunda posibilidad una parte siempre se convierte inevitablemente en dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) como un producto secundario del metabolismo de microorganismo. En la digestión anaerobia se suelen identificar tres pasos principales:

- La hidrólisis de la materia orgánica compleja;
- La fase acidogénica, debido a la producción de ácidos volátiles; y
- Fase metanogénica donde las bacterias metanogénicas convierten los ácidos volátiles en el producto final,  $\text{CO}_2$  y  $\text{CH}_4$  [1].

Entre los ácidos volátiles, el ácido acético es el precursor más importante de la metanogénesis. Puesto que las bacterias metanogénicas son las más sensibles, con las tasas de crecimiento más bajas, la

metanogénesis se considera con frecuencia que es el paso que controla la velocidad en los diversos trabajos de modelización para este proceso [7,8]. La selectividad en el proceso de producción de biogás está dada por la relación entre  $\text{CH}_4$  formado y el  $\text{CO}_2$  no deseado. El propósito de optimizar la producción de biogás no sólo es para obtener la más alta conversión de sólidos, sino también para lograr la mayor selectividad posible de  $\text{CH}_4$ . Existen diversas formas para estimar y medir las emisiones de biogás, específicamente de  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ . Los modelos para la estimación de gases son teóricos y utilizan variables que dependen de las condiciones de operación y del tipo de materia prima, además de que dan por hecho consideraciones importantes como tamaño, edad del animal así como factores climáticos [9]; por otro lado, existen metodologías que los cuantifican directamente, pero son equipos costosos o requieren equipo técnico para su uso y para la interpretación de datos. La cinética de reacción es otra manera de contabilizar la producción de  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$  los cuales se obtienen como producto del metabolismo de carbohidratos contenidos en el estiércol de animal por las bacterias presentes en este; la cinética del proceso se puede representar a partir de datos experimentales de producción por día del producto, biomasa o sustrato, teniendo en cuenta los rendimientos de consumo y producción. Los avances de la computación han permitido el desarrollo de modelos matemáticos cada vez más detallados y precisos que luego se utilizan en el diseño, escalado, optimización y control de procesos de una forma rápida y económica, al reducir los costos por la eliminación de parte del trabajo ex-

perimental en la industria [10]. Las variables a modelar en el proceso de biodigestión son, la biomasa, el sustrato limitante, el producto, el oxígeno y el calor, fundamentalmente. La modelación matemática de este proceso incluye la descripción cinética, a nivel del microorganismo y del biorreactor. Aunque la digestión anaerobia se lleva a cabo por muchos grupos de bacterias y en varias etapas, es más común modelar la cinética de absorción del sustrato con una tasa de crecimiento que depende solo de la reacción global. En todos los modelos de crecimiento global, los parámetros más importantes son; la tasa específica de crecimiento celular ( $\mu$ ) la cual es una fracción de la tasa máxima de crecimiento de las bacterias ( $\mu_{max}$ ) [8].

En la literatura [11-13] se sugiere que la ecuación tipo Contois es más aplicable para sustratos de tipo fibroso, ya que la etapa de la hidrólisis del sustrato tiene un bajo rendimiento, lo que limita la velocidad de la reacción, como sería el caso de algunas materias fibrosas, mientras que la Monod representa mejor la cinética de sustratos solubles y homogéneos [13-15].

## METODOLOGÍA

Un biodigestor es un sistema natural que aprovecha la digestión anaerobia (en ausencia de oxígeno) de las bacterias que ya habitan en el estiércol, para transformar éste en biogás y fertilizante [10]. Permitiendo así la obtención de energía limpia de bajo costo a partir de una fuente renovable, consta de un contenedor cerrado, hermético e impermeable, dentro del cual se depositan los materiales citados anteriormente en determinada dilución de agua para que se des-

componga, produciendo gas metano y fertilizantes orgánicos ricos en nitrógeno, fósforo y potasio, figura 4.1. A pesar de que el estudio de biodigestores ha tenido bastante auge, el proceso de biodigestión es muy inestable, debido a esto no existe un solo modelo matemático que ajuste la producción de biogás ( $\text{CH}_4$ ) a partir de cualquier tipo de materia prima [1,7]. En el presente estudio se utilizó estiércol de cabra como materia prima. En la primera carga experimental se pesó el estiércol y se mezcló con agua, con una dilución de 1:2 con agua, en el biodigestor de 10 litros de capacidad. El reac-

tor cuenta con un sensor para gas metano para medir el volumen generado de gas, figura 4.2, siendo el peso húmedo total de 4.4 kg con lo que se obtuvo una producción acumulada de  $\text{CH}_4$  de 1.4897  $\text{m}^3/\text{kg}$  húmedo hasta el día 34 que duró la experimentación. Se midió el pH inicial con un medidor de pH digital marca Conductronic y se mantuvo un pH promedio de 7 durante el tiempo experimental. Se selló el biorreactor y se llenó con agua la chaqueta de calentamiento, sellando la alimentación de esta con Parafilm para evitar la evaporación del agua de calentamiento.



Figura 4.1: Biodigestor escala laboratorio con almacén, sensor de metano y software de adquisición de datos.



Figura 4.2: Sistema experimental de biodigestión y software de adquisición de datos.

La temperatura del biodigestor se mantuvo en  $40\text{ }^\circ\text{C}$  utilizando una parrilla eléctrica de 400 W conectada a un controlador de temperatura de construcción propia, en la figura 4.3 se muestra el diagrama del circuito de manera que se enciende o apaga la parrilla si la temperatura está abajo o arriba de los  $40\text{ }^\circ\text{C}$ , los datos de temperatura se registraron en una PC a través de una interfaz RS-232, utilizando el software MUL-600. La presión del sistema se monitorea con un manómetro de caratula tipo

Bourdon, registrándose valores de 0 a  $2\text{ kg}/\text{cm}^2$ . El tiempo de residencia para la materia prima fue 34 días. Durante este tiempo se agitó la mezcla 2 veces por semana manualmente, con el agitador del mismo bioreactor para optimizar las etapas de la digestión anaerobia. Después se descargó el biorreactor y se labó el mismo terminando con ello la primera carga, en la tabla 5.1, se muestran los datos de operación del biodigestor.

Se realizó un conteo de bacterias desde el inicio de la experimentación en la mate-

ria prima mediante cámara de Neubauer, para dar seguimiento a la cinética de la reacción. Y para llevar a cabo el balance de materia para el sustrato inicial se tomó en consideración la composición del excremento de cabra reportada por

[8]: lípidos 2.90%, proteínas 4.70%, carbohidratos: celulosa y lignina 34% y 33% y ceniza 26.40%; para la cuantificación final se calcinó la materia prima remanente.

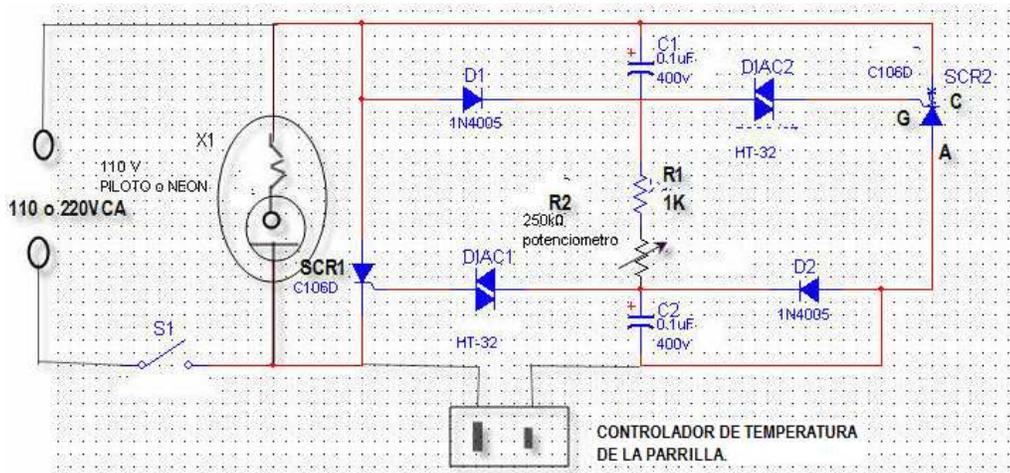


Figura 4.3: Diagrama del circuito del controlador de Temperatura.

## RESULTADOS

Tabla 4.1: Parámetros de operación del biodigestor

Parámetro	Valor	Unidades
Estiércol	15	%
Volumen total de líquidos	2.9	l
Tiempo de retención	35	Días
Sólidos totales	4	%
Inicio producción de biogás	15	Días
Temperatura ambiente	21.5	°C
Temperatura del digestor	40	°C
Grado de acidez	7	pH

En la literatura abierta existen diversos modelos teóricos que dependen de diferentes parámetros, como el tipo de sustrato o las condiciones de operación (temperatura, pH, agitación, presión, etc) [12-15], en la tabla 5.2 se muestran los modelos seleccionados para interpretar los datos experimentales del presente estudio. En la aplicación de los modelos, el problema real está dado en la escasez de medidas en línea, además, la variable de estado dominante, como la concentración de sustrato en el medio, es muy difícil de medir. Otros problemas son la fuerte incertidumbre paramétrica y la presencia de no-linealidad significativa. El modelo que describe los datos experimentalmente de producción de  $CH_4$  es:

$$P_{CH_4} = \frac{V_{CH_4}}{3.938} * \left(1 - e^{-t/0.9234}\right) \quad (4.1)$$

En la figura 4.4, se muestran la comparación de los datos obtenidos experimentalmente y los calculados con el modelo 4.1, donde se observa una tendencia ligeramente exponencial hasta los 34 días de proceso.

En cuanto a la cinética del proceso se realizaron balances de materia para un re-

actor por lotes, obteniendo las siguientes ecuaciones que describen el comportamiento del producto (4.2), sustrato (4.3) y biomasa (4.4) respectivamente.

$$P = 0.0436t \left[ \frac{m^2}{kg\_estiercol} \right] \quad (4.2)$$

$$S = 120.295 - 0.4191t \left[ \frac{gr\_sustrato}{kg\_estiercol} \right] \quad (4.3)$$

$$X = 6551.6 - 184t \left[ \frac{gr\_cel}{kg\_estiercol} \right] \quad (4.4)$$

Tabla 4.2: Modelos de producción de CH<sub>4</sub> (metano)

Autor	Modelo
Sogari, 2003	$P_{CH_4} = \frac{V_{CH_4}}{S_{o}r_{gtot}} * \left(1 - e^{-t/A}\right) \quad (4.5)$
J. J. Lay, 1996	$P_{CH_4} = P * \exp \left[ - \exp \left[ \frac{Rm}{P} * \exp(\lambda - t) + 1 \right] \right] \quad (4.6)$
Walteros, 2007	$V_n = \frac{V_{med}}{P_n} * \frac{T_n}{T} \left[ P_a + P_{max} \left[ 1 - e^{-tAe^{-E_a/RT}} \right] \right] \quad (4.7)$
Cinética	$\frac{dx}{dt} = r_x - r_d \quad (4.8)$
	$\frac{ds}{dt} = Y_{s/x}(-r_x) - mx \quad (4.9)$
	$\frac{dp}{dt} = r_x Y_{p/x} \quad (4.10)$

La figura 4.4, muestra la comparación de los datos experimentales y los datos obtenidos mediante el balance de materia. El potencial de producción de metano a partir de estiércol de cabra calculado teóricamente permitió validar la confiabilidad del modelo seleccionado , y

en la figura 4.5 se muestra que la producción de metano a partir de la cinética pueden determinarse en función del consumo de sustrato y del seguimiento que se hizo a la población bacteriana. En ambos casos la representación grafica de los datos obtenidos experimentalmente y

los valores determinados analíticamente con los modelos teóricos son prácticamente iguales, lo que permite establecer la metodología para llevar a cabo la ex-

perimentación con otros materiales y la interpretación de estos datos experimentales.

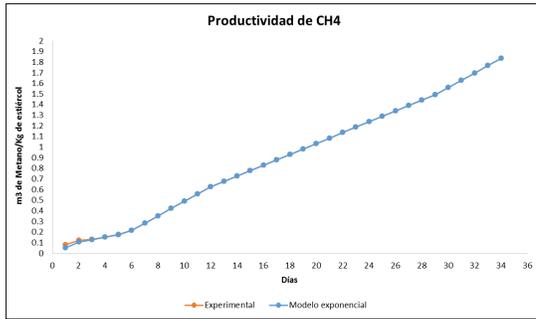


Figura 4.4: Producción de CH<sub>4</sub> experimental y teórica

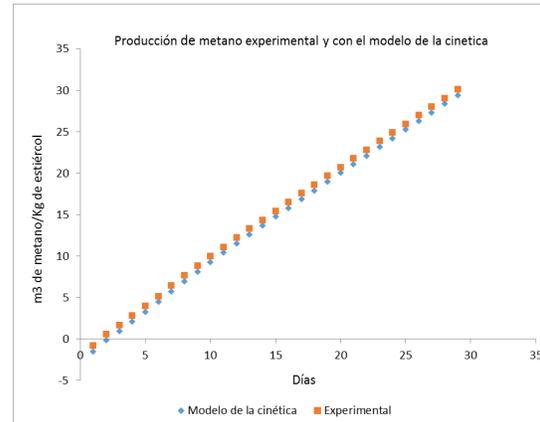


Figura 4.5: Producción de CH<sub>4</sub> experimental y cinética

## CONCLUSIONES

La digestión anaerobia ofrece alternativas interesantes para resolver problemas de contaminación ambiental, ya sea para el tratamiento convencional de residuos o para el aprovechamiento específico de algunos de ellos. A partir de la literatura revisada se seleccionaron algunos modelos para determinar la producción de CH<sub>4</sub> y se aplicó el modelo de Monod para interpretar la cinética, siendo el modelo que mejor describe los datos obtenidos de forma experimental en el biodigestor a escala de laboratorio. Los resultados obtenidos con la experimentación y contrastados con el modelo matemático seleccionado fueron razonablemente buenos. Lo que permite proponer una metodología sistemática y mejoras para la operación del biodigestor con otros materiales.

## REFERENCIA

- [1] Arias, M. P. (2011). Estudio de factibilidad sobre la utilización de biodigestores para viviendas sociales. Valdivia, Chile: Universidad Austral de Chile.
- [2] H. Álvarez, R. L. (2009). Metodología para la obtención de modelos semifísicos de Base Fenomenológica. Revista Iberoamericana de automática e información industrial, 10-20.
- [3]. Hernández, I. F. (2010). Emisiones de Metano Generadas por Excretas de Animales de Granja. Edo de México. Tesis de Doctorado, Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo.
- [4.] J.J Lay, Y. N. (1996). Effect of moisture content and chemical nature on methane fermentation characteristics of municipal solid wastes. Journal of Environmental System and Engineering JSCE, 101-108.
- [5]. Moreno, M. T. (2011). Manual del Biogás. MINENERGIA / PNUD / FAO / GEF, Proyecto CHI/00/G32 Chile: Remoción de Barreras para la Electrificación Rural con Energías Renovables. ED.

FAO.Santiago de Chile.

[6]. Moss, A. (2000). Methane production by ruminants: its contribution to global warming. INRA EDP Sciences, 231-253.

[7]. Sogari, N. (2003). Cálculo de la producción de metano generado por distintos restos orgánicos. Argentina. Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas.

[8]. Varnero, M. (2001). Desarrollo de sustratos: Compost y Bioabonos. Chile: Publicaciones Misceláneas Forestales. [9] Velasco, A. B. (2014). Modelamiento matemático de la producción de biogás a partir de lactosuero. Xalapa, Veracruz: Universidad Veracruzana.

[10] T. Ergder, U. T. (2001). Anaerobic Biotransformation and methane generation potential of cheese whey in batch and UASB reactors. Waste Management 21, 643-650.

[11]. Walteros, G. A. (2007). Diseño y con-

strucción de un biodigestor anaerobio de lecho fijo para operación en continuo escala piloto. Bucaramanga, Colombia: Universidad Industrial de Santander.

[12] Michael B. Cutlip, Mordechai Shacham. (2008). Problem Solving Chemical and Biochemical Engineering with Polymath, Excel and MATLAB, Prentice Hall.

[13] Ivan Simeonov, Sette Diop. (2010). Stability Analysis of Some Nonlinear Anaerobic Digestion Models. Int. J. Bioautomation, 14(1), 37-48.

[14] Andrews, J. F. (1969). Dynamic Model of the Anaerobic Digestion Process, J. Sanit. Eng. Div., 95-116.

[15] Andres Donoso-Bravo, Johan Mailier, Cristina Martin, Jorge Rodriguez, Cesar Arturo Aceves-Lara, Alain Vande Wouwer. Model selection, identification and validation in anaerobic digestion: A review. Water Research, 2011, 45, 5347 -5364

## 5. DEGRADACIÓN DE LIGNINA MEDIANTE EL PROCESO FENTON

*Olivo-Toledo, Jenifer<sup>1</sup>✉; Martínez-Herrera, Gabriel<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>UMSNH, Morelia, México, <sup>2</sup>UMSNH, Morelia, México  
*Gral. Francisco J. Mugica S/N, Ciudad Universitaria, Morelia, Mexico,*  
e-mail: <sup>1</sup>✉[jenifer\\_toledolivo@hotmail.com](mailto:jenifer_toledolivo@hotmail.com)

### ABSTRACT

*The process of cellulose production and paper represents one of the industries highly pollutant due to the fact that it generates big quantities of effluent of black color constituted principally for lignin. In this work I use of lignina as model of pollution to evaluate its degradation for the process fenton both homogeneous and heterogeneous, Using an experimental statistical design 2<sup>3</sup>, they were considered to be the following independent variables: concentration of lignin (100 and 50 mg/L), concentration of peroxide (30 and 60 mM and pH (3, 4 and 5). For the process fenton homogeneous the favorable condition for the degradation of lignin was to use a concentration of lignin of 100 mg, 30 mM of peroxide to pH 5 the percentage of degradation obtained was 73%. Likewise for the process fenton heterogeneous it was the condition of 50 mg/L of lignin, 30 mM of peroxide to pH 3 obtaining a percentage of degradation of 57%.*

**Keywords:** *Treatment of water, Lignin, homogeneous fenton, heterogeneous fenton, experimental design*

### RESUMEN

El proceso de producción de celulosa y papel representa una de las industrias altamente contaminante debido a que genera grandes cantidades de efluentes de color negro constituido principalmente por lignina. En este trabajo se uso de lignina como modelo de contaminación para evaluar su degradación por el proceso fenton tanto homogéneo como heterogéneo. Utilizando un diseño experimental estadístico 2<sup>3</sup>, se consideraron las siguientes variables independientes: concentración de lignina (100 y 50 mg/L), concentración de peróxido (30 y 60 mM y pH (3, 4 y 5). Para el proceso fenton homogéneo la condición favorable para la degradación de lignina fue usar una concentración de lignina de 100 mg, 30 mM de peróxido a pH 5 el porcentaje de degradación obtenido fue de 73%. Asimismo para el proceso fenton heterogéneo fue la condición de 50 mg/L de lignina, 30 mM de peróxido a pH 3 obteniendo un porcentaje de degradación de 57%.

**Palabras clave:** *Tratamiento de agua, Lignina, fenton homogéneo, fenton heterogéneo, diseño experimental*

### INTRODUCCIÓN

La lignina es un polímero de fenilpropanoides responsable de impartir re-

sistencia a las estructuras de celulosa y hemicelulosa que conforman la estructura de maderas. La gran cantidad de lignina se obtiene principalmente como subpro-

ducto de la industria de celulosa kraft, ello genera un efluente negro que se mezcla con distintas variedades de contaminantes [1]. Este efluente llega a producir al medio ambiente impactos térmicos, sustancias tóxicas que causan la muerte a los peces, problemas de color y pérdida de la belleza estética [2]. Los procesos de oxidación avanzada han sido ampliamente utilizados para el tratamiento de efluentes para la decoloración y eliminación de compuestos recalcitrantes. Entre ellos se encuentra el proceso fenton el cual consiste en la generación de radicales hidroxilo a partir de peróxido de hidrogeno utilizando como catalizador al sistema hierro  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  [3]. El proceso fenton que presenta algunas ventajas respecto a otras técnicas de oxidación avanzada como son la simple instalación y operación a condiciones de presión y temperatura ambiente. En consecuencia ha sido considerado una alternativa económica. Sin embargo también presenta ciertas desventajas para su aplicación como la de incluir una etapa extra de separación del metal fierro del medio de reacción que al final se traduce en costos así como que determinadas cantidades de fierro permanecen en solución como nuevos contaminantes. Un método alternativo para superar este problema es el uso de catalizadores heterogéneos. En los últimos años el uso de zeolitas modificadas con fierro ha sido objeto de estudio para ser utilizadas como catalizadores en el proceso fenton. Las zeolitas son un grupo de minerales de aluminosilicatos cristalinos con una estructura en forma de jaula con múltiples espacios llenos de cationes los cuales mediante el método de intercambio iónico se puede impregnar con el metal fierro

[4]. Para este trabajo de investigación se pretende utilizar el sistema fenton homogéneo y heterogéneo este el objetivo de degradar la lignina. Estos procesos son dependientes de múltiples factores como son: la concentración de lignina, el pH, concentración de peróxido de hidrógeno y la concentración de hierro. Para su poder inferir el efecto dichos factores se realizara un análisis estadístico empleando un diseño factorial  $2^3$  para cada fenton donde se elegirán tres factores y con dos niveles teniendo como variable respuesta la degradación de la lignina.

## METODOLOGÍA

### Cinéticas de degradación fenton homogéneo

Los factores y niveles del experimento se muestran en la (Tabla 5.1). Con el diseño experimental (Tabla 5.2) se obtuvieron 8 tratamientos. Se replicaron tres veces. Las condiciones del proceso fueron llevado a acabo en matraces erlenmeyer de 500 mL, con un volumen de reacción de 250 mL en un equipo de propelas con una velocidad de agitación de 250 rpm, la cantidad de hierro se mantuvo constante de 60 mg. Los ensayos fueron realizados durante 4 horas cada uno y se tomo una alícuota de 1 mL cada 20 min, se centrifugo a 2500 rpm durante 3 minutos. Se leyó la absorbancia de lignina a 280 nm.

Tabla 5.1: Valores de factores y niveles establecidos para el diseño

Factor	Nivel	
	Alto	Bajo
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	60 (mM)	30 (mM)
pH	5	4
Lignina	100 (mg/L)	50 (mg/L)

Tabla 5.2: Combinaciones de los tratamientos para las cinéticas de degradación

N° Experimentos	Niveles de factores		
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM)	pH	Lignina (mg/L)
1	30	3	50
2	60	3	50
3	30	5	50
4	60	5	50
5	30	3	100
6	60	3	100
7	30	5	100
8	60	5	100

### Preparación de la zeolita impregnada con Hierro

Se utilizo una zeolita natural clinoptilolita proveniente del estado de guadalajara, Mexico. La cual fue molida y tamizada con tamiz de malla de 0.5 mm, la zeolita fue lavada varias veces para remover el polvo. La impregnación con hierro se llevo a cabo colocando 25 gr de zeolita en una contacto con una solución de 250 mL de cloruro férrico 0.1 M en un equipo de reflujo durante dos contactos de 3 horas al finalizar cada contacto se hicieron 10 lavados con agua destilada para remover los cloruros remanentes posteriormente se seco a 60 C.

### Cinéticas de degradación fenton heterogéneo

Los factores y niveles del experimento se muestran en la (Tabla 5.3). Con el diseño experimental (Tabla 5.4) se obtuvieron 8 tratamientos. Se replicaron tres ve-

ces. Las condiciones del proceso fueron llevado a acabo en matraces erlenmeyer de 500 mL, con un volumen de reacción de 250 mL en un equipo de propelas con una velocidad de agitación de 250 rpm, la cantidad de catalizador fue de 1 g/L. Los ensayos fueron realizados durante 4 horas cada uno y se tomo una alícuota de 1 mL cada 20 min, se centrifugo a 2500 rpm durante 3 minutos. Se leyó la absorbancia de lignina a 280 nm.

Tabla 5.3: Valores de factores y niveles establecidos para el diseño

Factor	Nivel	
	Alto	Bajo
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	60 (mM)	30 (mM)
pH	5	3
Lignina	100 (mg/L)	50 (mg/L)

Tabla 5.4: Combinaciones de los tratamientos para las cinéticas de degradación

N° Experimentos	Niveles de factores		
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM)	pH	Lignina (mg/L)
1	30	3	50
2	60	3	50
3	30	4	50
4	60	4	50
5	30	3	100
6	60	3	100
7	30	4	100
8	60	4	100

### Análisis de datos

Los resultados obtenidos de las cinéticas de degradación fueron analizados con el software de Minitab 16. Para poder inferir el efecto de cada factor en el experimento.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Para el proceso homogéneo

La Figura 8.1 muestra los porcentajes de degradación en un lapso de 4 horas. El porcentaje de degradación mayor alcanzado fue el tratamiento 7.

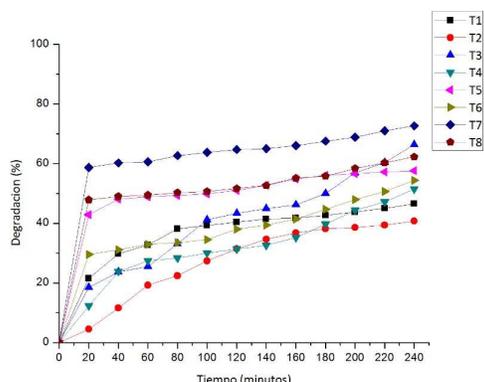


Figura 5.1: Se graficaron los porcentajes de degradación de lignina.

Empleando el software de minitab se realizó el análisis de varianza la Tabla 5.5. Muestra los valores de la p con un nivel de significancia de 0.05. Se determina que los factores con significancia es la concentración de peróxido, el pH, la concentración de lignina y la interacción de los tres factores.

### Para el proceso heterogéneo

La Figura 8.2. Muestra los porcentajes de degradación en un lapso de 4 horas. El porcentaje de degradación mayor alcanzado fue el tratamiento 3.

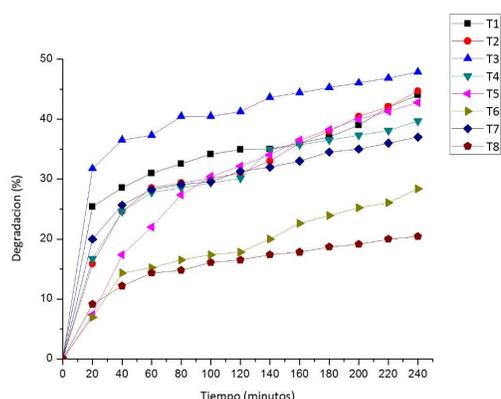
Tabla 5.5: Análisis de varianza del diseño experimental  $2^3$  para la degradación de lignina.

Factor	Suma de cuadrados	g. l.	C. M.	F	Valor - p
A: H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	562.64	1	378.009	67.12	0.000
B: pH	950.19	1	931.347	165.38	0.000
C: Lignina	571.89	1	553.327	98.25	0.000
AB	68.65	1	74.447	13.22	0.002
AC	36.74	1	30.500	5.42	0.033
CB	43.39	1	40.282	7.15	0.017
ABC	5.51	1	5.507	0.98	0.337
Total error	90.11	16	5.632		
Total	2329.12	23			

F: Prueba fisher;

P: Prueba de significancia;

\*0.05 nivel de significancia



Empleando el software de minitab se realizo el analisis de varianza la Tabla 5.6. Muestra los valores de la p con un nivel de significancia de 0.05. Se determina que los factores con significancia es la concentracin de perxido, el pH y la concentracin de lignina.

Figura 5.2: Se graficaron los porcentajes de degradación de lignina.

Tabla 5.6: Análisis de varianza del diseño experimental  $2^3$  para la degradacion de lignina.

<b>Factor</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>g. l.</b>	<b>C. M.</b>	<b>F</b>	<b>Valor – p</b>
A: H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	594.00	1	844.52	59.37	0.000
B: pH	323.35	1	340.68	23.95	0.000
C: Lignina	1464.28	1	1462.04	102.79	0.000
AB	7.05	1	5.27	0.37	0.551
AC	24.64	1	26.84	1.89	0.188
CB	4.22	1	4.91	0.35	0.565
ABC	3.55	1	3.55	0.25	0.624
Total error	227.59	16	14.22		
Total	2648.68	23			

F: Prueba fisher;

P: Prueba de significancia;

\*0.05 nivel de significancia

## CONCLUSIONES

Se obtuvieron buenos resultados de degradación de lignina mediante el proceso fenton.asi mismo los resultados indicaron que el proceso fenton homogéneo fue mas eficaz respecto al heterogéneo. El mejor tratamiento encontrado para el

proceso homofenton fue el tratamiento 7 con: 30 mM de peróxido, pH 5, lignina 100 mg/L. Para el proceso heterofenton fue el tratamiento 3 con: 30 mM de peróxido, pH 3, lignina 50 mg/L.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y al CONACYT por el apoyo brindado.

## REFERENCIAS

- [1] Mahmood N., Yuan Z., Schmidt J. y Chunbao C. (2013). Production of polyols via direct hydrolysis of kraft lignin: Effect of process parameters. *Bioresource Technology*. 139, 1320.
- [2] Badar S., Farooqi I. H. (2012). Pulp and Paper Industry Manufacturing Process,

Wastewater Generation and Treatment. *Environmental Protection Strategies for Sustainable Development*. 398-422 pp.

[3] Rodríguez J.J., Casas J.A., Mohedano A.F., Zazo J.A. y Pliego G. (2010). Tecnologías de tratamiento de agua para su reutilización. Programa Consolider Tragua, España. pp 8-12.

[4] Fukuchi S., Nishimoto R, Fukushima M. y Qianqian Z. (2014). Effects of reducing agents on the degradation of 2, 4, 6-tribromophenol in a heterogeneous Fenton-like system with an iron-loaded natural zeolite. *Applied Catalysis B: Environmental*. 147, 411-419.

## 6. PHYSIOLOGIC CHARACTERIZATION OF ANAEROBIC STRAINS ISOLATED FROM EXTREME SITES

*Pérez-Bernal, María-Fernanda*<sup>1</sup>✉; *Souza-Brito, Elcia-Margareth*<sup>1</sup>; *Cuevas-Rodríguez, Germán*<sup>1</sup>; *Hirschler-Réa, Agnès*<sup>2</sup>; *Guyoneaud, Rémy*<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México, <sup>2</sup>Aix Marseille Université, Marsella, Francia, <sup>3</sup>Université de Pau et des Pays de l'Adour, Pau, Francia.  
e-mail: <sup>1</sup>✉[mfernanda9eros@gmail.com](mailto:mfernanda9eros@gmail.com)

### ABSTRACT

Soda lakes are highly alkaline and saline habitats containing sodium carbonate at great concentrations with extremely high pH, sediments at soda lakes usually contain abundant concentrations of sulfide indicating active sulfate reduction activity [1]. Sulfate-reducing bacteria (SRB) are obligate anaerobes characterized by their ability to reduce sulfates to sulfides with simultaneous oxidation of organic substrates [2]. The SRB play an important role in the development of bioremediation technologies for wastewater treatment, which has been studied extensively in the last decades [3,4]. 12 strains were isolated from the Parangueo Soda Lake, located in Valle de Santiago, Guanajuato, México. All Parangueo strains, were identified and belongs to the Deltaproteobacteria class from the phylum Proteobacteria, 11 strains belongs more specifically to the genera *Desulfonatronum* with 7 species described, most of them are close to *D. Thiodismutans* and *D. Lacustre*. The other strain is close to the genera *Desulfobotulus* with only 2 species described. After the construction of the phylogenetic 16S based tree, 2 interesting clusters were observed. Strains 18O\_PAR, and 19O\_PAR form an interesting cluster which could represent a new specie in the *Desulfonatronum* genera, while P1\_PAR also forms an interesting cluster which also could be a new specie into the *Desulfobotulus* genera.

The aim of this research was to characterize the strain 18O\_PAR which could represent a new specie, as well as to evaluate the sulfide production of the other SRB isolated as a potential tool for bioremediation of metal and metalloid contaminated water.

**Keywords:** *Anaerobic technology, sulfate reducing bacteria, alkaliphiles, bioremediation.*

### RESUMEN

Los lagos de soda son hábitats con una alcalinidad y salinidad muy altas, los cuales contienen elevadas concentraciones de carbonato de sodio y valores de pH extremadamente altos. Los sedimentos de estos lagos usualmente contienen grandes concentraciones de sulfuros, lo cual indica actividad sulfato reductora [1]. Las bacterias sulfato reductoras (BSR) son anaerobias estrictas, caracterizadas por su habilidad de reducir sulfatos a sulfuros con oxidación simultánea de sustratos orgánicos [2]. Las BSR juegan un papel muy importante en el desarrollo de tecnologías de bio-remediación para el tratamiento de aguas residuales, lo cual ha sido estudiado ampliamente durante las últimas décadas [3, 4]. En esta investigación se aislaron 12 cepas del lago alcalino de Parangueo, localizado en Valle de Santiago, Gto., México. Las cepas fueron identificadas y se encontró que éstas pertenecen a la clase Deltaproteobacteria del filo Proteobacteria; 11 de los aislados pertenecen más

específicamente al género *Desulfonatronum*, el cual tiene 7 especies descritas, la mayoría se encuentran muy cercanas a *D. Thiodismutans* y *D. Lacustre*. La otra cepa, se encuentra dentro del género *Desulfobotulus* con solo 2 especies descritas. Las cepas 18O\_PAR y 19O\_PAR forman un clúster interesante, el cual puede representar una nueva especie dentro del género *Desulfonatronum*, mientras que la cepa 22N\_PAR también puede ser una nueva especie dentro del género *Desulfobotulus*.

**Palabras clave:** *Tecnología anaerobia, bacterias sulfato-reductoras, alcalófilos, biorremediación*

## INTRODUCCIÓN

Normalmente, la vida en ambientes anóxicos es procariota en gran medida. Los procariontes han evolucionado no solo en cuanto al desarrollo de varias rutas fermentativas, sino también en la capacidad de acoplar la oxidación de sustratos orgánicos a la reducción de compuestos inorgánicos (diferentes al O<sub>2</sub>), para conservar energía para crecimiento anaerobio [5].

Los lagos alcalinos son hábitats naturales altamente alcalinos y salinos, los cuales contienen carbonato de sodio en altas concentraciones, esto asegura un pH estable y extremadamente alto. A pesar de estas condiciones extremas, los lagos alcalinos son usualmente altamente productivos en cuanto al desarrollo de comunidades microbianas. Las altas concentraciones de sulfato y la represión de las metanogénicas por altas concentraciones de sal, son la base de un ciclo del azufre muy activo [1].

Las BSR aisladas de estos lagos, son representadas por tres géneros de litotróficos *Desulfonatronum*, *Desulfonatronovibrio* y *Desulfonatronospira* (hasta ahora son los únicos géneros representativos de los *Desulfovibrionales* obtenidos en cultivos puros) y varias BSR utilizadoras de AGV's [1, 6].

El desarrollo de procesos biotecnológicos utilizando BSR para la remoción de

sulfatos y metales, ha sido estudiado ampliamente, obteniéndose altas tasas de sulfato reducción, sin embargo, estos procesos se han llevado a cabo sobre todo en condiciones con valores de pH neutros [6]. Es por esto, que el aislamiento y aplicación de BSR de sitios con condiciones de pH extremos resulta de particular interés, sobre todo para el tratamiento de efluentes ácidos de minería o corrientes con altas concentraciones de sales.

## OBJETIVO

Caracterizar fisiológicamente y evaluar la producción de sulfuro de cepas de BSR aisladas del lago alcalino del Rincón de Parangueo en Valle de Santiago, Guanajuato.

## METODOLOGÍA

### Identificación filogenética

La identificación filogenética se realizó mediante la amplificación del gen ADN<sub>r</sub> 16S de los aislados, posteriormente la secuenciación de los segmentos amplificados y su análisis y comparación con secuencias depositadas en una base de datos. La amplificación se realizó mediante la reacción de polimerasa en cadena (PCR), para lo cual se utilizaron los primers 63F y 1387R en una termocicladora bajo las siguientes condiciones de

amplificación: una iniciación de 10 minutos a 94 °C, seguido por 35 ciclos consistentes de una desnaturalización (45 s a 94 °C), alineamiento (45 s a 58 °C), extensión (1 min a 72 °C); y una extensión final de 10 min a a 72 °C. Los fragmentos amplificados fueron enviados a secuenciar por el método Sanger. Para el análisis de las secuencias, éstas fueron limpiadas con el programa BioEdith, y posteriormente comparadas con las secuencias depositadas en la base de datos de NCBI, en la cual se recuperaron secuencias de las especies más cercanas. Finalmente, se llevó a cabo el alineamiento de las secuencias de los aislados y de las especies cercanas y la construcción del árbol filogenético con el programa MEGA versión 6.06.

### Medio de cultivo

Una vez realizada la identificación de los aislados, se utilizó el siguiente medio, basado en el medio Desulfonatrum 813 de la DSMZ, el cual fue formulado con:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.2 g/L),  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.1 g/L),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0.25 g/L),  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (4 g/L),  $\text{KCl}$  (0.2 g/L),  $\text{NaCl}$  (15g/L),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (3.5 g/L), extracto de levadura (0.2 g/L), solución de oligoelementos de Widdel (1ml/L), solución de metales traza (1ml/L), resarzurina 0.1% (1ml/L). Se ajustó el pH del medio a 9 y se llevó a ebullición para remover el oxígeno disuelto, se enfrió en nitrógeno gas, y se dispensó en tubos Hungate con nitrógeno gas, finalmente se esterilizó durante 20 min a 121 °C. Antes de inocular se agregó solución de vitaminas V7 (100 $\mu\text{l}$ /5mL),  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  y lactato hasta alcanzar una concentración final de 0.4 g/L y 20 mM respectivamente.

### Determinación de sulfato

La determinación de sulfato y tiosulfato se realizó por cromatografía iónica con el cromatógrafo 761 Compact IC Metrohm y el 838 Advanced Sample Processor, con una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  3 mM como eluyente y una solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  75 mM como regenerante.

### Determinación de sulfuro

Este análisis se llevó a cabo con el método Cord-Ruwish (1985), el cual es un método turbidimétrico basado en la formación de  $\text{CuS}$ . Esto se realizó agregando 0.1 ml de muestra a 4 ml del reactivo de Cord-Ruwish (compuesto de 50 mM de  $\text{HCl}$  y de 5mM de  $\text{CuSO}_4$ ) y se procedió a leer inmediatamente en un espectrofotómetro UV-Visible Cary 50 a 480 nm.

### Caracterización fisiológica

La determinación de los óptimos de crecimiento para temperatura, salinidad y pH, se llevó acabo realizando cinéticas con diferentes temperaturas, concentraciones de  $\text{NaCl}$  y valores de pH respectivamente. Para encontrar los óptimos para cada parámetro se determinaron las  $\mu$  de crecimiento para cada valor estudiado, lo cual se obtuvo graficando el tiempo contra el logaritmo natural de las curvas de crecimiento ( $\text{DO}_{600\text{nm}}$ ) y determinando la ecuación de la recta en la fase de crecimiento exponencial, la pendiente de la recta corresponde a la  $\mu$  de crecimiento. Todas las pruebas se realizaron por duplicado y 2 réplicas.

## Ensayos de dismutación

El ensayo de dismutación se llevó a cabo como parte de la caracterización de la cepa 18O\_PAR, ya que se ha reportado que varias especies del género *Desulfonatronum* tienen esta capacidad metabólica única de ciertas BSR. La dismutación, que puede ser formalmente descrita como una fermentación inorgánica, consiste en la desprotonación del sulfito o tiosulfato [5]. Para esta prueba el inóculo fue lavado por centrifugación y resuspensión en medio libre de lactato y sulfato, bajo condiciones de esterilidad y con nitrógeno. Las bacterias lavadas, fueron inoculadas por duplicado bajo las siguientes condiciones: con tiosulfato/acetato; tiosulfato/CO<sub>2</sub>; lactato/sulfato (control para comprobar que las células se encontraban en buen estado después del estrés al que fueron sometidas); lactato (para descartar presencia de sulfato) y sulfato solamente para descartar presencia de lactato remanente en el inóculo).

## Caracterización fisiológica de la cepa 18O\_PAR

El estudio de la eco-fisiología consiste en determinar los extremos y óptimos de crecimiento de una cepa (pH, temperatura y concentración de cloruro de sodio). La cepa 18O\_PAR fue seleccionada para su caracterización y en su caso ser propuesta como cepa tipo en caso de representar una nueva especie. La composición del medio utilizado para llevar a cabo los estudios de caracterización se

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Identificación filogenética

En la Figura 6.1 se muestra el árbol filogenético de los aislados del lago de Paranguero, todas las cepas de Paranguero pertenecen a la clase Deltaproteobacteria del filo Proteobacteria. La gran mayoría se encuentra dentro de la familia Desulfonatronaceae del orden de los desulfovibrionales, el cual cuenta con un único género que es *Desulfonatronum* y 7 especies descritas.

El grupo mayor se encuentra muy cerca de *D. Thiodismutans* y *D. Lacustre* y las cepas 18O\_PAR y 19O\_PAR forman un clúster interesante que podrían ser nuevas especies dentro del género. PAR\_22N y PAR\_P1, por otro lado se encuentran dentro de la familia Desulfobacteraceae del orden de los Desulfobacterales, la especie más cercana pertenece al género *Desulfobotulus* con solamente 2 especies descritas. Este clúster se encuentra relativamente lejos de *D. Sapovorans* por lo cual también podría pertenecer a una nueva especie dentro del género *Desulfobotulus*.

basó en el medio de la DSMZ *Desulfonatronum* 813.

En la Figura 6.2 se muestran los perfiles de crecimiento de la cepa 18O\_PAR, para temperatura, salinidad y pH. La cepa crece en un rango de temperatura de 10 a 45 °C, con un óptimo de 35 °C; en cuanto a salinidad (g/L NaCl), ésta crece incluso en ausencia de NaCl, con rango de crecimiento de 0 hasta 90 g/L de NaCl, con un óptimo de entre 1 y 5 g/L. Aunque el gráfico da la impresión que la velocidad de es muy parecida de 1 a 25, la fase

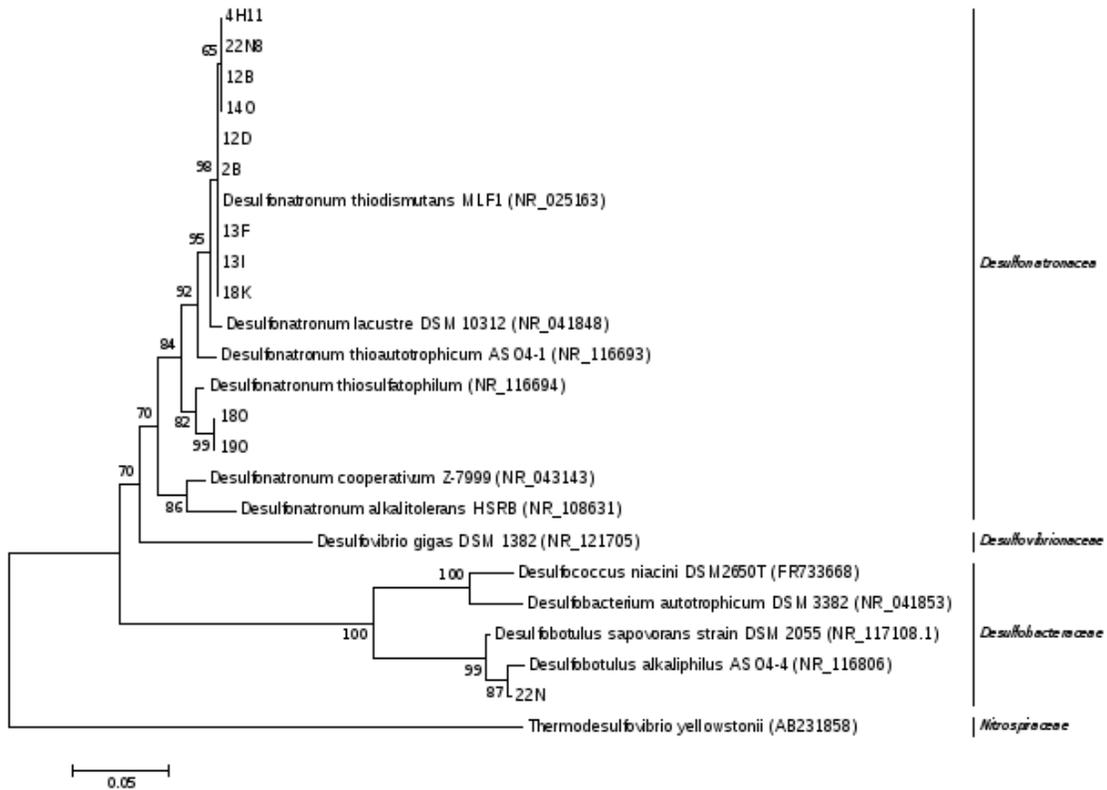


Figura 6.1: Árbol filogenético 16S de los aislados de Paranguero.

exponencial comienza más rápido de 0 a 5 g/L (60 h), mientras que conforme aumenta la concentración de sal, también lo hace el tiempo de inicio de la fase exponencial. Sorokin et al. (2011) han reportado que es típico que las alcalófilas de lagos de soda no requieran NaCl para crecimiento y, por lo tanto deben ser descritas como natronófilas más que como halófilas.

Para las pruebas de pH se utilizó el mismo medio, pero basándose en los resultados de salinidad; se utilizó el medio

con una salinidad menor (5 g/L). El medio se preparó sin buffer ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) con un pH de 6. El ajuste de pH se realizó posterior a la esterilización con soluciones estériles y anaerobias de  $\text{NaHCO}_3$  (10%) y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (8%). La cepa crece en un rango de 7.5 a 9.3, con un óptimo de 9. Lo cual difiere de *D. Thioautotrophicum* y *D. Thiosulfatophilum* 8.3–10.5 (9.3) 8.0–10.4 (9.5) respectivamente, las cuales son las especies más cercanas, dentro del género *Desulfonatronum*.

### Ensayos de dismutación

En la Tabla 6.1, se muestran los resultados de dismutación utilizando Tiosulfato/Acetato y Tiosulfato/ $\text{CO}_2$ . Las

pruebas de dismutación realizadas bajo las siguientes condiciones:

- Tiosulfato + Acetato: (+).

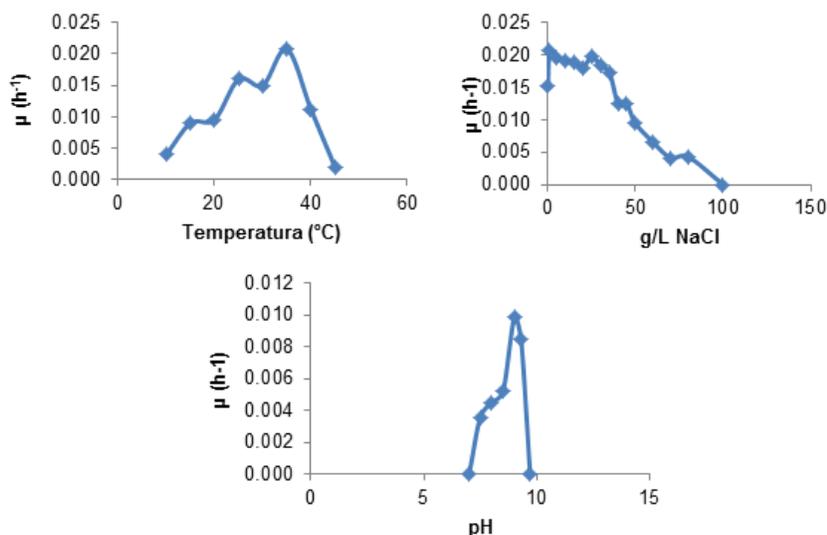


Figura 6.2: Caracterización fisiológica de cepa 180\_PAR.

- Tiosulfato + CO<sub>2</sub>: (++)
- Lactato + SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> :(+++)
- Lactato: prácticamente ausencia de crecimiento
- Sulfato: (-)

Entre paréntesis se muestra el crecimiento observado (nulo (-), poco (+), medio (++) , alto (+++). Aunque aparentemente hubo más de crecimiento con tiosulfato/ CO<sub>2</sub> que con tiosulfato/acetato; solamente hubo dismutación con acetato como fuente de carbono, ya que prácticamente todo el tiosulfato fue consumido para producción de sulfato y sulfuro, no así con CO<sub>2</sub>. El buen crecimiento observado en las condiciones usuales de cultivo (lactato/sulfato), demostró que el inóculo estaba en buenas condiciones y soportó en estrés de lavado.

Por otro lado, la presencia de lactato y sulfato se descartó al no observarse crecimiento.

Tabla 6.1: Dismutación de la cepa 180\_PAR

	Sulfato mM	Tiosulfato mM	Sulfuro mM
Tiosulfato/ Acetato	7.7	0.3	3.6
Tiosulfato +CO <sub>2</sub>	0.14	7.3	0.2

### Producción de sulfuro

En la Tabla 6.2, se muestran los resultados de producción de sulfuro de las cepas de Parangueo. Las cepas 13F, 4H11, 12B y 13I, fueron seleccionadas para evaluar las condiciones de producción de sulfuro, consumo de sulfato y substrato, ya que presentan mayor producción de sulfuro.

Tabla 6.2: Producción de sulfuro de las cepas de Paragueo

Cepa	Sulfato mM	Tiosulfato mM	Sulfuro
18O	2.4	18K	7.4
19O	3.6	12D	9.4
22N	10.1	12B	10.5
P1	1.0	2B	8.3
13F	11.0	9k-11	9.4
14O	8.0	17D	1.2
22N8	8.3	13I	11.5
4H11	9.9	11A-9	6.9

## CONCLUSIONES

La identificación y construcción del árbol filogenético de las cepas aisladas del lago alcalino de Paragueo, muestra 2 posibles especies nuevas; una dentro del género *Desulfonatronum* y otra dentro del género *Desulfobotulus*, la caracterización completa de estos aislados permitirá confirmarlo. Por otro lado, la aplicación de estas cepas es de especial interés, debido a que tienen potencial para tratar efluentes contaminados con sulfatos en condiciones de salinidades altas y con pH alcalinos.

## REFERENCIAS

[1] Sorokin *et al* (2011). Culturable diversity of lithotrophic haloalkaliphilic sulfate-reducing bacteria in soda lakes and the description of *Desulfonatronum thioautotrophicum* sp. nov., *Desulfonatronum thio-sulfatophilum* sp. nov., *Desulfonatronovib-*

*rio thiodismutans* sp. nov., and *Desulfonatronovibrio magnus* sp. nov. *Extremophiles*, 15, 391–401.

[2] Cao *et al.* (2009). Precipitation of valuable metals from bioleaching solution by biogenic sulfides. *Minerals Engineering* 22, 289–295.

[3] Muyzer y Stams (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature reviews, Microbiology*. 6, 441- 454.

[4] Hao *et al.* (2014). A Review of Biological Sulfate Conversions in Wastewater Treatment. *Water Research*, doi: 10.1016/j.watres.2014.06.043

[5] Rabus *et al.*, (2013). The prokaryotes: prokaryotic physiology and biochemistry. Chapter: Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes DOI 10.1007/978-3-642-30141-4. Springer Berlin Heidelberg.

[6] Souza *et al.*, (2015). Sulfate reduction in a hydrogen fed bioreactor operated at haloalkaline conditions. *Water Research* 68, 67-76.



## 7. AISLAMIENTO DE BACTERIAS ANAÉROBICAS DE FUMAROLAS DEL VOLCÁN PARICUTÍN

*Romero Nuñez, Victor-Manuel<sup>1</sup>; Souza-Brito, Elcia-Margareth<sup>2</sup>; Caretta, César-Augusto<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Dpto. de Biología, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México.

<sup>2</sup>Dpto. de Ing. Ambiental, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México.

<sup>3</sup>Dpto. de Astronomía, Universidad de Guanajuato, México.

e-mail: <sup>1</sup>[argentum\\_5s1@hotmail.com](mailto:argentum_5s1@hotmail.com), <sup>2</sup>[emsbrito@gmail.com](mailto:emsbrito@gmail.com)

### ABSTRACT

*In this paper a phylogenetic study of bacterial populations that develop within the Paricutin volcano fumaroles was performed. Using the technique of T-RFLP profile was visualized the main bacterial populations of this site. Also we did a phylogenetic study based of the similarity of 16S rDNA gene. The population study revealed variation in the diversity and the relative size of the populations of the Paricutin volcano system. Four anaerobic bacterial strains were obtained belong to the classes Bacilli and Clostridium. According to the literature, 2 of these strains (sulfate reducing bacteria) could have potential biotechnological application in the treatment of wastewater.*

**Keywords:** *Bioprospection, sulphate-reducing bacterial (SRB), biomat, T-RFLP (Terminal Restriction Length Polymorphism).*

### RESUMEN

*En el presente trabajo se realizó un estudio filogenético de las poblaciones bacterianas que se desarrollan dentro de las fumarolas del volcán Paricutín. Utilizando la técnica del T-RFLP se visualizaron los perfiles poblacionales del sitio. Para el estudio filogenético se utilizó la secuenciación del fragmento del gen ADNr 16S. El estudio poblacional reveló variación en cuanto a la diversidad y el tamaño relativo de las poblaciones del sistema del volcán Paricutín. Se lograron aislar 4 cepas bacterianas anaeróbicas, pertenecientes a las clases Clostridium y Bacilli. De acuerdo a la literatura, 2 de estas cepas (bacterias sulfato reductoras) podrían tener una potencial aplicación biotecnológica para el tratamiento de agua residual.*

**Palabras clave:** *Bioprospección, bacterias sulfato-reductoras (BSR), biomat, T-RFLP (Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción-Terminales)*

### INTRODUCCIÓN

Las bacterias y arqueas pueden habitar virtualmente cualquier superficie de la Tierra, incluyendo aquellas áreas en donde el entorno es extremadamente hostil [1]. La habilidad de persistir en toda

la biosfera se debe, en parte a su inigualable versatilidad metabólica y plasticidad fenotípica. Un elemento clave de esa adaptabilidad en la habilidad de posicionarse en un nicho en donde puedan propagarse [2].

Los ambientes resultantes de la activi-

dad volcánica son diversos, desde flujos termales ácidos hasta hábitats basálticos profundos en el océano. Estos ambientes volcánicos se encuentran ampliamente distribuidos sobre la Tierra y son de importancia geomicrobiológica para entender la diversidad y características de la vida microbiana que albergan. Éstos pueden ser utilizados como modelos para comprender más acerca de los patrones generales en la diversidad y distribución de los procariotas en el tiempo [3].

El volcán Parícutín se encuentra ubicado en el Campo Volcánico de Michoacán-Guanajuato (CVMG) y sobre la Franja Volcánica Trans-Mexicana (FVTM). El vulcanismo de la FVTM está relacionado con la subducción de las placas de Cocos y Rivera debajo de la fosa Mesoamericana en México [4]. El volcán apareció por primera vez el 20 de febrero de 1943 cerca del pueblo de San Juan Parangaricutiro, en el estado de Michoacán. La actividad volcánica se extendió de 1943 a 1952. El campo de lava se desarrolló en términos de 23 episodios eruptivos, con una duración de varios meses. La actividad fumarólica ha continuado hasta la actualidad [5].

Las bacterias sulfato reductoras (BSR) son microorganismos anaeróbicos que se extienden en ambientes anóxicos, donde utilizan el sulfato como aceptor final de electrones para la degradación de compuestos orgánicos, resultando en la producción de sulfuro y tienen una participación importante en los ciclos del azufre y del carbono [6]. Estas poblaciones bacterianas se han detectado sobre sedimento marino, ventanas hidrotermales, filtraciones de hidrocarburos, en volcanes de lodo y tapetes microbianos presentes en ambientes hipersalinos [6]. Una apli-

cación biotecnológica de las poblaciones de BSR consiste en la remoción de compuestos de azufre de las aguas y gases residuales o la precipitación de metales pesados en diferentes sistemas de biorreactores [6].

Con base en lo anterior, se realizó un estudio filogenético de bacterias anaeróbicas de las fumarolas del volcán Parícutín.

## METODOLOGÍA

### Muestreo

La bisprospección se realizó sobre el sistema del volcán Parícutín (19°29'35"N 102°15'04"O) situado en el estado de Michoacán, México. Específicamente se seleccionaron 2 fumarolas del volcán Parícutín (*Tex*: tapete externo; *Tin*: tapete interno) y 2 fumarolas de su satélite Sapichu (*SI*: sapichu uno; *SII*: sapichu dos). El material biológico obtenido consistió en tapete microbiano que se desarrollaba al interior de las paredes de la fumarola. La extracción se realizó utilizando cucharas de metal estériles, raspando la superficie de la roca. Su almacenamiento y pre cultivo se realizó en viales de vidrio estériles (~30 mL, sellados con tapones de Butil) utilizando medio de cultivo específico para BSR. Se desplazó el O<sub>2</sub> de los sistemas y se mantuvo una condición anaeróbica inyectando gas N<sub>2</sub>.

### Extracción de ADN total y análisis poblacional por T-RFLP

Parte del tapete microbiano colectado se utilizó para realizar la extracción de ADN genómico utilizando el kit comercial MoBio Power Soil<sup>®</sup> y siguiendo el protocolo que describe el fabricante. El mate-

rial genético obtenido se utilizó para realizar el estudio de poblaciones mediante la técnica del T-RFLP [7, 8]. Para esta técnica se utilizaron los oligonucleótidos 8F y 1489R y las enzimas de restricción *AluI* y *HinfI*. Los datos obtenidos fueron tratados según las metodologías descritas en Caretta y Brito (2011)[9].

### Cultivo y aislamiento de microorganismo anaeróbicos

Los medios de cultivo seleccionados para el crecimiento de microorganismos anaeróbicos fueron: medio Remy [10] y el medio Fude [11]. La técnica del *Roll Tube*, descrita por Hungate (1969) [12], fue empleada para el aislamiento de microorganismos anaeróbicos. La condición anaeróbica dentro de los sistemas y medios de cultivo se mantuvo con la inyección de gas N<sub>2</sub> semanalmente.

### Extracción de ADN y amplificación del gen ADNr 16S

A partir de los cultivos puros (microorganismos aislados) se realizó la ex-

tracción de ADN utilizando la técnica *La Porta CTAB* [13]. A partir del material genético obtenido se realizó la amplificación del fragmento del gen ADNr 16S utilizando los oligonucleótidos 8F, 536F y 1513R. Los amplicones obtenidos fueron enviados a la unidad de secuenciación del LANGEBIO, CINVESTAV Irapuato. Las secuencias obtenidas fueron editadas y analizadas mediante los programas Bioedit (v. 7.2.5) y MAFFT (en: <http://goo.gl/Egf7aY>).

### Análisis filogenético

Las secuencias consenso obtenidas fueron sometidas a un BLAST utilizando el portal en línea del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Utilizando cepas de referencia (cepas con mayor similitud a los aislados) se realizó la construcción del árbol filogenético a través del programa Mega 6 [14] y utilizando los modelos evolutivos de Jukes-Cantor (1969)[15] y Kimura-Ney 2 parámetros (2008)[8].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Figura 7.1: **Colecta de tapete microbiano sobre las fumarolas del volcán Parícutín.** Las características del tapete microbiano variaban de acuerdo a la profundidad de la fumarola. Las capas externas eran delgadas y sus coloraciones claras (verdes, amarillas y blancas). En las capas internas el grosor del tapete era mayor y sus coloraciones oscuras (café, rojas y negras).

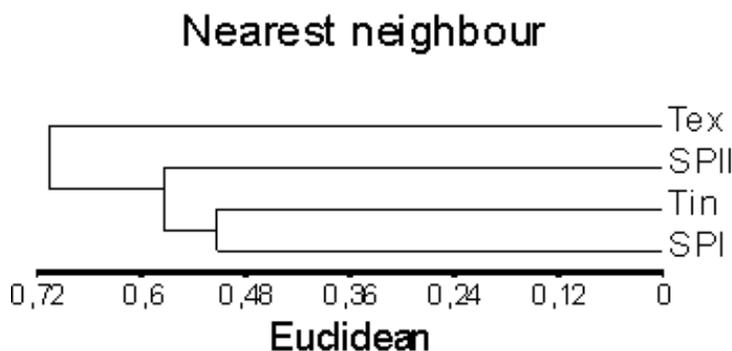


Figura 7.2: **Análisis clúster del T-RFLP.** De acuerdo con el T-RFLP, el tamaño de las poblaciones de los sistemas SI y SII es relativamente pequeño, sin embargo presentan mayor diversidad. Por el contrario, el tamaño de las poblaciones de los sistemas Tin y Tex es relativamente grande, sin embargo su diversidad es menor. De acuerdo al análisis clúster, los 4 sistemas presentan diferencias significativas. Los sistemas Tin y SPl presentan poblaciones similares, mientras que las poblaciones del Tex presentan la mayor diferencia con los demás sistemas.

Tabla 7.1: Caracterización biológica y molecular de las cepas aisladas.

Cepa*	SA <sup>(a)</sup>	MC <sup>(b)</sup>	M Cel <sup>(c)</sup>	TG <sup>(d)</sup>	ER <sup>(e)</sup>	SR <sup>(f)</sup>	Identificación Molecular	
							Sim.	Cepa Ref.
VPTFN01	Par.	MF	Bacilo	+	ES	NP	97%	<i>Clostridium swelfunanium</i>
VPTFN02	Par.	MF	Bacilo	+	ES	NP	94%	<i>Clostridium jejuense</i>
VPTFN03	Par.	MF	Bacilo	Variable	ENS	+	99%	<i>Dsulfotomaculum guttoideum</i>
VPTFN04	Par.	MF	Bacilo	-	ES	+	99%	<i>Paenibacillus azoredunces</i>

\* Código de laboratorio. VP: volcán Paricutín; T: tapete microbiano; F: medio Fude; N: nitrógeno.

<sup>a</sup> Sitio de aislamiento; Par. = Paricutín.

<sup>b</sup> Medio de cultivo; MF= Medio Fude.

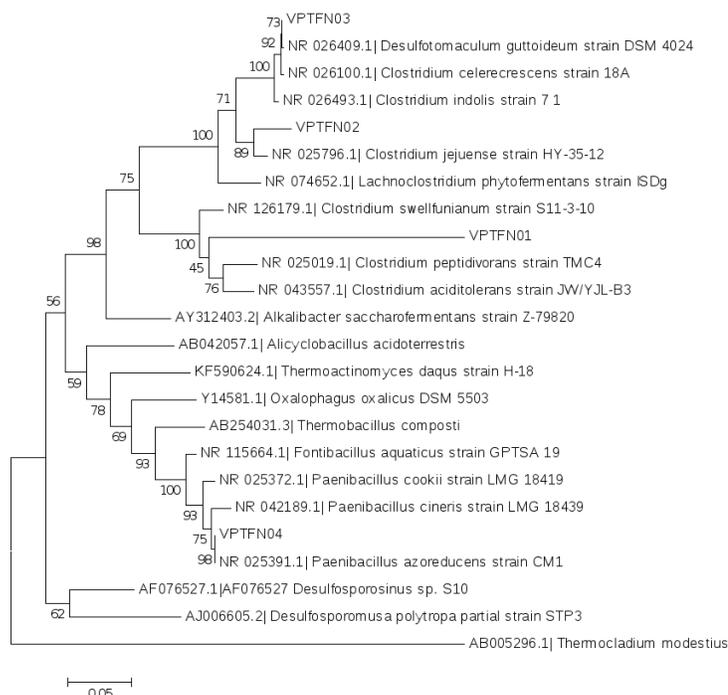
<sup>c</sup> Morfología celular.

<sup>d</sup> Tinción de Gram; (+) Gram positivo; (-) Gram negativo.

<sup>e</sup> Estructura de resistencia; ES= Espora; ENS=Endospora.

<sup>f</sup> Presencia de sulfato reducción; NP= no presenta; (+) Presenta.

**Figura 7.3: Análisis filogenético.** árbol filogenético de las cepas bacterianas aisladas. El árbol se construyó con el programa MEGA 6 comparando las secuencias del gen ADNr 16S de las cepas aisladas con las depositadas en el banco de datos en línea del NCBI. Después del alineamiento, las secuencias fueron editadas y se utilizaron 1,400 pb con el método de parsimonia y máxima verosimilitud (Bootstrap de 1000 veces) y el modelo de Kimura 2 parámetros (2008).



## CONCLUSIONES

Se logró el aislamiento de 4 cepas anaeróbicas del sistema del volcán Parícutín, las cuales se agruparon dentro del filo Firmicutes. Tres de ellas (VPTFN01, VPTFN02 y VPTFN03) se agruparon dentro de la clase Clostridia, mientras que la cepa VPTFN04 se agrupó dentro de la clase *Bacilli*. Se pretende continuar con estudios moleculares, metabólicos y bioquímicos que permitan identificar las cepas que presentaron similitud baja con las cepas de referencia. Así mismo se plantearán nuevos experimentos que permitan detectar los genes *dsrAB* en las cepas que presentaron sulfato-reducción para plantear una posible aplicación biotecnológica en el tratamiento de aguas residuales con presencia de metales pesados.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dirección de Apoyo a la Investigación y al Posgrado (DAIP) de la Universidad de Guanajuato. A la Universidad de Pau Et Des Pays de L'adour, Francia.

## REFERENCIAS

- [1] Barton, L. L. (2005). Physiological basis for growth in extreme environments. Structural and Functional Relationships in Prokaryotes, 348-393.
- [2] Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., & Brock, T. D. (2004). Biología de los microorganismos. Pearson Education/Prentice Hall.
- [3] Herrera, A., & Cockell, C. S. (2007). Exploring microbial diversity in volcanic environments: a review of methods in DNA extraction. Journal of Microbiological Methods, 70(1), 1-12.
- [4] Erlund, E. J., Cashman, K. V., Wallace, P. J., Pioli, L., Rosi, M., Johnson, E., & Granados, H. D. (2010). Compositional

- evolution of magma from Parcutin Volcano, Mexico: the tephra record. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 197(1), 167-187.
- [5] Urrutia-Fucugauchi, J., Alva-Valdivia, L. M., Goguitchaichvili, A., Rivas, M. L., & Morales, J. (2004). Palaeomagnetic, rock-magnetic and microscopy studies of historic lava flows from the Paricutin volcano, Mexico: implications for the deflection of paleomagnetic directions. *Geophysical Journal International*, 156(3), 431-442.
- [6] Muyzer, G., & Stams, A. J. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 6(6), 441-454.
- [7] Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H., & Forney, L. J. (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(11), 4516-4522.
- [8] Osborn, A. M., Moore, E. R., & Timmis, K. N. (2000). An evaluation of terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology*, 2(1), 39-50.
- [9] C. A. Caretta and E. M. S. Brito. In Sili-co restriction for identifying microbial communities in T-RFLP fingerprints. *Journal of Computational Interdisciplinary Sciences*, 2(2):123129, 2011.
- [10] Brito, E. M., Pin-Castillo, H. A., Guyoneaud, R., Caretta, C. A., Gutierrez-Corona, J. F., Duran, R., ... & Goi-Urriza, M. (2013). Bacterial biodiversity from anthropogenic extreme environments: a hyper-alkaline and hyper-saline industrial residue contaminated by chromium and iron. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(1), 369-378.
- [11] Fude, L., Harris, B., Urrutia, M. M., & Beveridge, T. J. (1994). Reduction of Cr (VI) by a consortium of sulfate-reducing bacteria (SRB III). *Applied and Environmental Microbiology*, 60(5), 1525-1531. 11
- [12] Hungate, R. E. (1969). A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. *Methods in microbiology*, 3B, 117-132.
- [13] CORTSPALOMECA, A. C., Mccauley, R. A., & Oyama, K. (2008). Isolation, characterization and crossamplification of polymorphic microsatellite loci in *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *Molecular ecology resources*, 8(1), 135-138.
- [14] Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., & Tamura, K. (2008). MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in bioinformatics*, 9(4), 299-306.
- [15] Jukes, T. H., & Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. *Mammalian protein metabolism*, 3, 21-132.
- [16] Souza et al., (2015). Sulfate reduction in a hydrogen fed bioreactor operated at haloalkaline conditions. *Water Research* 68, 67-76.

## 8. ESTUDIO FILOGENÉTICO DE CEPAS AISLADAS DEL LAGO-CRÁTER “RINCÓN DE PARANGUEO”

*Rivera-Martínez, Laura-Guadalupe*<sup>1✉</sup>; *Bertin, Pierre*<sup>2</sup>; *Caretta, César-A.*<sup>3</sup>; *Guyoneaud, Rémy*<sup>4</sup>; *Goni, Marisol*<sup>4</sup>; *Malm, Olaf*<sup>5</sup>; *Valerdi-Negreros, Julio-César*<sup>6</sup>; *Souza-Brito, Elcia-Margareth*<sup>6</sup>.

<sup>1</sup>Depto. de Biología, DCNyE, UG, <sup>2</sup>U. Paris Sud, Francia, <sup>3</sup>Depto. de Astronomía, DCNyE, UG, <sup>4</sup>U. Pau et de Pays de L' Adours, Francia, <sup>5</sup>Inst. Biofisica Carlos Chagas (LREPF-IBCC, URFJ), Brasil, <sup>6</sup>Ing. Ambiental, DI, UG.

e-mail: <sup>1✉</sup>[laguarima.91@hotmail.com](mailto:laguarima.91@hotmail.com)

### ABSTRACT

*Rincón de Parangueo is a Quaternary maar located in Valle de Santiago, Guanajuato inside the Michoacan-Guanajuato volcanic field in the central part of the Trans Mexican Volcanic Belt [2]. Rincón de Parangueo crater-lake is considered phreatomagmatic because was originated by the explosive interaction between magma and underground water. It can be deduced by its local geology that was formed by the eruption of six volcanoes. This maar is the largest crater lake in this volcanic region [2, 3]. In the last decades the crater lakes have presented dessication caused by the drawdown in the Valle de Santiago-Salamanca aquifer. Rincón de Parangueo crater lake water's showed high salinity, formation of carbonates/bicarbonates crystals and pH 9 to 12 (during the dry season) [1]. Moreover, geographic isolation and the physical-chemical parameters, the crater-lake is classified as an extreme habitat that allows the development of specialized microorganisms that tolerate osmotic stress. These extreme habitats are of biotechnological interest, for microbial diversity studies and for physiological studies in extreme conditions, due to the characteristics they can present [4]. In the present project the bioprospection of anaerobic microorganisms of Rincon de Parangueo crater-lake was performed, especially with regard to the isolation of Sulfate-Reducing Bacteria (SRB). In addition, the chemical (concentrations of Zn, Fe, Cu and Mn) and microbiological (bacterial biomass and exopolysaccharide 85.5% y 14.4% in weigh, respectively) characterization was made. And the total biodiversity was verified by NGS (MiSeq). The obtained isolates were related (by 16S rDNA gene sequencing) to *Tindallia californesis*, *Alkalibacterium psychrotolerans*, *Ectothiorhodospira variabilis* and *Clostridium bifermentans* species.*

**Keywords:** *Bioprospecting, biotechnology, SRB, NGS.*

### RESUMEN

El Rincón de Parangueo es un maar Cuaternario localizado en Valle de Santiago, Guanajuato dentro del Campo Volcánico Michoacán-Guanajuato, en la parte central de la Faja Volcánica Transmexicana (FVTM). El cráter lago Rincón de Parangueo es considerado freatomagmático porque fue originado por una interacción explosiva entre el magma y el agua subterránea. Se puede deducir por su geología local que fue formado por la erupción de seis volcanes. Este es el cráter lago más grande en la región volcánica FVTM [2, 3]. En

las últimas décadas los cráteres lagos han presentado desecación causada por la sobreexplotación del acuífero del Valle de Santiago- Salamanca. La química del agua del lago cráter del Rincón de Parangueo muestra una alta salinidad, formación de cristales de carbonatos/bicarbonatos y un pH elevado de 9 a 12 (durante la estación seca) [1]. Sin embargo, el aislamiento geográfico y los parámetros físicoquímico, el cráter lago es clasificado como un habitat extremo que permite el desarrollo de microorganismos especializados que toleran el estrés osmótico. Estos hábitats extremos son de interés biotecnológico, la diversidad microbiana y las características fisiológicas que presentan [4]. En este proyecto se abordó la biospección de microorganismos anaeróbicos del cráter lago Rincón de Parangueo, especialmente el aislamiento de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR). Además, se realizó la caracterización química (concentraciones de Zn, Fe, Cu y Mn) y microbiológica (biomasa bacteriana y exopolisacáridos, 85.5% y 14.5% en peso, respectivamente). La biodiversidad total fue analizada por NGS (MiSeq). Los aislados obtenidos fueron identificados (por la secuenciación del gen 16S ADNr) a *Tindallia californesis*, *Alkalibacterium psychrotolerans*, *Ectothiorhodospira variabilis* y *Clostridium bif fermentans*

**Palabras clave:** *Biospección, biotecnología, BSR, SNG*

## INTRODUCCIÓN

El agua de los lagos de cráteres en regiones subáridas y templado-áridas muestra una combinación de salinidad y pH elevados [1], lo cual hace que estos cuerpos acuáticos sean clasificados como hábitats extremos, en donde sólo pueden habitar microorganismos especializados llamados extremófilos [4]. De acuerdo a las condiciones en un hábitat extremo se tiene la posibilidad de encontrar microorganismos con una aplicación biotecnológica, por ejemplo, en la transformación de metales y de metaloides. Este ambiente es ideal para el desarrollo de las bacterias sulfato reductoras (BSR), muy importantes desde un punto de vista ecológico para la degradación de la materia orgánica. Estos microorganismos normalmente son organotróficos, con una gran plasticidad metabólica, o sea, pueden utilizar variedad de compuestos orgánicos como el piruvato, acetato, glicerol, lactato, ácidos orgánicos, etc. Además, en condiciones anaeróbicas, utilizan compuestos

de azufre como aceptores de electrones (por ejemplo, el  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ,  $\text{S}^0$ , entre otros). Los microorganismos son omnipresentes en el planeta, siendo encontrados en ambientes considerados extremos. A pesar de su omnipresencia, en el laboratorio son muy difíciles de ser cultivados e incluso, se estima que tan solo 1% de los microorganismos del suelo son cultivables en laboratorio, lo que limita el conocimiento de éstos. Por otro lado, actualmente existen herramientas moleculares que nos permite acceder a esa diversidad, como por ejemplo, la secuenciación masiva de los genes de una muestra ambiental. La ecología microbiana es poco explotada en México, aún menos de los ambientes extremos, destacándose algunos trabajos de Cuatreciénegas, lago Achichica y el lago de Texcoco. El lago cráter de Parangueo, también es un ambiente extremo y carece de información respecto de la biodiversidad microbiana presente en el sitio. Una descripción adicional, el interior del lago cráter Rincón de Parangueo albergan estromatolitos, y actualmente tiene riesgo de ser destruido

por las actividades antropogénicas y a la subsidencia del cráter [4]. Así, el objetivo del presente trabajo fue realizar un estudio de metagenómica del gen ADNr 16S por medio de la secuenciación masiva (Illumina MiSeq) para estudiar la biodiversidad bacteriana de los sedimentos superficiales de los lagos del cráter de Rincón de Parangueo. Adicionalmente, se aislaron BSR de este sitio y se realizó un estudio filogenético de estas cepas.

## METODOLOGÍA

### Colecta y caracterización de las muestras

En septiembre de 2013 se colectaron muestras de sedimento superficial y del agua del lago cráter del Rincón de Parangueo (20°25' N - 101°15' W y 1700 m s.n.m) Valle de Santiago, Guanajuato, Mexico. Se determinaron in situ los parámetros fisicoquímicos (conductividad eléctrica, pH, temperatura, oxígeno disuelto y salinidad) con instrumentos de campo. Para el análisis de los nutrientes [nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>), nitrato (N-NO<sub>3</sub>) y fosfatos (P-PO<sub>43</sub><sup>-</sup>)] se utilizó el kit comercial HACH®. Los metales se extrajeron por digestión ácida, y se determinaron por espectrofotometría de absorción atómica de flama (Malm y col, 1989). Se determinó la actividad microbiana activa a partir de determinación de las enzimas esterases (hidrólisis de diacetato de fluoresceína, FDA).

### Aislamiento de las BSR

Se utilizó un medio mínimo mineral anaeróbico enriquecido con agua del sitio (filtrada y esterilizada a un proporción de 1:1), suplementada con FeSO<sub>4</sub> y S<sup>0</sup> (acep-

tor de electrones), con lactato, piruvato, glicerol y acetato, como fuentes de carbono. Se adicionó al medio resazurina como indicador de oxidación-reducción. Se mezcló la muestra de agua del lago cráter del Rincón de Parangueo con el medio de cultivo en proporción 1:1 y de este medio de cultivo se le añadió al pre cultivo; después de un pre-cultivo (15 días de incubación) fue utilizado como inóculo preparando diluciones seriadas con medio de cultivo, las cuales se aplicaron en Roll- Tube para el aislamiento de las BSR anaeróbicas estrictas.

### Extracción de DNA

Se extrajo DNA de las muestras de suelo con el Kit comercial MoBio y de las bacterias aisladas con el kit Wizard® Genomic DNA. Estos DNAs fueron utilizados como templado para amplificar el gen ADNr 16S por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando los oligonucleótidos 8F (5'- GGA TCC AGA CTT TGA TYM TGG CTC AG -3') y 1513R (5'- ATC GGY TAC CTT GTT ACG ACT TC -3'). Las condiciones de amplificación se describen en Rivera-Martinez et al, (2014)[7]. El amplicón obtenido de los aislados se envió a secuenciar en el LANGEBIO-CINVESTAV, mientras que el DNA de las muestras de suelo se envió al Laboratorio de TANDEM (INRA, INP en Toulouse, Francia) para la secuenciación masiva del fragmento V3V4 del gen ADNr 16S.

### Secuenciación masiva

El DNA total de las muestras de los sedimentos superficiales fue extraído con el kit comercial PowerSoil MoBio® Labo-

ratories; este DNA se utilizó como templado para la amplificación por PCR del gen ADNr 16S con los oligonucleótidos 8F y 1513R. Este, después de purificado, fue utilizado como templado para amplificar la región V3V4 con los oligonucleótidos 515F y 785R, éstos recibieron sus adaptadores para ser secuenciados en la plataforma Illumina MiSeq. Este análisis se realizó en el Laboratorio de TANDEM (INRA, INP Toulouse, Francia). Para el análisis de los datos se utilizaron los software libres Fastqc (<http://goo.gl/6TUqD>). Luego, se utilizó un conjunto de líneas de comando en secuencia (pipeline) desarrollado por el M. Pierre Bertin de la Université de Paris Sul (comunicación personal del asesor). Para procesar el análisis y el tratamiento de estos datos, la primera etapa consiste en un análisis previo con el *Userach* (Robert C. Edgar<sup>©</sup>). Se aplicó un filtro para eliminar las secuencias quiméricas, comparando nuestras secuencias con las del banco de datos gold.fa. Después, con la tabla de las OTUs resultantes, se realizó un análisis filogenético comparando (por BLAST) con los datos del NCBI para encontrar un perfil de repartición de la biodiversidad.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El cráter lago de Paranguero se caracteriza como extremo de pH, salinidad y conductividad (10, 22.35 g/L y 33.3 mS/cm, respectivamente). La concentración de metales varió entre no detectable para el Zn, hasta 500 mg/g de Fe (Rivera-Martínez et al 2014[7]). El Numero Mas Probable (NMP) de los sedimentos superficiales fue de  $2 \times 10^3$  cel.ml<sup>-1</sup> y la actividad bacteriana de  $9.5$

$\times 10^3$   $\mu$ g de FDA hidrolizado min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> de muestra. Las muestras presentaron un 86.5% en peso de humedad, 85.5% en peso de biomasa celular y 14.4% de exopolisacáridos. Con respecto a la concentración de los nutrientes se determinó una concentración de 0.25 mg/L de N-NH<sub>3</sub>, 0.265 mg/L N-NO<sub>3</sub> y 0.300 mg/L de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>. Basado en estos datos se puede concluir que el Lago de Paranguero es oligotrófico. Posiblemente, la entrada de nutrientes para este puede provenir desde el deslave de las lluvias o por la actividad antropogénica.

La secuenciación masiva (Illumina MiSeq) de los sedimentos superficiales de los lagos produjo 35 061 reads: 20 526 reads para la muestra LG y 14535 reads para LP, los cuales, después de aplicar el *Pipeline* desarrollado por Pierre Bertin (aún no publicado), se redujo a 18 994 reads para LG y 14 466 reads para LP. En este tratamiento se agruparon las secuencias idénticas y se eliminaron las secuencias que aparecen una vez (single-tones) y las quimeras, las últimas comparando nuestros resultados con los datos del *gold.fa* (<http://goo.gl/NUAxxn>). Finalmente, las secuencias resultantes con similitud 97% se agruparon como una unidad taxonómica (OTU's), obteniendo 353 OTUs. De estas mismas muestras, se logró aislar 5 cepas bacterianas anaeróbicas, las cuales, se identificaron similares (Figura 8.1) a las especies *Tindallia californensis* (99% de similitud), *Alkalibacterium psychrotolerans* (99% de similitud), *Ectothiorhodospira variabilis* (99% de similitud) y *Clostridium bifermentans* (99% de similitud).

Comparando la diversidad bacteriana de los dos lagos estudiados, y juntando en un único grupo las poblaciones minori-

tarias del <1% de abundancia relativa. Se pudo observar que estos lagos presentan pequeña diversidad total (6 clases en el lago grande y 8 en el lago pequeño), donde 5 de éstas son comunes a los dos la-

gos (Figura 8.2). Estos datos no difieren respecto a la clasificación de los géneros (9 y 11, respectivamente para lago grande y lago pequeño).

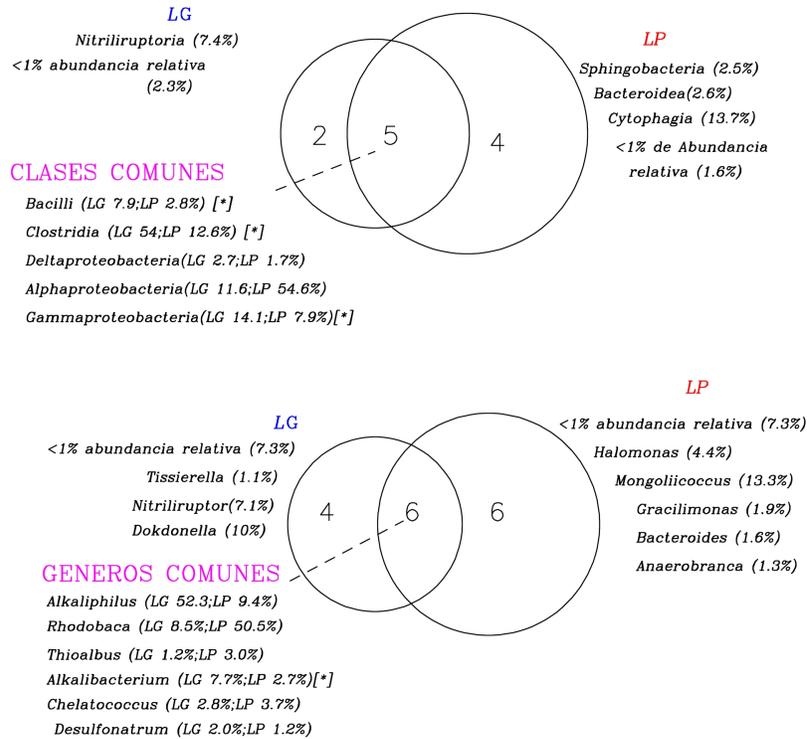


Figura 8.1: Diversidad bacteriana del lago grande (LG) y pequeño (LP) del cráter de Rincón de Parangueo. Se realizó la secuenciación masiva de las muestras y después del análisis se obtuvieron las distintas clases taxonómicas y su abundancia relativa. En la parte superior se construyó el diagrama de Venn con los datos de las clases y en la parte inferior con los datos de los géneros; en ambos casos, entre paréntesis se indica el porcentaje relativo de cada uno de éstos.

En el diagrama de Venn se ilustra que dentro de la diversidad bacteriana de la muestra de sedimento superficial, el grupo más abundante pertenece al filo Proteobacteria (LG 52.7%; LP 58.3%) y el segundo grupo es el filo Firmicutes (LG 61.9%; LP 15.4%).

El primero de éstos, el filo Proteobacteria, está dividido en cinco clases (alfaproteobacteria, betaproteobacteria, gammaproteobacteria, deltaproteobacteria y épsilonproteobacteria). Sin embargo, los datos obtenidos indicaron que en el lago de Parangueo no se encuentran

presentes las clases betaproteobacteria y épsilonproteobacteria. Todos los miembros de este grupo son gram negativos, y tienen distintas capacidades metabólicas (quimiolitotrofia, quimiorganotrofia y fototrofia) y fisiológicas (aeróbicos, micro aerofilos y aeróbicos facultativos). Dentro del filo se encuentran el género *Ectothiorhodospira*, perteneciente al grupo de bacterias púrpuras del azufre y a la clase Gammaproteobacteria, las cuales realizan la fotosíntesis anoxigénica y contienen los pigmentos como la bacterioclorofila y carotenoides. Estos pigmentos son los que dan el color impresionante (rojo, morado y café) normalmente observados en lagos salinos, alcalinos y salmueras. Este color ha sido observado en el lago de Paranguero. Completando este resultado se ha logrado aislar una cepa bacteriana (**PSNZ04**) similar a *Ectothiorhodospira variabilis* que a su vez pertenece a familia Ectothiordospiraceae, la cual presentó una abundancia relativa 2.4% en LG y 3.1 % en LP. Desde un punto de vista biotecnológico, esta cepa

La familia Clostridiaceae (está dentro del orden Clostridiales, de la clase Clostridia) son anaerobios obligados y usualmente son gram positivos, las especies termófilas son especialmente gram negativas. Puesto que muchas especies de Clostridiaceae forma esporas resistentes al calor y a la desecación, los microorganismos de esa familia son omnipresente en distintos hábitats con dichas características; sin embargo, hay algunas especies que sólo se desarrollan en su hábitat, bajo condiciones muy específicas. Como se esperaba, esta familia tuvo representatividad dentro de la biodiversidad bacteria-

es interesante ya que es similar a especímenes reconocidas por su capacidad en la transformación de metales pesados e incluso se ha reportado [2] la presencia de una especie de *Ectothiorhodospira* con capacidad de transformar el arsenito a arseniato acoplado con el crecimiento autotrófico (fijación de CO<sub>2</sub>).

El segundo grupo bacteriano más representativo en las muestras de sedimento pertenece al filo Firmicutes, representados por dos (Bacilli y Clostridia) de las tres clases de ese filo. El filo firmicutes es fenotípicamente diverso, donde es común observar microorganismos capaces de formar endosporas resistentes al calor. Existen aerobios facultativos y anaerobios estrictos, algunos son termófilos y/o halófilos. Más de ellos, son quimiorganótrofos, unos pocos son fotoheterótrofos.

La mayoría de los microorganismos de la clase Bacilli (separado por dos órdenes: Bacillales y Lactobacillales) es gram positivo, pero hay algunos que son gram negativos.

na total de las muestras, con 52.3% en LG y 9.5% en LP. Además, se aisló una cepa (**PSNZ02**) relacionada a esta familia perteneciente al género *Tindallia*. Respecto a éste, sus miembros son anaerobios estrictos u organótrofos, son capaces de degradar compuestos orgánicos de bajo peso molecular, los cuales son usados por los anaerobios secundarios (metanógenos, sulfato reductores y homoacetogénicos) en la cadena trófica ecológica, motivo por lo cual son considerados descomponedores primarios. Por ejemplo, en la descomposición de la materia orgánica realizada por *Tindallia ca-*



por estos microorganismos a una forma reducida soluble.

## CONCLUSIONES

Los lagos del cráter de Rincón de Parangueo son hipersalinos e hiperalcalinos, albergan diversidad bacteriana relativamente baja. Destacan los filos Proteobacteria y Firmicutes, con especies reconocidas como extremófilas alcalófilas y alcalinas. Se obtuvieron 5 aislados anaerobios similares a las *Tindallia californensis*, *Alkalibacterium psychrotolerans*, *Ectothiorhodospira variabilis* y *Clostridium bifermentans*.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr César Caretta y al maestro Pierre Bertin por su apoyo y asesoría en el tema de bioinformática y a mis compañeros del laboratorio. Al financiamiento de la beca (C0011-CONACYT-ANR-188775).

## REFERENCIAS

- [1] Armienta MA et al. (2008) J. Volcanology and Geothermal, 178(2): 249-258.
- [2] Budinoff, C. R et al (2008). The ISME journal, 2(3), 340-343.
- [3] Cifuentes RMU et al (1999). Geofísica Internacional Vol., 38, Num. 4, pp. 217-230
- [4] Gómez JJA, et al (2013). Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana, Volume 65, núm 1, 2013, p. 169-188
- [5] Jiménez B., Marín L. Edición Digital, Academia Mexicana de Ciencias, (2005). México, DF. Pp: 99-116.
- [6] Sorokin, D. Y et al (2014). Extremophiles, 18(5), 791-809.
- [7] Rivera-Martínez, L. G., et al. (2014). In Aplicaciones en Bioingeniería Ambiental, 2 ed., U. Guanajuato, ISBN: 978-607-441-276-5.
- [8] Yumoto, I., Hirota et al. (2004). International journal of systematic and evolutionary microbiology, 54(6), 2379-2383.
- [9] Wang, C. C., Chang et al (2003). Journal of Biotechnology, 102(1), 83-92.
- [10] Malm, O. et al (1989). Environmental Technology Letters, 10(7):675-680.

## 9. ESTUDIO DE BACTERIAS MAGNETOTÁCTICAS EN LAGOS–CRÁTER: CÍNTORA Y LA JOYA

*Zatarain-P., Eva-Cecilia<sup>1</sup>✉; Pérez-Vázquez, Miriam-Evelia<sup>2</sup>; Valerdi-Negreros,  
Julio-César<sup>3</sup>; Brito-S., Elcia-Margareth<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Unidad Académica Escuela de Biología, Universidad Autónoma de Sinaloa – Sinaloa, México; <sup>2</sup>Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), Universidad de Guadalajara – Jalisco, México; <sup>3</sup>Ingeniería Ambiental (DI-GCT), Universidad de Guanajuato – Guanajuato, México.

*Calzada de las Américas y Universitarios, s/n, Ciudad Universitaria, 80040  
Culiacán Rosales, Sinaloa. Teléfono: 01 667 713 4043 y 53  
e-mail: <sup>1</sup>✉[ec.zatarain@gmail.com](mailto:ec.zatarain@gmail.com)*

### ABSTRACT

*The Trans-Mexican Volcanic Belt (TMVB) is a diverse and complex volcanic arc crossing the center of México, some Crater Lakes are found between its formations and there are more than 30 of these only in the State of Guanajuato, among them Las Siete Luminarias [7]. We studied two crater lakes of the TMVB: Cíntora and La Joya; Cíntora is one of the less studied lakes of the Valle de Santiago, outside this region there is La Joya, both lakes are alkaline [2] for this reason, both lakes can be considered extreme environments. Sediment samples were collected from these Crater Lakes on July of 2015 to observe the presence of Magnetotactic Bacteria (MTB). The pH, salinity and temperature were measured *in situ*, and samples were taken for physicochemical and microbiological characterization. The physicochemical parameters measured were PO<sub>4</sub>, NO<sub>3</sub> and NH<sub>3</sub> and the microbiological ones were measured by the counting of Colony-Forming Unit and Most Probable Number. To verify the presence of Magnetotactic Bacteria we applied an electromagnetic field to concentrate the microorganisms in the north pole of the field, this movement was given for the presence of magnetosomes which they use to align and swim along the geomagnetic field lines; once concentrated the microorganism were observed by optic microscopy proving the presence of MTB on both lakes.*

**Keywords:** *Environmental bioprospecting, Magnetotactic Bacteria, Magnetoaerotaxis, Crater-Lake.*

### RESUMEN

El Cinturón Volcánico Transmexicano (CVTM) es un arco volcánico variado y complejo que atraviesa el centro de México. Entre sus formaciones se encuentran los Lagos Cráter, habiendo más de 30 en el Estado de Guanajuato entre ellos los que conforman Las Siete Luminarias en el Valle de Santiago [7]. Estudiamos dos Lagos Cráter del CVTM: cíntora y la Joya, Cíntora está ubicado en el valle de Santiago y es uno de los Lagos Cráter menos estudiados, fuera de esta región está La Joya con la que Cíntora comparte la característica de ser alcalinos [2], por lo que pueden ser considerados como ambientes extremos. En Julio de 2015 se colectaron muestras de sedimentos de estos Lagos Cráter para observar la presencia de Bacterias Magnetotácticas. Se midió pH, salinidad y temperatura y

nutrientes *in situ*, y se tomaron muestras para la caracterización fisicoquímica y microbiológica. Los parámetros fisicoquímicos medidos fueron  $\text{PO}_4$ ,  $\text{NO}_3$  y  $\text{NH}_3$  mientras que los microbiológicos fueron por conteo de Unidad Formadora de Colonias y Número Más Probable. Para observación de las Bacterias Magnetotácticas (MTB) se aplicó un campo electromagnético para concentrar a los microorganismos en el polo norte de éste, este movimiento se dio por la presencia de magnetosomas en las MTB los cuales utilizan para alinearse y nadar a lo largo de las líneas del campo geomagnético; una vez concentrados, los microorganismos se observaron por microscopía óptica comprobando así la presencia de MTB en los lagos estudiados.

**Palabras clave:** *Bioprospección ambiental, Bacterias Magnetotácticas, Magnetoaerotaxia, Lagos-Cráter.*

## INTRODUCCIÓN

El Cinturón Volcánico Transmexicano (CVTM) es un arco volcánico variado y complejo cuyo sector central atraviesa el Estado de Guanajuato. Entre sus variadas formaciones volcánicas se encuentran los Lagos Cráter [7], que son lagos formados en la caldera de un volcán. Entre los lagos cráter destacan los denominados Maar, que se formaron por una erupción explosiva al entrar en contacto el magma del volcán con el agua del manto freático [2]. En el estado de Guanajuato existen más de 30 de estas formaciones [7], siendo las más conocidas las que conforman las Siete Luminarias en el Valle de Santiago; En este trabajo se estudiaron dos Lagos Cráter: Cíntora, que forma parte de las Siete Luminarias y La Joya, en Yuriria. Lago Cíntora es uno de los lagos menos estudiados biológica y fisicoquímicamente. Ambos sitios son alcalinos y salinos, por lo que se considerarían con condiciones extremas [2]. Sus diferencias radican en que Cíntora es un lago intermitente, cuya permanencia depende prácticamente de la temporada de lluvias, este sitio no se encuentra muy perturbado por el hombre. Mientras que la Joya es un lago que es mantenido artificialmente, es una zona recreacional por

lo que hay un alto impacto antropogénico [3, 1]

Las Bacterias Magnetotácticas (MTB, del inglés: *Magnetotactic Bacteria*) son procariontes cosmopolitas acuáticas, mesófilas que prefieren hábitats con pH neutro, pero literatura reciente ha reportado MTB en sitios extremos [5]. Su característica principal es la presencia de magnetosomas que son vesículas formadas por una bicapa de fosfolípidos que envuelven un cristal intracelular de mineral de hierro magnético (Magnetita o Greigita) de dominio único y se encuentran alineados dentro de las células formando una o varias cadenas [6].

La presencia de las MTB, sorpresivamente no depende de una alta concentración de hierro sino de la existencia de una Zona de Interfase Óxica-Anóxica (OAI del inglés: *Oxic-Anoxic Interface*) [5] generalmente localizada en la interfase agua-sedimento, que es consistente con el estilo de vida microaerofílico a anaerobio de estas bacterias [8]. Para encontrar la OAI en una columna de agua una bacteria no magnetotáctica tendría que “buscar” en las tres direcciones del espacio, sin embargo, gracias a que, en las bacterias magnetotácticas la célula entera se comporta como un imán por el alineamiento de los magnetosomas, la

célula sólo tiene que nadar a lo largo de las líneas del campo magnético terrestre, de esa manera reduce la búsqueda de la zona OAI a una sola dimensión espacial, este fenómeno es conocido como Magnetoerotaxia [6]. Las MTB del hemisferio norte se orientan buscando el norte geomagnético, mientras que en el sur predominan las que buscan el sur, alejándose de la superficie [4].

Las MTB posiblemente juegan un importante papel ecológico en muchos sedimentos, como el ciclado biogeoquímico de nutrientes, magnetización de los sedimentos [8]. La magnetita de origen biológico tiene varias aplicaciones por lo que se ha estimulado su estudio, incluso botecológico, por ejemplo, se propone que sea utilizada como biomarcador ya que se conserva mejor en los sedimentos a comparación de otros marcadores biológicos; o como nanopartícula magnética [6] sin embargo su explotación comercial no se ha logrado por las dificultades que implica su cultivo.

A pesar de su abundancia, el aislamiento y cultivo de estas bacterias es problemático sobre todo por su estilo de vida. Las MTB dependen de patrones complejos de gradientes químicos verticales y de óxido-reducción (redox), que son difíciles de mimetizar en condiciones de laboratorio. Ya que no se conocen condiciones de crecimiento o medios estrictamente selectivos para el cultivo de MTB, la separación efectiva de las células magnetotáticas y de los contaminantes no magnéticos es crucial para su aislamiento [8].

## OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue observar y cultivar MTB obtenidas de los Lagos Cráter Cíntora y La Joya.

## METODOLOGÍA

### Muestreo

Los muestreos se realizaron en dos Lagos Cráter del Estado de Guanajuato, La Joya (Coordenadas UTM 20.205635 N, -101.129579 W) y Cíntora (20.356447 N, -101.213270 W). En Cíntora en el día de muestreo se observó la presencia de dos lagunas, que fueron denominadas Laguna Chica y Laguna Grande. Para ambos sitios se midieron los mismos parámetros fisicoquímicos *in situ*, pH, salinidad y temperatura con instrumentos de campo. También, en cada sitio, se tomaron muestras de sedimento y agua para completar la caracterización fisicoquímica y realizar la caracterización microbiológica y la observación de MTB.

En un frasco estéril de vidrio y boca ancha con capacidad de 1 L se colectó sedimento, éste se tomó de una zona con aproximadamente 20 cm de profundidad (a partir de la superficie del agua), llenando el frasco a  $\frac{3}{4}$  con sedimento y  $\frac{1}{4}$  con agua del sitio para que posteriormente se formara la interface sedimento-agua. Este frasco se destinó para las pruebas con MTB. En el laboratorio se envolvió en papel aluminio y se almacenó a temperatura ambiente en oscuridad con la tapadera sobrepuesta.

En un tubo FALCON<sup>®</sup> estéril con capacidad de 50 mL se tomó muestra del sedimento superficial y añadió agua del sitio. Estos tubos se destinaron a pruebas

microbiológicas por lo que todo el tiempo se aseguró un ambiente de esterilidad logrado con la flama de un soplete portátil y el uso de guantes de látex. Aquél se envolvió con papel aluminio y se almacenó a 4 °C.

Se colectó agua del sitio en botellas de plástico limpias. Esta agua posteriormente fue esterilizada por lo que un ambiente de esterilidad no era requerido al momento de la colecta. Como Laguna Chica de Cíntora era poco profunda, sólo se colectó agua de Laguna Grande.

### **Caracterización química y microbiológica**

Se realizó el análisis de los nutrientes Nitrógeno Amoniacal (NH<sub>4</sub>), Fósforo (PO<sub>4</sub>) y Nitratos (NO<sub>3</sub>) con el kit comercial HACH<sup>®</sup> Color Cube Test, siguiendo las instrucciones proveídas por el kit y la determinación se hizo por espectofotometría. Las pruebas microbiológicas que se realizaron fueron Unidad Formadora de Colonias (UFC) en placa y Número Más Probable (NMP). Estas pruebas son para el cultivo de bacterias mesófilas aerobias y no revelan la presencia de MTB pero sí el estado de la comunidad microbiana del sitio. Hay que remarcar que se realizan dentro de las primeras 24 horas inmediatas al muestreo para obtener las condiciones reales del sitio y evitar contaminación.

### **Aislamiento, observación y cultivo de MTB**

Para el aislamiento de las MTB, la interfase de la muestra de sedimento en el frasco de vidrio de 1 L, se expuso al polo norte de un imán de neodimio durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo, se re-

cuperó 1 mL de la interfase expuesta al campo magnético y se transfirió a un microtubo Eppendorf<sup>®</sup> de 1 600 µL; una vez formada la interfase, ésta también fue expuesta al polo norte de otro imán de neodimio durante 20 minutos; después de ese lapso, se recuperaron aproximadamente 700 µL de la interfase expuesta al campo magnético. La muestra recuperada se colocó en un capilar sellado y con un tapón de algodón para simular la condición óxica-anóxica; el capilar se colocó dentro de un electroimán durante 10 minutos, con la punta expuesta al polo norte. Completados los 10 minutos, de la punta expuesta al campo magnético se recuperaron aproximadamente 30 µL de muestra. Una gota se utilizó para observar la magnetotaxia en un microscopio óptico de campo claro y el resto se utilizó como inóculo bajo condiciones de microaerofilia.

Para el cultivo de las MTB, se preparó un Medio Mínimo Mineral (MMS) adicionado con los minerales del agua del sitio. Para que éste quedara semisólido, se agregaron 2.75 mL de agar previamente lavado y 23.25 mL de agua del sitio en dilución 1:1 (el agua fue filtrada y esterilizada tres veces antes de su empleo), en el caso de Cíntora. Para las muestras de La Joya se prepararon dos cultivos, uno de estos con el agua del sitio a una dilución 1:1 enriquecido con Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y otro medio adicionando Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y extracto de levadura como fuente de carbono. Se inoculó la muestra recuperada del capilar y se hicieron diluciones de este hasta 10<sup>-3</sup>. Los tubos se envolvieron en papel aluminio y se dejaron a temperatura ambiente en oscuridad.

La magnetotaxia se observó en la gota recuperada en un portaobjetos con mi-

croscopio óptico de campo claro, con un aumento de 1,000X exponiendo la muestra al polo norte de un imán de neodimio cambiándolo repetidamente de posición

para observar la migración de las MTB.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 9.1: Caracterización fisicoquímica y microbiológica

	Cíntora		La Joya
	Laguna Chica	Laguna Grande	
pH (g/L)	9.35	9.40	9.46
Salinidad (g/L)	1.30	1.23	1.46
Temperatura (°C)	36–37	28–29	27
NH <sub>4</sub> (mg/L)		1	14.5
PO <sub>4</sub> (mg/L)		5.75	12.5
NO <sub>3</sub> (mg/L)		0.25	2.75
UFC <sup>1</sup> (Cel/mL)	3×10 <sup>6</sup>	7.5×10 <sup>5</sup>	1×10 <sup>7</sup>
NMP <sup>2</sup> (Cel/mL)	3.4×10 <sup>3</sup>	3.4×10 <sup>3</sup>	3.4×10 <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Unidad Formadora de Colonia

<sup>2</sup> Número Más Probable

Los tres sitios presentan altos niveles de pH (mayor de 8.5), considerando a los microorganismos que ahí habitan como alcalófilos. La salinidad para los dos lagos fue entre 1.2 y 1.4, lo que no clasifica estos sitios como salinos. Contrario a lo que la literatura describe [2], la salinidad de Cíntora resultó ser baja (menor a 3.5), clasificándolo como un lago no salino, Tabla 9.1.

De los medios utilizados para el aislamiento de las muestras de Cíntora, no en todos se logró una consistencia semisólida, o sea en estos no se formó una marcada OAI que favorezca el cultivo de las MTB. Todos los medios de la muestra de La Joya quedaron Semisólidos y sí se formó una marcada OAI. Por otro lado, como se utilizó el agua del sitio, la com-

posición química de ésta pudo interferir de modo significativo en la composición del medio, sobre todo cuando se trata de muestras ricas en iones o sustancias solubles, como es el caso de los sitios estudiados, en este caso se sugiere hacer pruebas variando la cantidad de agar hasta encontrar la proporción más precisa.

Durante el tiempo de incubación (30 días) en ningún medio se observó el crecimiento de colonias, pero este resultado estaba previsto, puesto que el cultivo de bacterias extremófilas es difícil, ya que éstas necesitan de mucho tiempo para que su crecimiento sea observado puesto que tienen requerimientos fisiológicos muy específicos, aún desconocidos. Sin embargo, en las muestras de sedimento se observó la Magnetotaxia de las MTB

bajo el microscopio óptico, por lo que se considera posible y factible que se pueda aislar estos microorganismos de los lagos estudiados con las condiciones metodológicas que empleadas en este tra-

bajo.

En la Figura 9.1 se observa el cambio de movimiento que presenta una MTB al ser expuesta a un campo magnético.

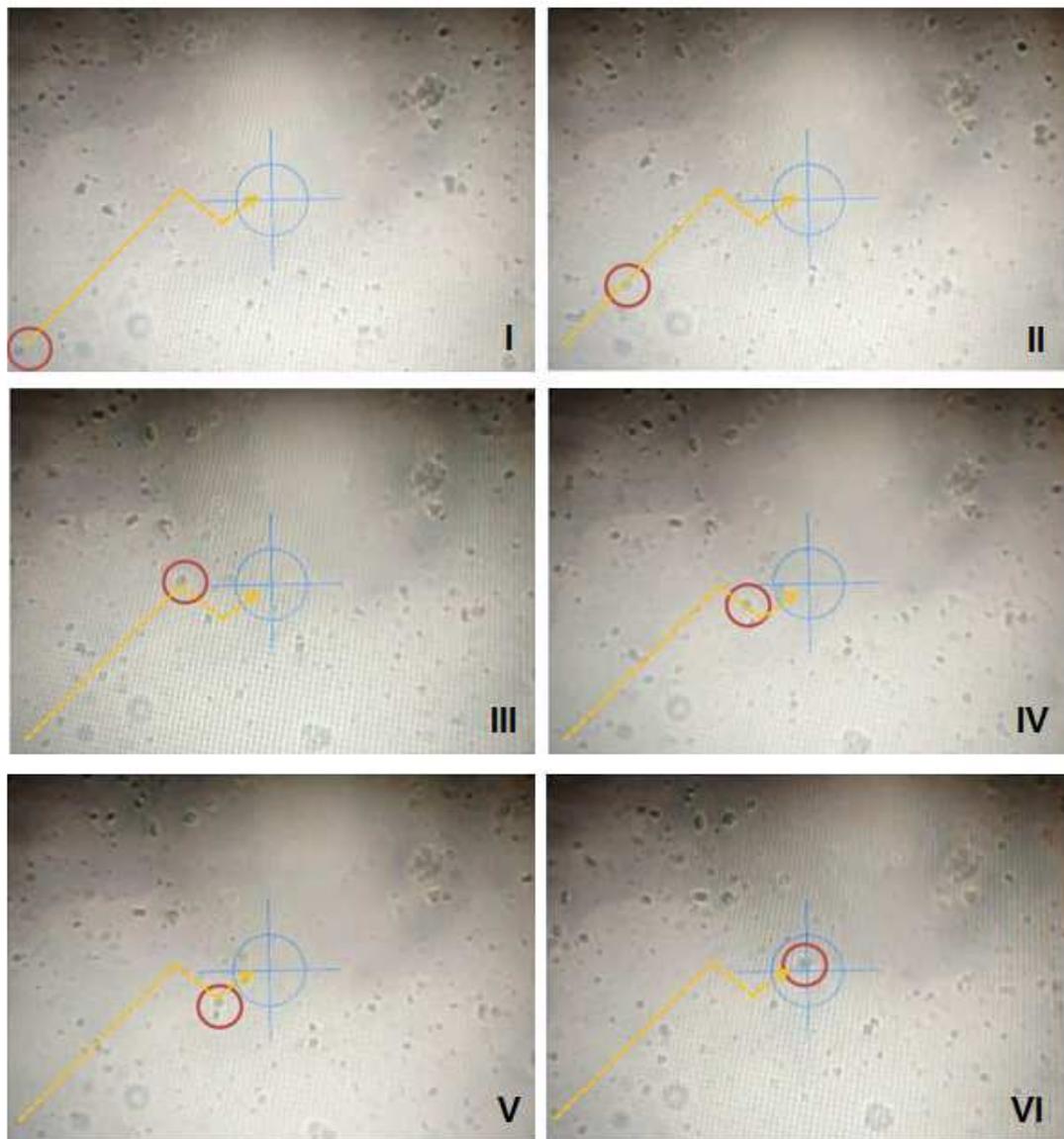


Figura 9.1: Se observa el movimiento de una bacteria (I y II) que cambia de dirección cuando es sometida a un campo magnético (III y IV) y cuando éste es retirado, la bacteria continúa moviéndose en la dirección inicial (V y VI).

## CONCLUSIONES

Se logró la observación de MTB con microscopio óptico en las muestras de los lagos seleccionados como área de estudios. Ambos lagos se pueden considerar como sitios extremos respecto a su alcalinidad.

## AGRADECIMIENTO

A la Dra. Elcia Margareth Souza Brito y su equipo. A la Universidad de Guanajuato. Al programa de Verano Científico de la Academia Mexicana de Ciencias.

## REFERENCIAS

[1] Barrientos Rivera, G. (2014). *Propuesta de prácticas de conservación de suelos en ambientes semiáridos: Caso microcuenca La joya (Querétaro-Guanajuato)* (Doctoral dissertation).

[2] Cruz, A. A., Melgarejo, E. D., Contreras, R. E. A. V., y González, G. M. A. (2012). *La Biodiversidad de Guanajuato: Estudio de Estado*, volumen II. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de Biodiversidad (CONABIO)/Instituto de Ecología del

Estado de Guanajuato (IEE).

[3] Escolero, Ó. A., & Alcocer, J. (2004). Desección de los lagos cráter del Valle de Santiago, Guanajuato. *El Agua el Mexico vista desde la academia. Academia Mexicana de Ciencias, México*, 99-115.

[4] Guerrero, R., & Berlanga, M. (2000). *Bacterias magnetotácticas, hoy y hace 3800 millones de años*. *Actualidad SEM* (29), 14-20.

[5] Lefèvre, C. T., & Bazylinski, D. A. (2013). *Ecology, diversity, and evolution of magnetotactic bacteria*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(3), 497-526.

[6] Pérez-González, T., Valverde-Tercedor, C., & Jiménez-López, C. (2010). *Biomineeralización bacteriana de magnetita y aplicaciones*. *Seminarios de la Sociedad Española de Mineralogía*, 7, 58-74.

[7] Puente-Solís, I. (2004). *Estratigrafía e historia eruptiva del cráter de explosión Hoya Cíntora, Gto.: Universidad Autónoma de San Luis Potosí* (Doctoral dissertation, Tesis profesional, 107 p).

[8] Schüller, D. (1999). *Formation of magnetosomes in magnetotactic bacteria*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 1(1), 79-86.



## 10. STUDY OF MAGNETOTACTIC BACTERIA IN ALKALINE ENVIRONMENT OF VOLCANIC CRATER LAKES FROM LAS SIETE LUMINARIAS

*Pérez-Vázquez, Miriam-Evelia<sup>1</sup>✉; Zatarain-P., Eva-Cecilia<sup>2</sup>; Valerdi-Negreros, Julio-César<sup>3</sup>; Souza-Brito, Elcia-Margareth<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), Universidad de Guadalajara, Guadalajara, México. <sup>2</sup>Unidad Académica Escuela de Biología, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán Rosales, México. <sup>3</sup>Ingeniería Ambiental (DI-GCT), Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México.

e-mail: <sup>1</sup>✉[miriam-perez.bio@hotmail.com](mailto:miriam-perez.bio@hotmail.com)

### ABSTRACT

*The Magnetotactic Bacteria (MTB) are a group of Gram negative microorganisms that inhabit aquatic environments with microaerobic conditions, including hypersaline and alkaline [4]. These bacteria are capable to migrate through the geomagnetic field, due to the presence of magnetosomes, e.g., structures containing a magnetic mineral that could be of magnetite (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) or greigite (Fe<sub>2</sub>S) [11]. In Valle de Santiago, Guanajuato there is a complex of crater-lakes with the potential of being an idyllic habitat for MTB. The main objective of this work was to verify the presence of MTB in two of these lakes: Rincón de Parangueo and San Nicolás de Parangueo. The sediment samples were collected of these lakes for the observation and isolation of MTB, beside the physicochemical, microbiological and chemical characteristics were measured. After observation of magnetotactic behavior, which was recorded in video-microscopy, the samples were inoculated in semisolid medium to future isolation of the MTB. This is the first work to observe the MTB on the crater-lake of Guanajuato state.*

**Keywords:** *Biohecnology, Environmental bioprospect, Magnetotactic bacteria, Magnetotactic behavior.*

### RESUMEN

Las bacterias magnetotácticas (MTB) son un grupo de microorganismos Gram negativas que habitan ambientes acuáticos con condiciones microaeróbicas, incluyendo hipersalinos y alcalinos [4]. Estas bacterias son capaces de migrar a través del campo geomagnético, debido a la presencia de magnetosomas, por ejemplo, estructuras que contienen un mineral magnético que podría ser de magnetita (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) o greigita (Fe<sub>2</sub>S) [11]. En Valle de Santiago, Guanajuato hay un complejo de lagos-cráteres con el potencial de ser un hábitat idílico para MTB. El principal objetivo de este trabajo fue verificar la presencia de MTB en dos de estos lagos: Rincón de Parangueo y San Nicolás de Parangueo. Las muestras de sedimentos fueron recolectados de estos lagos para la observación y el aislamiento de MTB, al par se midieron las características físico-químicas, microbiológicas y químicas. Después de la observación de la conducta magnetotáctica, que fue grabado en vídeo-microscopía,

las muestras se inocularon en medio semisólido para el futuro aislamiento de MTB. Éste es el primer trabajo de observación de MTB en el lago-cráter del estado de Guanajuato.

**Palabras clave:** *Biotecnología, Bioprospección Ambiental, bacterias magnetotáticas, comportamiento magnetotático.*

## INTRODUCCIÓN

Las bacterias magnetotáticas son un grupo de microorganismos Gram negativos que habitan ambientes acuáticos poco profundos, sobre todo hipersalinos y alcalófilos en condiciones de microaerofilia [4,1]; además son capaces de orientarse y migrar a lo largo de las líneas del campo geomagnético, éste comportamiento recibe el nombre de magnetotaxia y se basa en la presencia de magnetosomas, estructuras internas rodeadas de una membrana lipoproteica que contienen un mineral magnético, ya sea magnetita (óxido de hierro,  $Fe_3O_4$ ) o greigita (sulfuro de hierro,  $Fe_3S_4$ ) [4,11]. Las bacterias magnetotáticas constituyen un grupo heterogéneo de procariontes pertenecientes al reino Bacteria, con morfologías muy diferentes, pudiendo presentarse como cocos, bacilos, vibrios o espirilos [4]. Además son un interesante grupo, puesto que su ecofisiología las emparenta con las bacterias que pudieron vivir en los ambientes microóxicos del Arqueano antiguo en la Tierra (entre 3900 y 3500 millones de años) [11]; éstos organismos se han encontrado en elevada densidad poblacional en la zona de transición óxico-anóxica de marismas, agua salobres, pantanos, ciénagas, estanques de oxidación de aguas residuales y en aguas termales [4]. Las propiedades magnéticas de la magnetita bacteriana, hacen que éste mineral sea

usado en múltiples aplicaciones biotecnológicas, que van desde la fabricación de discos duros y la elaboración de nuevos materiales para ingeniería [10,4]; en biomedicina, para el transporte de fármacos a través del torrente sanguíneo y en las estrategias hipertérmicas contra el cáncer [3,8]; hasta agente de contraste en resonancia magnética nuclear, o como un geomarcador, para intentar demostrar la presencia de una antigua vida microscópica en Marte [13,9]. Sin embargo en la actualidad esta alternativa biológica para la producción de magnetita no se ha explotado a escala comercial, principalmente debido a problemas relacionados con su aislamiento y cultivo masivo [4,11]. En el Valle de Santiago, Guanajuato, hay un conjunto de lagos-cráter con potencial de ser hábitat idóneo para estas bacterias. Por lo tanto, el principal objetivo de este trabajo fue verificar la presencia de bacterias magnetotáticas en dos de estos lagos: Rincón de Parangueo y San Nicolás de Parangueo.

## METODOLOGÍA

Los lagos cráter seleccionados para el estudio, se encuentran ubicados en la porción sur del estado de Guanajuato, muy cerca de su colindancia con el Estado de Michoacán. El primero, Rincón de Parangueo con un pH básico y una elevada concentración de sales, principalmente: carbonato y bicarbonato de so-

dio ( $\text{NaHCO}_3$  y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ) y sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), se encuentra a  $20^\circ 25' \text{ N} - 101^\circ 15' \text{ W}$  y 1700 m s.n.m. Y el segundo, San Nicolás de Parangueo con un pH casi neutro y una concentración de sales en agua y sustrato normales, se encuentra a  $20^\circ 23' \text{ N} - 101^\circ 15' \text{ W}$  y 1700 m s.n.m. [5,12]. Para efectuar las investigaciones de Bacterias Magnetotácticas presentes en los cráteres volcánicos, se llevó a cabo una visita a los sitios de muestreo para registrar sus características físico-químicas, además de recuperar sedimento y agua. En el cráter Rincón de Parangueo nos encontramos con dos lagunas a las que nos referiremos como Laguna Chica (LC) y Laguna Grande (LG) puesto que de ambas se tomaron muestras y se realizaron las pruebas por separado. Se hizo uso del soplete portátil, guantes de látex y espátulas de acero para mantener un ambiente estéril durante el muestreo. En cada una de las lagunas, el sedimento recuperado se guardó en: 2 frascos de penicilina, de los cuales 1 fue destinado al cultivo de bacterias anaerobias y el otro para el cultivo de bacterias aerobias, y en 1 tubo falcon de 50 mL para destinarlo a pruebas de microbiología.

Mediante el uso de botas de hule y un azadón se obtuvo sedimento de la interfase óxico-anóxica (aproximadamente a 30 cm de profundidad) y se guardó en un frasco de cristal con capacidad de 1 Lt con tapa de rosca y boca ancha. Además, se llenaron con agua de la orilla de cada sitio visitado botellas de cristal de cuello largo con capacidad de 750 mL y frascos de 350 mL, para la elaboración de los medios de cultivo y pruebas bioquímicas. Al terminar las actividades en campo, en el laborato-

rio se llevó a cabo la preparación y refrigeración de las muestras: Los frascos de penicilina se lacraron (a los frascos destinados a cultivos de bacterias anaerobias se les extrajo el oxígeno mediante la inyección de nitrógeno). Todas las muestras destinadas a las pruebas microbiológicas de Número más Probable (NMP) y Unidad Formadora de Colonias (UFC) se envolvieron en papel aluminio para guardarlas en oscuridad a  $4^\circ \text{C}$  hasta el momento de su uso. Los frascos de 1Lt con sedimento para la Bioprospección de bacterias magnetotácticas, se envolvieron en papel aluminio y se almacenaron con la tapa sobrepuesta (para conservar las condiciones de micro-aerofilia) en una caja de cartón a temperatura ambiente para posteriormente realizar con ellos la bioprospección de bacterias magnetotácticas.

Por otro lado, el agua recuperada en las botellas de cuello alto fue sometida a varias filtraciones: La primer filtración es mediante el uso de filtros para café, la segunda es mediante papel filtro y, finalmente el líquido resultante se hace pasar por filtros Millipore de  $0.45 \mu\text{m}$ .

Para intentar aislar y observar bacterias magnetotácticas se utilizó el procedimiento propuesto por el Dr. Ulysses Garcia Casado Lins de la Universidad Federal de Rio de Janeiro, y la metodología detallada en el Volumen 2 del libro: *“The Prokaryotes. Ecophysiology and Biochemistry”* [2]. Se marcaron los polos Norte y Sur de los imanes de neodimio mediante el uso de una brújula. En la interfase oxico-anoxica generada en el frasco de la muestra colectada se colocó el imán con el polo norte por 30min. Transcurrido el tiempo, en un ambiente esteril, se recuperó una alicuota de 1

mL, la cual fue transferida a un tubo eppendorf<sup>®</sup>, se le colocó nuevamente el polo norte de un imán de neodimio, esta vez por 20 min. Transcurrido el tiempo, con una jeringa para insulina se recuperaron aproximadamente 700  $\mu$ L de la interfase donde estaba el imán. En campana de flujo laminar se preparó un capilar que consistió en una pipeta Pasteur cortada (aproximadamente a 7mm antes del comienzo de la parte angosta), con la punta sellada al fuego y con un tapón de algodón estéril. Con la jeringa de insulina y con una aguja lumbar de 0.40  $\times$  119mm, se inyectó en el fondo del capilar la muestra recuperada, cuidando de no dejar burbujas de aire dentro. El capilar con la muestra, se colocó dentro de un electro imán con la parte más angosta apuntando al polo norte durante 10min. El electroimán estaba alimentado con una pila de 1.5 V que generaba un campo magnético paralelo a la resistencia. Una vez cumplido el tiempo, en la campana de flujo laminar se rompió con las manos la punta del capilar (dejando aproximadamente 2cm de punta). Con una jeringa nueva de 1mL se recuperó la muestra de la punta que estuvo orientada hacia el polo norte. En un cubre objetos se colocó una pequeña gota de muestra junto con una gota de agua estéril del sitio para su posterior observación en microscopio óptico. (El comportamiento magnetotáctico se registró con video-microscopía). El resto de la muestra recuperada del capilar sirvió de inóculo para un medio semisólido, del cual posteriormente se hicieron diluciones para el aislamiento de las mismas. Para la Bioprospección de bacterias magnetotácticas se preparó un medio de cultivo que contenga: 27.25 mL de Agua

del Sitio filtrada y estéril + 2.75 mL de Agar Bacteriano + 30  $\mu$ L de cada compuesto del Medio Mínimo del Sitio + 30  $\mu$ L  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$  1M.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ambos lagos son cuerpos de agua oligotróficos, San Nicolás resultó ser un lago-cráter de pH neutro, a diferencia de éste las dos lagunas de Rincón de Parangueo son un ambiente de pH básico y halófilo, con muy bajas concentraciones de fosfato y bacterias entéricas que se desarrollan mejor en medios sólidos que líquidos, tal como se muestra en la Tabla 10.1.

Con respecto a las bacterias magnetotácticas, se logró observarlas así como registrar su comportamiento magnético mediante video-microscopía. Se logró generar la interfase óxido-anóxica de los medios semisólidos para Rincón de Parangueo (Figura 10.1); sin embargo para San Nicolás de Parangueo hasta el momento se desconocen las cantidades necesarias para lograr la consistencia adecuada del medio, posiblemente por interferencia del pH, la diferencia de características físico-químicas o por necesitar una concentración distinta de agarosa, además no se pudo observar la formación de colonias debido al corto tiempo de incubación de 50 días. Por otro lado, logrando encontrar las condiciones idóneas del medio es posible la obtención de bacterias magnetotácticas de estos lagos puesto que Lefèvre y colaboradores (2011) lograron aislar bacterias

Tabla 10.1: Resultados de las pruebas fsico-quimicas, bioquimicas y microbiolgicas de San Nicols de Paranguero, Laguna Chica de Rincn de Paranguero y Laguna Grande de Rincn de Paranguero.

	San Nicolás	Rincón de Paranguero L.C. <sup>1</sup>	Rincón de Paranguero L.G. <sup>2</sup>
<b>Temperatura</b>	32.0 C – 35.0 C	26.5 – 28.0 C	27.4 – 28.0
<b>Salinidad</b>	1	11	35
<b>pH</b>	7.80	10.29	10.30
<b>Nitrato mg/L</b>	0.75	22.60	18.45
<b>Amonio mg/L</b>	0.08	0.07	0.12
<b>Fosfato mg/L</b>	1.04	Debajo del rango	0.06
<b>NMP<sup>3</sup> (líquido)</b>	10 <sup>6</sup> células/ml	10 <sup>2</sup> células/ml	10 <sup>2</sup> células/ml
<b>UFC<sup>4</sup> (sólido)</b>	10 <sup>6</sup> células/ml	10 <sup>4</sup> células/ml	10 <sup>4</sup> células/ml

<sup>1</sup> L. C. – Laguna Chica

<sup>2</sup> L. G. – Laguna Grande

<sup>3</sup> NMP – Número Más Probable

<sup>4</sup> UFC – Unidad Formadora de Colonias

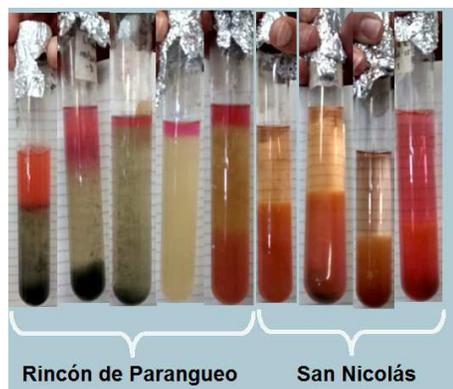


Figura 10.1: Fotografías de algunos de los medios semi-sólidos realizados, donde el color rosa de las muestras de Rincón de Paranguero indica la parte óxica del medio y la sección verde corresponde a la parte anóxica. En las muestras de San Nicolás se observa que el medio es casi traslucido y la fase óxico-anóxica se encuentra indefinida.

magnetotácticas de un manantial de agua salobre en el Parque Nacional Death Valley , California , EE.UU., y encontraron que la cepa BW -1, fue capaz de biomineralizar magnetita o greigite dependiendo

de las condiciones de cultivo; así como enocntrarón que la cepa magneto-ovoide MO-1 creció en la zona de transición-óxica anóxica en un medio mínimo [6,7].

## CONCLUSIONES

Se realizó trabajo de campo, obteniendo muestras para estudiar las bacterias magnetotácticas. Se caracterizaron, química y microbiológicamente las muestras colectadas. Se logró registrar en video-microscopía el movimiento de bacterias magnetotácticas influenciadas por el campo magnético de imanes de neodimio, tales bacterias fueron empleadas como inóculos para medios semisólidos, esperando su exitoso aislamiento. Debido al corto tiempo de incubación de 50 días, no se pudo observar la formación de las colonias.

## AGRADECIMIENTOS

Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental (DI-CGT) Universidad de Guanajuato, Guanajuato México. Dra. Elcia Margareth Souza Brito

## REFERENCIAS

- [1] Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (conabio). 2012. La biodiversidad en Guanajuato: Estudio de Estado. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad/Instituto de Ecología del Estado de Guanajuato (iee). México.
- [2] Dworkin, M. (Editor-in-Chief), Falkow S., Rosenberg E., Schleifer, K. H., & Stackebrandt, E. (2006). *The Prokaryotes*. Third Edition, V2: Ecophysiology and Biochemistry. Springer. E.E.U.U.
- [3] Garcia Diez, A. (2014). Aplicaciones de nanopartículas de magnetita de origen bacteriano.
- [4] Guerrero, R., & Berlanga, M. (2000). Bacterias magnetotácticas, hoy y hace 3800 millones de años. *Actualidad SEM* (29), 14-20.
- [5] Jiménez, B., Marín, L., Morán, D., Fuentes, O. A. E., Alcocer, J., & Martínez, V. H. (Eds.). (2004). *El agua en México vista desde la academia* (No. 351.82325 A3). Academia Mexicana de Ciencias.
- [6] Lefèvre, C. T., Bernadac, A., YuZhang, K., Pradel, N., & Wu, L. F. (2009). Isolation and characterization of a magnetotactic bacterial culture from the Mediterranean Sea. *Environmental microbiology*, 11(7), 1646-1657.
- [7] Lefèvre, C. T., Menguy, N., Abreu, F., Lins, U., Pósfai, M., Prozorov, T., ... & Bazylnski, D. A. (2011). A cultured greigite-producing magnetotactic bacterium in a novel group of sulfate-reducing bacteria. *Science*, 334(6063), 1720-1723.
- [8] Matsunaga, T. (1991) Applications of bacterial magnets. *Trends Biotechnol.* 9, 9195.
- [9] McKay, D. S., Gibson Jr., E. K., Thomas-Keprta, K. L., Vali, H., Romanek, C. S., Clemett, S. J., Chillier, X. D., Maechling, C. R. & Zare, R. N. (1996) Search for past life on Mars: Possible relic biogenic activity in martian meteorite ALH84001. *Science*, 273, 924930.
- [10] McMichael, R. D., Shull, L. J., Swartzendruber, L. H., Bennett, R. E. & Walson, J. (1992) Magnetocaloric effect in superparamagnets. *J. Magn. Magn. Mater.*, 111, 2933.
- [11] Pérez-González, T., Valverde-Tercedor, C., & Jiménez-López, C. (2010). Biomineralización bacteriana de magnetita y aplicaciones. *Seminarios de la Sociedad Española de Mineralogía*, 7, 58-74.
- [12] Vargas, M., Kashefi, K., Blunt-Harris, E. L. & Lovley, D. R. (1998) Microbiological evidence for Fe(III) reduction on early Earth. *Nature*, 395, 65-67.
- [13] Wunderbaldinger, P., Josephson, L. & Weissleder, R. (2002) Tat peptide directs enhanced clearance and hepatic permeability of magnetic nanoparticles. *Bioconjugate Chem.*, 13, 264 -268.

## 11. TOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC EN AISLADOS DE SUELOS AGRÍCOLAS

*Rico-Herrera, Mauricio-I.*<sup>1</sup>✉; *Concha-Guerrero, Sandra-I.*<sup>2</sup>; *Orrantia, Erasmo*<sup>2</sup>;  
*Luna-Velazco, Antonia*<sup>2</sup>; *Souza-Brito, Elcia-Margareth*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Depto. De Ingeniería Civil y Ambiental, D.I., Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato, México. <sup>2</sup>Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV), Chihuahua, México

e-mail: <sup>1</sup>✉[miaurihe-123@hotmail.com](mailto:miaurihe-123@hotmail.com)

### RESUMEN

El aumento en el uso de nanomateriales en varios procesos es notoria y, por lo tanto su entrada en el medio ambiente. Las principales investigaciones actuales señalan la importancia de estudiar el comportamiento de las NPs óxido metálicas en el medio ambiente [1,2]. En el presente trabajo se aislaron diez y siete cepas bacterianas de un suelo nogalero, las cuales fueron utilizadas para estudiar la toxicidad de nanopartículas de óxido de zinc (ZnONP). Las NPs son de uso comercial (ID-nano), las cuales fueron caracterizadas en CIMAV Observando que estas son heterogéneas con tamaño promedio de  $63.5 \pm 6$  nm, (entre 26 y 116 nm), donde el análisis de MET, RX e IR sugirieron un elevado grado de pureza (detectando únicamente la presencia de Zn y O). De los 20 aislados, 17 fueron utilizadas para evaluar la citotoxicidad de ZnONPs y de estas 10 cepas mostraron resistencia a concentraciones superiores a  $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Se observó un aumento en el número de células a la concentración de  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , seguida de reducción drástica de ellas, y finalmente muerte celular. Además, se observó modificaciones en la superficie celular (por microscopía electrónica de barrido, MEB por sus siglas en inglés). A concentraciones de  $3000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  no se observó crecimiento celular, siendo esta considerada la concentración máxima inhibitoria para las condiciones utilizadas, mientras la concentración de  $2000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  se tomó como la concentración mínima inhibitoria (CMI). Las cepas expuestas a  $2000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ZnONPs fueron observados con MEB verificando que el daño causado por las NPs fue principalmente por interacción con la pared celular, produciendo cambios en la morfología celular hasta la ruptura y lisis bacteriana. Probablemente estos efectos fueron debido a la interacción de iones de Zn, ya que únicamente 0,75% de las ZnONPs se encontraba en la fase dispersa. Como perspectiva se debe verificar si bajo estas condiciones ocurre la generación de especies reactivas de oxígeno para elucidar más puntualmente el posible mecanismo de daño que estas NPs pueden estar causando a estos microorganismos.

**Palabras clave:** *Nanotecnología, medio ambiente, ZnONPs, baterías, TEM, MET.*

## INTRODUCCIÓN

Un nanomaterial es un material con por lo menos una dimensión menor que 100 nm. Hoy en día, las nanopartículas (NPs) son un área de intensa investigación científica, debido a una amplia variedad de aplicaciones potenciales en los campos de biomédicos, ópticos, y electrónicos. Dependiendo de su composición se pueden clasificar en carbonosas, metálicas, cerámicas y poliméricas. Las NPs metálicas exhiben unas excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas, que son intrínsecas a su tamaño [2]

El uso de NPs se ha incrementado en gran medida en los últimos años. La proyección prevista para la producción de nanomateriales artificiales está llegando a más de 58,000 toneladas de 2012 a 2020 [1]. Los residuos generados por la industria de los NPs han demostrado que afectan directamente al medio ambiente, sobre todo los ecosistemas del suelo, seguido por agua y aire [2-6]. Las implicaciones ambientales en relación a la toxicidad y la biodegradabilidad de las NPs, los efectos de éstas en la salud de la diversidad de especies (incluyendo la humana), en el corto y en el medio plazo, son considerables, puesto que se estima que podrían interferir en las funciones vitales de los seres vivos. Adicionalmente, la bioacumulación y persistencia de las NPs a lo largo de la cadena alimentaria es también un factor a tener en cuenta [1,2].

Las aplicaciones de las nanopartículas de zinc (ZnONP) giran en torno al perfeccionamiento de materiales existentes y a la innovación de nuevos materiales. Estas están siendo utilizadas

para la fabricación de neumáticos de alto rendimiento; para la fabricación de telas con propiedades antimanchas o antiarrugas; en cosméticos, fármacos y nuevos tratamientos terapéuticos; filtros-membranas de agua nanoestructurados; mejora de procesos productivos mediante la introducción de materiales más resistentes o eficientes; nuevos materiales para usos que van desde la electrónica, la aeronáutica y toda la industria del transporte.

Aunque el efecto ambiental de algunos nanomateriales como los nanotubos de carbono, metales, óxidos metálicos, y NP cero-valente han sido bien estudiados [7], la información sobre su interacción y daños en las comunidades bacterianas autóctonas es todavía escasa. Comunidades microbianas del suelo están involucrados en varios ciclos biogeoquímicos como el carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y otros [7,8]. Por lo tanto, incluso un poco de perturbación en la estructura y composición de las comunidades microbianas pueden inducir modificaciones en el medio ambiente circundante y viceversa. La protección de la biomasa microbiana del suelo y de la diversidad de estos microorganismos es uno de los principales retos para los próximos años. Sobre todo porque estos juegan un papel importante en el uso y en el mantenimiento del suelo. El uso sostenible de estos recursos no puede garantizarse si los ciclos de nutrientes cambian su correcto funcionamiento [9,10]. Por tanto, es urgente obtener información sobre cómo las NPs podrían afectar las comunidades bacterianas con el fin de mitigar su impacto ambiental.

La *Royal Society* suscribía en 2004 que “la evidencia sugiere que por lo menos

algunas NPs manufacturadas serán más tóxicas por unidad de masa que aquellas de la misma naturaleza pero de mayor dimensión”. Esta toxicidad está relacionada con el área superficial y la reactividad química de estas partículas. Tal reactividad química es la más preocupante, pues se piensa que las enzimas presentes en el ambiente pueden cambiar sus propiedades cuando en contacto con NPs y convertirse en coloides. Compuestos coloidales con NPs adheridas podrían ser ideales para el transporte a larga distancia de materiales tóxicos.

El principal objetivo de este trabajo fue evaluar la toxicidad de ZnONP en bacterias nativas de un suelo agrícola. Los microorganismos utilizados en estas pruebas fueron aislados de un suelo nogalero.

## METODOLOGÍA

### Sitio de muestreo y aislamiento de microorganismos

Se recogieron muestras de suelo de un terreno agrícola de Pecan en la Cd. de Delicias, Edo. de Chihuahua, México, en julio de 2012. La caracterización de ese suelo [11] se realizó en el Depto. de Ciencias Agrotecnológico de la Universidad de Chihuahua (FACIATEC). Estos fueron utilizados como inóculo para el aislamiento de bacterias de suelo con diferentes medios de cultivos (LB, YPS). Inicialmente se sembraron en medio sólido, se recuperando las cepas con morfología de colonia distintas. Después, de varias etapas de aislamiento, estas fueron recuperadas en medio LB líquido. Los cultivos que presentaban células con diferentes morfologías microscópicas se usó la técnica de microcultivos en placas de

Elisa en medio LB. Una vez confirmado que se trataban de cultivos auxenicos, estas se sembraron en medio sólido para su caracterización (morfología macroscópica y microscópica), y en medio líquido para la obtención de biomasa bacteriana para los estudios de toxicidad de ZnONP y de su caracterización filogenética. Estos aislados se conservaron en glicerol (70%) a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### Caracterización de ZnONPs

Las ZnONPs fueron adquiridas de la empresa Investigación y Desarrollo de Nanomateriales (ID'NANO) (<http://www.id-nano.com.mx>) y fueron caracterizadas en el Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV, Chihuahua). El tamaño y morfología de las ZnO NPs se verificó mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), mientras que por medio de rayos X y espectrometría de infra-rojo (IR) se verificó la pureza química.

### Preparación de solución stock de ZnONPs

Se pesaron 0.8 g de ZnONPs, disolviéndolo en 40ml de agua desionizada estéril y sonicandolas aproximadamente 10min, obteniendo una concentración de  $20,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Esta se preparaba en el momento de utilizarla.

### Toxicidad de ZnONPs en los aislados

El efecto bactericida de ZnONPs se analizó en 17 cepas bacterianas. Los pre-cultivos de estas se realizaron en medio LB, y se incubaron durante 8h ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  a 200 rpm). Posteriormente, se tomó 1 mL

de este como inóculo para los ensayos de toxicidad realizados en tubos de ensayo de 10 mL. Las concentraciones probadas fueron de 50, 100, 500, 1000, 2000 y 3000  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ZnO NP, y el control sin exposición a NPs, aforados a un volumen final de 6 mL con medio líquido R2A. Estos se incubaron durante 12 h a 37 °C en agitación constante (200 rpm). Finalmente se observaron las muestras en microscopía óptica. Con los resultados obtenidos se pudo determinar la concentración mínima y máxima inhibitoria de la NP de ZnO para cada una de estas cepas. Después de analizar el comportamiento de las ZnONPs en los aislados 9 de estas mostraron sensibilidad a concentraciones superiores a 1000  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . En las cepas donde se encontró un efecto tóxico fueron analizadas por MEB.

### Preparación de la muestra biológica para MEB

Las muestras para observar al MEB inicialmente fueron centrifugadas (3000 rpm durante 10 min.) hasta obtener una pastilla observable, después se resuspendió la pastilla en glutaraldehído al 3%, y se dejó en reposo entre 2 a 4 h a 4 °C. Después del tiempo de fijación, se centrifugó a (3000 rpm durante 10 min.) una segunda vez, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en buffer de fosfato Milloning. Se realizaron 3 lavados con buffer Milloning en las mismas condiciones de centrifugado. Después, se filtraron sobre membrana de policarbonato (diámetro de poro 0,22 micras), y se deshidrataron sucesivamente en un gradiente de etanol (10 a 100%). Todas las muestras fueron montadas en soportes de metal y recubiertas con oro (Denton Vacuum Desk II). Las imágenes

fueron generadas mediante el uso del microscopio Jeol JSM 7401F. Para el análisis elemental se utilizaron rayos X de energía dispersiva (EDX, Oxford Inca Penta FETX3) acoplado a SEM [9].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización de ZnONPs

El tamaño promedio de las ZnONPs fue de  $63.5\pm 6$  nm, variando entre 26 y 116 nm (Figura 11.1 A). Estas fueron clasificadas como heterogéneas y con un elevado grado de pureza por sus altos porcentajes en peso de cada elemento: Oxígeno 37.90% y Zinc 32.3%. El carbono detectado es de la gradilla (Figuras 11.1 B). Para confirmar la pureza de las ZnONPs se realizó una espectroscopia de rayos x e infrarrojo donde nos arrojaron los espectros indicando la pureza de estas: Los espectros en su conjunto constituyen un criterio inequívoco para la identificación de una molécula y nos permitió identificar las sustancias presentes ya que cada compuesto tiene un espectro, comparándolo con otros espectros ya analizados (Figura 11.2).

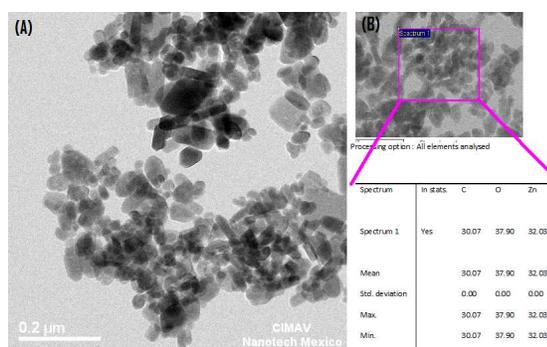


Figura 11.1: Caracterización de ZnONPs: (A) Micrografía MET (B) Espectro EDX que indica la composición.

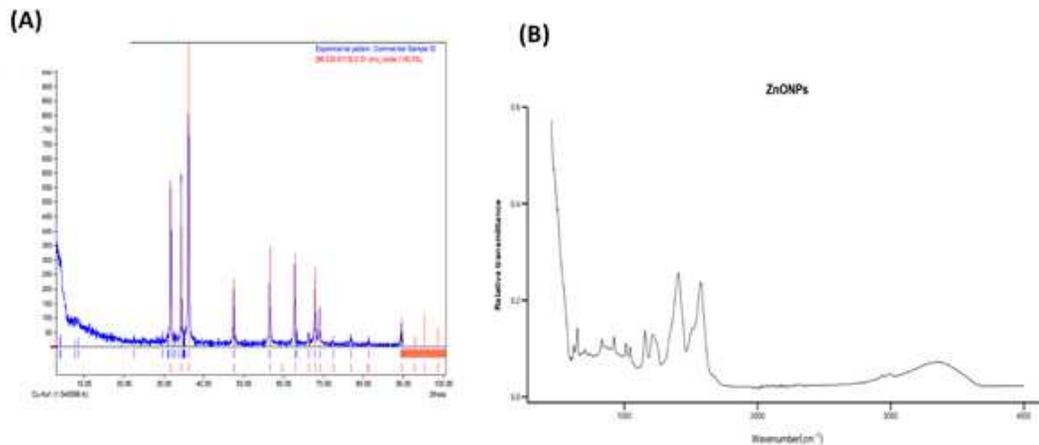


Figura 11.2: Espectros de rayos X (A) y (B) IR que indican la composición.

### Aislamiento de Cepas bacterianas

Se logró aislar 17 cepas con distintas morfologías (coco-bacilos, bacilos y bacilos alargados alargados), algunos se apreciaba la formación de esporas, y con movilidad (Figura 11.3), usando 5 medios de cultivo diferentes.



Figura 11.3: Aislados observados en el microscopio óptico de campo claro (aumento 1000×).

### Comportamiento de las ZnONPs en los aislados

Después de una evaluación previa respecto a su tasa de crecimiento (Figura 11.4), se seleccionaron los aislados con crecimiento más acelerados (H4, H5, H13, H17, H18, H20, H23, H25, H26 y H31) para evaluar la toxicidad de ZnONPs. Se observó un aumento en el número de células a  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Sin embargo, a concentraciones superiores se observó reducción drástica del número de células, además de presentar morfología celular modificada, como por ejemplo, células más alargadas o más pequeñas. A concentraciones de  $3000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  no se observó crecimiento celular, siendo esta considerada la concentración máxima inhibitoria para las condiciones utilizadas, y tomamos la concentración de  $2000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  como la concentración mínima inhibitoria (CMI).

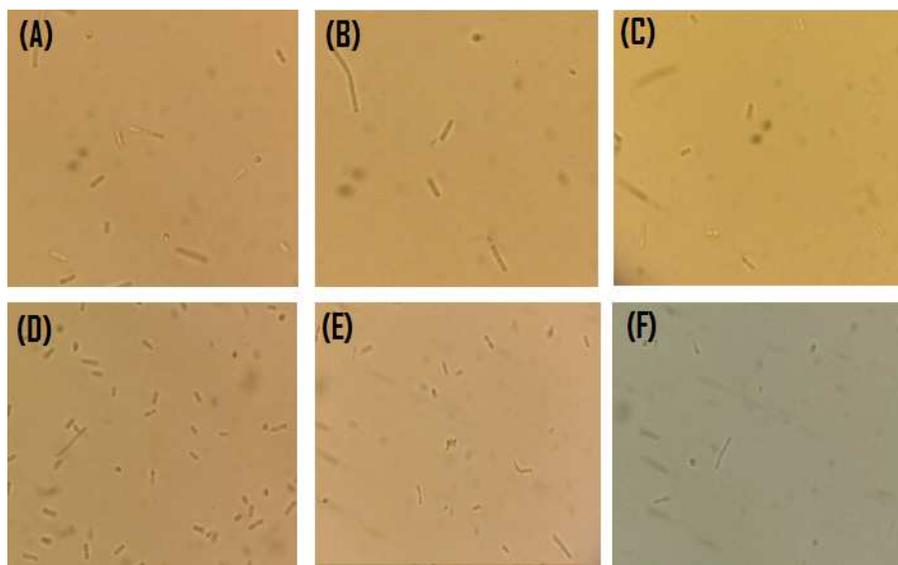


Figura 11.4: Observación de aislados (H13) con exposición a ZnONPs en el microscopio óptico de campo claro (aumento 1000×); (A) control; (B) 50 mg·L<sup>-1</sup>; (C) 100 mg·L<sup>-1</sup>; (D) 500 mg·L<sup>-1</sup>; (E) 1000 mg·L<sup>-1</sup>; (F) 2000 mg·L<sup>-1</sup>.

### Exposición de las células bacterianas a ZnONPs

Nueve aislados (H4, H5, H13, H17, H18, H20, H23, H25, H26 y H31) fueron observados al MEB, verificando que el daño causado por la NP era principalmente por la ruptura y lisis celular, además de

cambio de la morfología celular (Figura 11.5). Adicionalmente, al hacerles el análisis de EDX (la dispersión de energía de rayos X) sobre la célula (Figura 11.6) se detectó la presencia de Zn y de O, sugiriendo que el daño fuera resultado de la presencia de ZnONP.

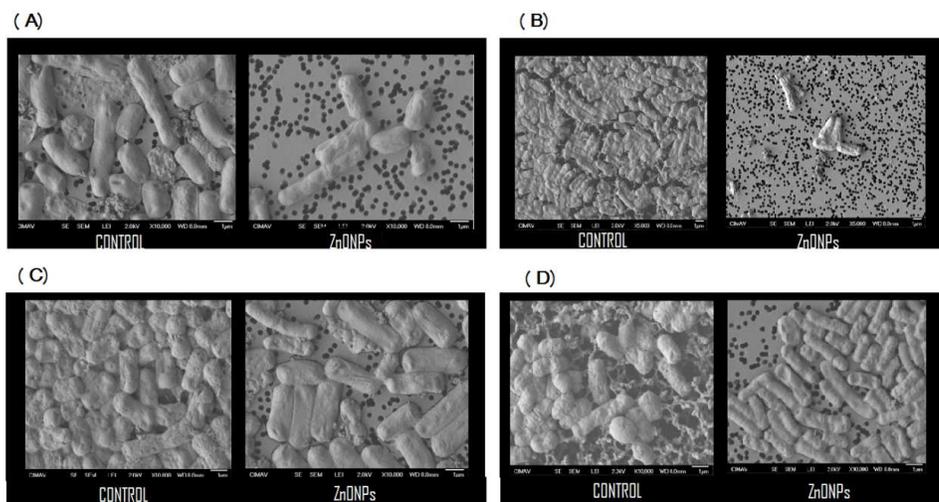


Figura 11.5: La microscopía electrónica de barrido (SEM) de (A) H4; (B) H13; (C) H20; (D) H25. Células expuestas y tratadas con ZnONPs a la derecha y los controles respectivos a la izquierda.

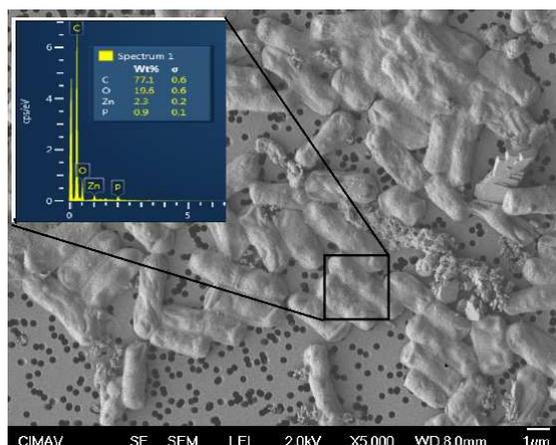


Figura 11.6: Micrografía del aislado H3 expuesto a ZnONPs ( $2000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) con el análisis elemental.

## CONCLUSIONES

Varios estudios de cultivos puros han mostrado que la interacción bacteriana con NPs puede producir citotoxicidad en diferentes partes de la célula [11]. Mostramos aquí que ZnONPs son tóxicas para las bacterias del suelo nativo. Aparentemente, la interacción de las ZnONPs con componentes de la pared celular a concentraciones de  $2000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  está modificando la morfología celular. Basado en datos de la literatura, se puede considerar que la citotoxicidad de esta NP contra las cepas estudiadas podría atribuirse a reacciones de óxido-reducción y a la generación de especies reactivas. Sin embargo, es necesario realizar más pruebas para probar esta hipótesis.

El Zn es un metal y como tal, a concentraciones elevadas, es tóxico. Sin embargo, él es esencial a bajas concentraciones al metabolismo de varios seres vivos. Esto podría explicar el aumento de crecimiento celular a  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de

ZnONP. Se determinó  $2000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  como la CMI para el ZnONP, bajo las condiciones trabajadas. A esta concentración los daños fueron sobretodo cambios en la morfología celular, reducción drástica del número de células, lisis y muerte celular. Para confirmar que el daño observado es únicamente causado por NP de ZnO es necesario realizar dichas pruebas con sales de ZnO, mientras que un análisis de TEM puede confirmar la entrada del ZnONP en la célula o si este se limita a una interacción a nivel de la superficie celular.

Estos resultados señalan que las cepas silvestres, pueden ser afectadas por nanocontaminantes. Por lo tanto, es fundamental intensificar los estudios sobre el daño y la toxicidad de los nanomateriales a las células vivas y las comunidades microbianas con el fin de establecer normas justas para la descarga de los parlamentos nacionales en el medio ambiente, en forma directa a través de los residuos de los productos que los contienen.

## AGRADECIMIENTOS

Al CIMAV, Chihuahua por el apoyo para el uso de sus instalaciones y las micrografías de SEM y TEM, al SIBA 2015 por el apoyo de impulsarme en la investigación, a la Dirección de Apoyo a la Investigación y al Posgrado (DAIP, UGTO) por la beca otorgada (proyecto “Impacto de Nps metálicas sobre la biodiversidad Bacteriana”) y al CONACyT por el apoyo financiero al proyecto C0010.2011.010.CNPQ.175089.

## REFERENCIAS

[1] A. D. Maynard, Nanotechnology: A Research Strategy for Addressing Risk,

- Woodrow Wilson International Center for Scholars, Washington, DC, USA, 2006.
- [2] F. Gottschalk, T. Sonderer, R. W. Scholz, and B. Nowack, “Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO<sub>2</sub>, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions,” *Environmental Science and Technology*, vol. 43, no. 24, pp. 92169222, 2009. View at Publisher · View at Google Scholar · View at Scopus
- [3] S. J. Klaine, P. J. J. Alvarez, G. E. Batley et al., “Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects,” *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 27, no. 9, pp. 18251851, 2008. View at Publisher · View at Google Scholar · View at Scopus
- [4] P. A. Maurice and M. F. Hochella, “Nanoscale particles and processes: a new dimension in soil science,” *Advances in Agronomy*, vol. 100, pp. 123153, 2009. View at Publisher · View at Google Scholar · View at Scopus
- [5] K. Tiede, M. Hassellv, E. Breitbarth, Q. Chaudhry, and A. B. A. Boxall, “Considerations for environmental fate and ecotoxicity testing to support environmental risk assessments for engineered nanoparticles,” *Journal of Chromatography A*, vol. 1216, no. 3, pp. 503509, 2009. View at Publisher · View at Google Scholar · View at Scopus
- [6] L. Vittori Antisari, S. Carbone, A. Gatti, G. Vianello, and P. Nannipieri, “Toxicity of metal oxide (CeO<sub>2</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, SnO<sub>2</sub>) engineered nanoparticles on soil microbial biomass and their distribution in soil,” *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 60, pp. 8794, 2013. View at Publisher · View at Google Scholar · View at Scopus
- [7] H. Schwegmann and F. H. Frimmel, “Nanoparticles: interaction with microorganisms,” in *Nanoparticles in the Water Cycle*, F. H. Frimmel and R. Niessner, Eds., Springer, Berlin, Germany, 2010. View at Google Scholar
- [8] D. Y. Lyon, A. Thill, J. Rose, and P. J. J. Alvarez, “Alvarez, ecotoxicological impact of nanomaterials,” in *Environmental Nanotechnology: Application and Impacts of Nanomaterials*, M. R. Wiesner and J. Y. Bottero, Eds., McGraw-Hill, New York, NY, USA, 2007. View at Google Scholar
- [9] J. Maldonado, A. Solé, Z. M. Puyen, and I. Esteve, “Selection of bioindicators to detect lead pollution in Ebro delta microbial mats, using high-resolution microscopic techniques,” *Aquatic Toxicology*, vol. 104, no. 1-2, pp. 135144, 2011. View at Publisher · View at Google Scholar · View at Scopus
- [10] C.-N. Lok, C.-M. Ho, R. Chen et al., “Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles,” *Journal of Proteome Research*, vol. 5, no. 4, pp. 916924, 2006. View at Publisher · View at Google Scholar · View at Scopus
- [11] S. I Concha-Guerrero, E. M. S Brito, H. A Piñón-Castillo, S. H Tarango-Rivero, C. A Caretta, A. Luna-Velasco, R. Duran, E. Orrantia-Borunda, (2014). Effect of CuO Nanoparticles over Isolated Bacterial Strains from Agricultural Soil. *Journal of Nanomaterials*, 2014.

## 12. TOXICIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC (ZnO) EN LEVADURAS PRESENTES EN UNA PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

*González-Paniagua, Yutzil<sup>1</sup>✉\*; *Cervantes-Avilés, Pabel-A.<sup>1</sup>*; *Concha-Guerrero, Sandra-I.<sup>2</sup>*; *Luna-Velazco, Antonia<sup>2</sup>*, *Souza-Brito, Elcia-Margareth<sup>1</sup>✉\*\***

<sup>1</sup>Depto. De Ingeniería Civil y Ambiental, D.I., Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato, México. <sup>2</sup>Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV), Chihuahua, México

e-mail: <sup>1</sup>✉\* [yutzil10ug@gmail.com](mailto:yutzil10ug@gmail.com), <sup>1</sup>✉\*\* [emsbrito@gmail.com](mailto:emsbrito@gmail.com)

### ABSTRACT

*A nanoparticle by definition is a material with at least two of its dimensions between 1 and 100 nm [6]. The ZnO in nanoscale is currently being used for their potential applications in nanotechnology. In this study the toxicity of nanoparticles of zinc oxide (ZnO NPs) on a yeast strain isolated from the plant wastewater treatment was assessed. The ZnO NPs were characterized by transmission electron microscopy (TEM) analysis and X-ray diffraction (XRD). The resulting average size was  $63.47 \pm 6.3$  nm and form agglomerates XRD showed high cristalinity material. The NPs-yeast interaction was performed using different concentrations ( $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $3000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Toxicity was evaluated using scanning electron microscopy (SEM) and observing morphology changes, cell reproduction and direct damage to the microorganism. Furthermore, an X-ray energy dispersive spectroscopy (EDX) was performed to detect the presence of Zn in the cell. The micrographs showed that in a concentration of  $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $3000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  there is complete inhibition of cell growth, however in  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  is shown a growth which is favoring by the Zn and an increase of what is inferred an secretion of exopolysaccharides compared to control. The EDX showed the presence of Zn in the cell wall of yeast. The results suggest that high concentrations of ZnO NPs are acting as fungicides but at a concentration of  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  play a role as a stimulating growth in addition, yeast is behaving like a bioadsorbent when the NPs are trapped in the cell wall. This makes us conclude that the release of these on the environment might be slightly toxic to eukaryotic organisms.*

**Keywords:** *Wastewater, yeast, toxicity, ZnO nanoparticle, SEM, TEM.*

### RESUMEN

Una nanopartícula por definición es un material con al menos dos de sus dimensiones de entre 1 y 100 nm [6]. El ZnO a una nanoescala actualmente es usado por su potencial de aplicaciones en la nanotecnología. En este trabajo se evaluó la toxicidad de las Nanopartículas de Óxido de Zinc (ZnO NPs) sobre una cepa de levadura aislada de la planta de tratamiento de aguas residuales. Las ZnO NPs fueron caracterizadas mediante microscopia electrónica de transmisión (TEM) y Análisis de Difracción de Rayos X (XRD). El tamaño promedio resultante fue de  $63.47 \pm 6.3$  nm formando aglomerados y

el XRD mostró una alta cristalinidad el material. La interacción NPs-levadura se realizó usando diferentes concentraciones ( $500\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $1,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $3,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). La toxicidad fue evaluada usando microscopia electrónica de barrido (SEM) y observando cambios de morfología, reproducción celular y daño directo al microorganismo, además se realizó una espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDX) para detectar la presencia del ZnO en la célula. Las micrografías mostraron que a  $1,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $3,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  hay una completa inhibición del crecimiento celular, sin embargo a  $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  se presenta un favorecimiento en el crecimiento y un aumento en lo que se infiere una secreción de exopolisacáridos en comparación con el control. El EDX mostró la presencia de ZnO en la pared celular de la levadura. Los resultados sugieren que las ZnONPs a concentraciones altas están actuando como fungicidas y a una concentración de  $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  desempeñan un papel de estimulador de crecimiento además de comportarse como un bioadsorbente al quedar atrapadas las NPs en la pared celular. Esto nos hace concluir que la liberación de estas en el medio ambiente podría resultar poco tóxica para organismos eucariotes.

**Palabras clave:** *Agua residual, Levadura, Toxicidad, Nanopartícula de ZnO, TEM, SEM.*

## INTRODUCCIÓN

Una nanopartícula es un material con al menos dos de sus dimensiones de entre 1 y 100 nm [6]. El hombre y el medio ambiente siempre han estado expuestos a NP, ya que éstas se producen de forma natural durante las erupciones volcánicas, incendios forestales, etc. Sin embargo, en la actualidad la exposición a NPs ha aumentado significativamente debido a fuentes antropogénicas, y seguirá aumentando con el incremento de su implementación en productos de uso común ya que poseen un gran número de aplicaciones industriales, incluyendo electrónica, óptica, textil, así como también en dispositivos médicos, biosensores y en remediación medioambiental [4].

Los materiales con rango de tamaño nanométrico poseen propiedades físico-químicas que difieren substancialmente del mismo material en escala macrométrica, y a su vez, les permite mejorar su conductividad, aumentar su sensibilidad y reactividad óptica, por mencionar solo algunas características

[5]. Además a menor tamaño de las NPs aumenta la relación área-volumen y al interactuar con los sistemas biológicos y los micro ambientes puede producir toxicidad.

Las nanopartículas de Óxido de Zinc (ZnONP) son unas de las más utilizadas a nivel industrial. Se utilizan en muchos productos cosméticos, médicos y en artículos de tocador, gracias a sus propiedades antibacterianas y desodorantes. Además tiene la propiedad de absorber la luz ultravioleta (UV) y por esto es apto para su uso en lociones de protección solar [5].

Como consecuencia de la utilización de productos que contienen NPs, parte de estas tienen un destino final en las aguas residuales que son llevadas a las plantas de tratamiento. Estos nanomateriales tienen una afección directa en el tren de operaciones a lo largo del proceso ya que los microorganismos presentes son claves en la limpieza del agua residual. De los pocos estudios acerca de estas interacciones algunos muestran que el efecto en el proceso de limpieza es nocivo para las comunidades microbianas presentes

en el agua residual. Otros por el contrario como Cañizares-Villanueva (2000), demostraron que algunos microorganismos presentes en las aguas residuales actúan como adsorbentes de metales pesados así que son utilizados en biorremediación de aguas [3]. Debido a la escasa información existente es necesario realizar mayores estudios sobre la biodiversidad presente en las plantas de tratamiento antes y después de la interacción con nanopartículas para poder establecer normas de regulación de desecho de NPs en el medio ambiente, además de evaluar el daño producido sobre las comunidades microbianas.

## METODOLOGÍA

### Origen de la muestra

Para la realización de este trabajo se utilizó una muestra tomada de un reactor piloto estabilizado, el cual es utilizado para pruebas de tratamiento de agua residual siendo alimentado con un medio de agua residual sintética (ARS) y un preinóculo añadido de biomasa extraída de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) de la ciudad de Guanajuato. Este se encuentra ubicado en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la Universidad de Guanajuato. Se decidió tomar la muestra en el reactor piloto porque los microorganismos presentes en este son representativos de una PTAR, además de que este reactor cuenta con el medio que se trabajó en el experimento que es el ARS.

### Aislamiento de microorganismos

El aislamiento se llevó a cabo mediante técnicas dependientes de cultivo usan-

do dilución seriada en medio ARS (1.9 g/L Dextrosa, 0.344 g/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.0715 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.0705 g/L  $\text{NaCl}$ , 0.0449 g/L  $\text{MgSO}_4$ , 1 ml/L Vitaminas, 1 ml/L MT, 1 ml/L Selenito y 0.5 ml/L Extracto de levadura), pasando 1 mL de cada dilución a placa petri con ARS agar (20 gr/L agar bacteriológico) y seleccionando las colonias que presentaron morfología y coloración distinta mediante el método tradicional de aislado en placa de Petri (por estriación). Después de esto pasamos a medio líquido ARS para comprobar el aislamiento con una observación en microscopio óptico. Para eliminar las levaduras de las cepas bacterianas se hizo un choque térmico donde la temperatura mínima fue de  $-80^\circ\text{C}$  y la máxima de  $80^\circ\text{C}$ . El ARS se utilizó para aislamiento general y bacteriano, y para un aislamiento específico utilizamos YPD suplementado con ampicilina (1g/L) para la obtención de las levaduras. El incubación de cada resiembra fue llevada a cabo a temperatura ambiente, en presencia de luz y con una duración de 24 hrs.

### Caracterización de ZnOPs

Las NPs empleadas para este estudio se adquirieron en la empresa ID-nano. Se realizó una suspensión de ZnO NPs en etanol, sonicadas por 15 minutos y puestas sobre una gradilla metálica para determinar el tamaño y la morfología. Este análisis se realizó mediante Microscopía Electrónica de Transmisión JEM-2200FS. La cristalinidad de las nanopartículas se analizó mediante un XRD y el difractograma fue analizado usando el software Match.

## Evaluación de citotoxicidad

Cada una de las cepas se inoculó en medio líquido para obtener un precul-tivo con un volumen total de 6 mL (4 mL ARS, 1 mL LB y 1 mL de biomasa) por 12 hrs. Se preparó una dispersión stock de  $20,000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ZnO NPs. La dispersión de NPs se realizó en agua tridestilada estéril y sonicadas por 15 min antes de su uso. La exposición se hizo en medio líquido teniendo un volumen total de 6 mL (nARS, 1 mL LB, 1 mL preinóculo) con diferentes concentra-ciones de NPs ( $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $1,000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $3,000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). La interacción se llevo a cabo durante 24 hrs a  $37^\circ\text{C}$  y con una agitación de 200 rpm. Se utilizaron como controles las cepas sin exposición a NPs.

## Preparación de muestras biológicas para análisis por SEM

La toxicidad de la cepa de levadura iden-tificada como Y16B fue analizada usando Microscopia Electrónica de Barrido. De cada una las muestras expuestas a NPs se obtuvo una submuestra la cual fue fijada usando glutaraldehído (3%) en buffer de fosfatos Milloning (pH 7.3) por 4 hrs y lavadas 2X en el mismo buffer. Después fueron filtradas en membranas de policar-bonato con un diámetro de poro  $0.22\mu\text{m}$ , fijadas y deshidratadas incrementando sucesivamente la concentración de etanol (30-100%). Todas las muestras fueron colocadas en soportes de metal y se reali-zó un baño de oro (Denton Vacuum Desk II). Finalmente se utilizó el microscopio Jeol JSM 7401F para generar las micro-grafías. El detector EDX (Oxford Inca PentaFETX3) acoplado al microscopio electrónico de barrido fue utilizado para realizar el análisis elemental de detección

del Zn en la célula.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Utilizando los 2 medios específicos ARS para bacterias y YPD suplementado con ampicilina para levadura se trató de ais-lar el mayor numero de microorganismos posibles. Hasta el momento se obtuvo del choque térmico y en agar ARS 20 cepas bacterianas y en agar YPD con ampicilina 4 levaduras con morfología macroscópica diferente. De las cuáles ninguna a sido identificada por métodos moleculares. Para la evaluación de la citotoxicidad a ZnO NPs se usó sola-mente la cepa de levadura identificada con nomenclatura propia como Y16B, siendo la única que fue comprobado su aislamiento. Además, se tuvo una pre- via desición de probar la eficiencia del proceso de evaluación de toxicidad uti-lizando solo una cepa.

La levadura presente en las aguas resid-uales se adjudica a procesos antropo- genicos que durante los procesos donde es utilizada se convierte en un residuo que termina en las aguas del drenaje te-niendo como destino final la planta de tratamiento de aguas residuales. No obs-tante las levaduras cumplen una función dentro del proceso de limpia de las aguas como lo menciona Canizares-Villanueva que estas atrapan metales pesados en su membrana celular cuando estos se encuentran en concentraciones bajas [3]. También se espera bacterias como Zooglea, Pseudomonas y Bacillus en los lodos activados ya que su papel es funda- mental en los procesos ayudando a for- mar flóculos, a la clarificación del agua, a la eliminación de patógenos y también son usados como indicadores tóxicos y de

DBO (Demanda Biológica de Oxígeno), entre otras funciones [6].

En la caracterización de ZnO NPs las micrografías obtenidas por TEM mostraron que las NPs utilizadas no tienen un tamaño ni una forma uniforme. El tamaño se encontró que está entre un rango de 30 a 100 nm formando aglomerados (Figura 12.1 A y B). Está descrito por Amelia, C. H. (2014) [2] que la formación de aglomerados es común

cuando se trata de experimentación utilizando medios líquidos. El uso de ZnO NPs a nivel comercial se tiene que varía en un rango de 15 a 70 nm [5]. La composición de la fase cristalina de las NPs se confirmó por el análisis XRD y este mostró una difracción que tuvo una gran similitud con una difracción patrón con la que fue comparada, ya que solo se encontró la presencia de Zn y O en el espectro (Figura 12.2).

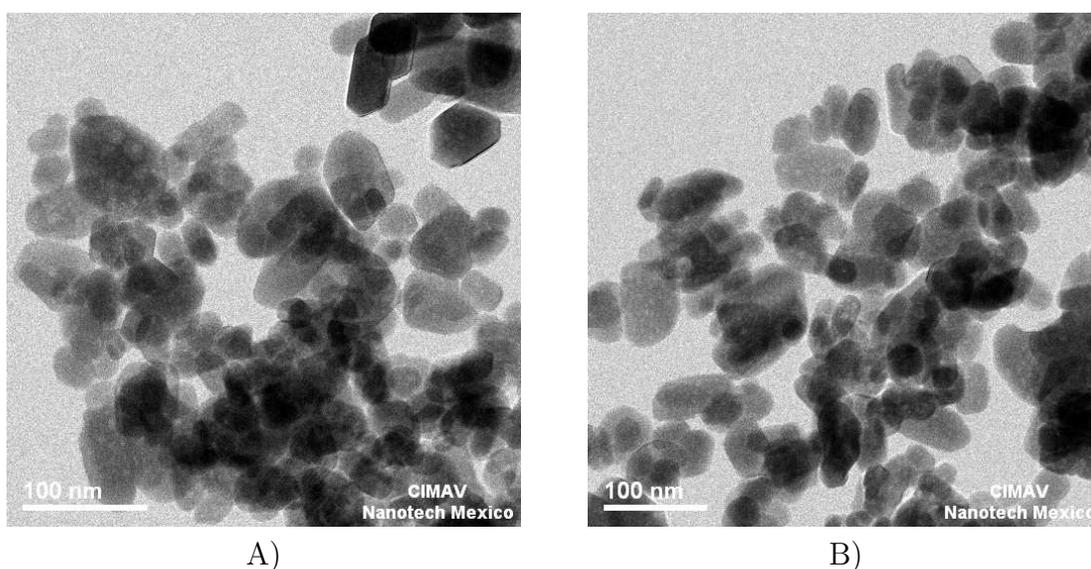


Figura 12.1: Micrografía del control de la cepa Y16B (TEM).

Durante la evaluación citotóxica pudimos apreciar que hubo una precipitación de las nanopartículas en el medio acuoso dado que las ZnO NPs tienden a aglomerar y precipitar en medios líquidos [2], lo que disminuyó el contacto NP-microorganismos. La confirmación de la citotoxicidad generada por las ZnO NPs se hizo utilizando solamente la cepa de levadura nombrada Y16B con estudios de SEM y EDX, detectando una posi-

ble interacción del Zn con los componentes de la membrana celular. El daño se evaluó con diferentes concentraciones de NPs obteniéndose que a 1,000 y 3,000  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  hay una inhibición del crecimiento, que se adjudica a que como lo menciona Cañizares-Villanueva (2000) que las levaduras actúan como un bioadsorbente por medio de la membrana celu-

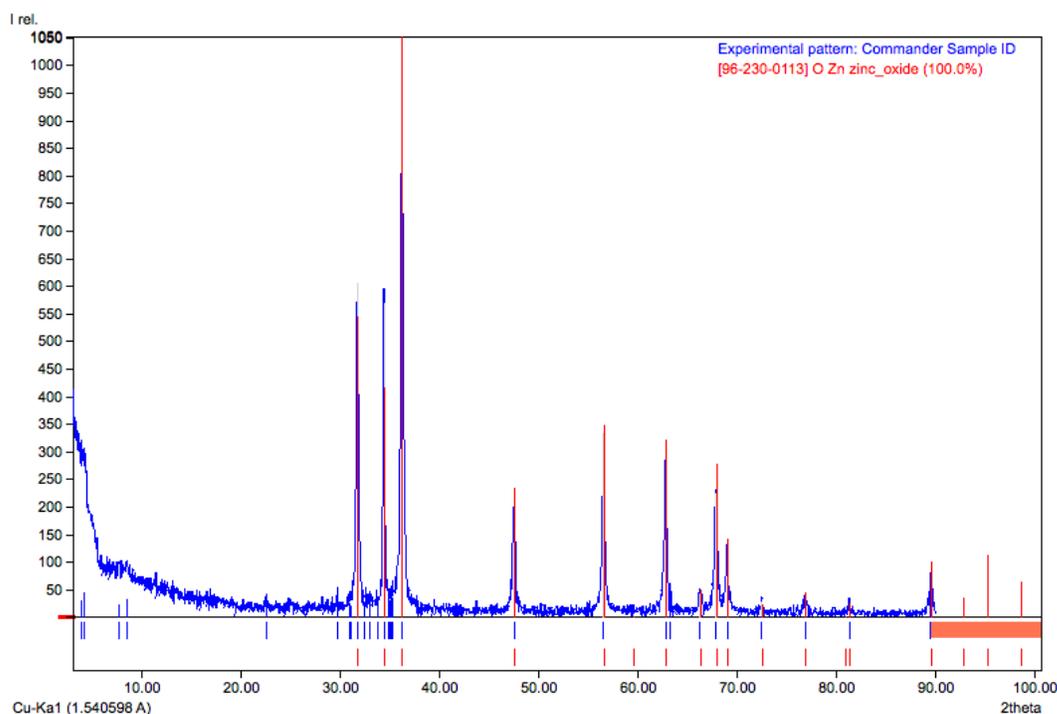


Figura 12.2: Análisis de difracción de Rayos X.

lar, en este caso puede que haya ocurrido una saturación del metal en esta capa de la levadura. Sin embargo, a  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , de acuerdo a las micrografías obtenidas por el estudio de SEM se observa que aun hay reproducción celular y una excretación mayor de lo que se infiere una capa de exopolisacáridos, que es producida de manera normal como se observa en el control debido a la presencia de dextrosa, pero el aumento de esta secreción se debe también a un mecanismo de protección o a una respuesta al estrés, condiciones de cultivo, edad y a modificaciones genéticas. La variación de la composición de los exopolisacáridos depende de la situación en que se encuentre la cepa y además esta variación se ve envuelta en la resistencia de la célula a

la ruptura mecánica o enzimática y a la acción de los antibióticos [1].

De la no inhibición del crecimiento y el aumento de éste en comparación con el control se puede decir que hay una relación directa con el Zn donde esta actuando como un cofactor de crecimiento [3]. El resultado arrojado por el EDX nos mostró que en la pared celular de la levadura si existe una presencia de Zn, por lo que se puede decir que hay una relación donde las NPs están quedando atrapadas en ésta como es descrito por Aguilar Uscanga, B. (2005) que la pared celular tiene una función de protección para la célula de los ataques enzimáticos, proporcionando principalmente estructura y forma a la célula teniendo un comportamiento igual al de un filtro [1].

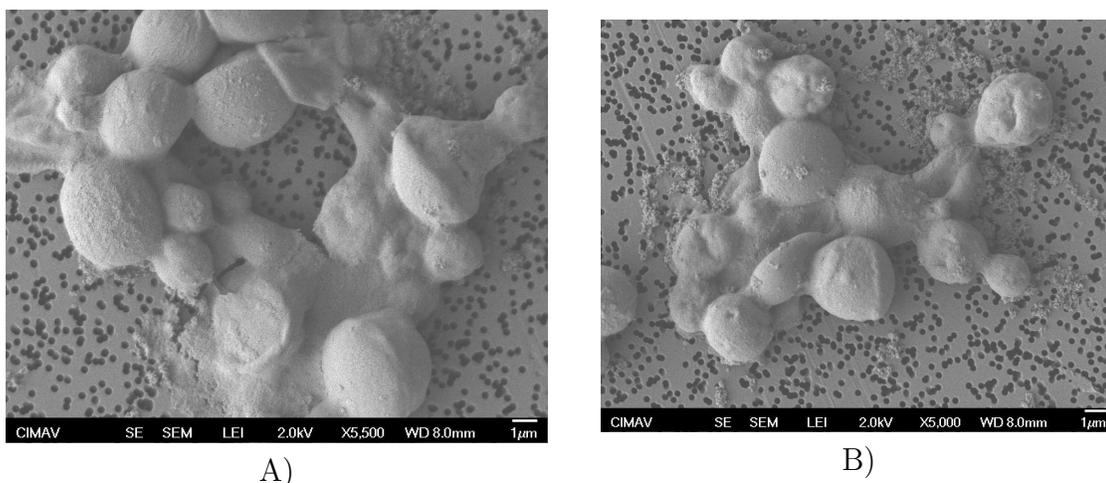


Figura 12.3: Micrografía de ZnONPs en TEM.

En la Figura 12.3 A y B se observa el control de la cepa de la levadura identificada como Y16B sin exposición a ZnO NPs. La Figura 12.4 A y B muestra el daño ocasionado por una concentración de  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ZnO NPs. En la micrografía 12.4 A también se observa un incremento en la secreción de lo que se

inferire un exopolisacárido. No se observaron cambios morfológicos significativos. Además de unos cristales de gran tamaño que pueden deberse a residuos del ARS o a alguna reacción que se esté llevando a cabo entre el medio y las ZnO NPs.

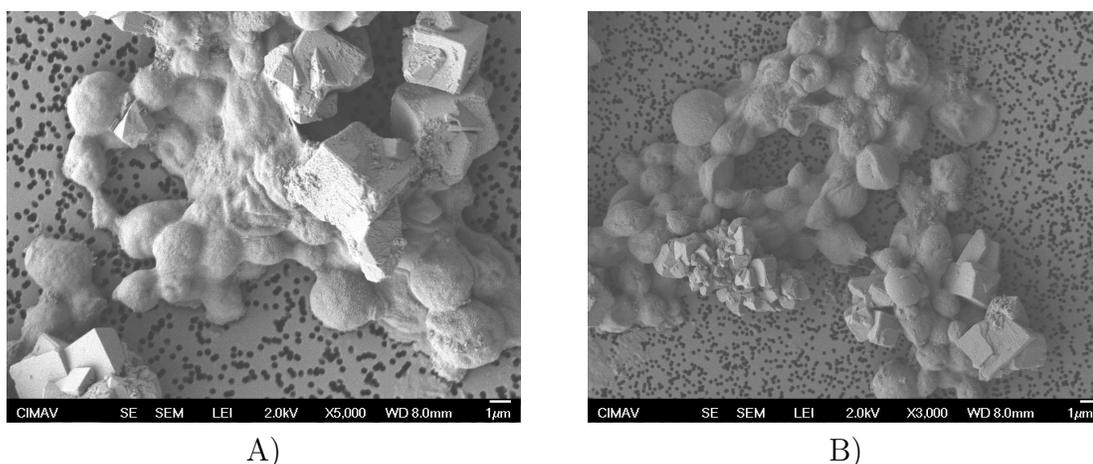


Figura 12.4: Micrografía de la cepa Y16B expuesta a una concentración de  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ZnO NPs.

En la Figura 12.5 se muestra el espectro correspondiente al análisis elemental

de EDX donde se observa la presencia de Zn y O asociada a la pared celular.

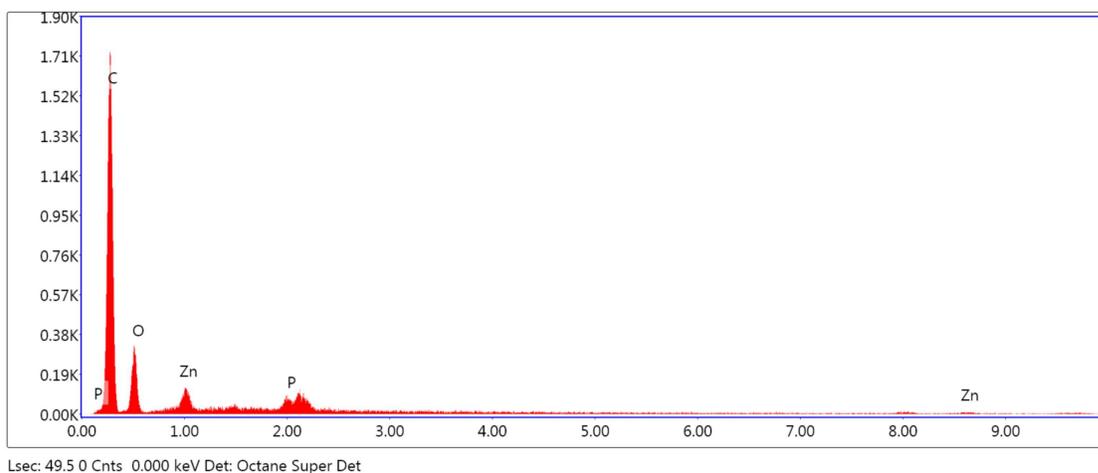


Figura 12.5: EDX de Ceba Y16B expuesta a una concentración de  $500\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ZnO NPs.

## CONCLUSIONES

Como resultado de la caracterización de las ZnO NPs el XRD arrojó un resultado de una alta cristalinidad y cuando se comparó con un difractograma patron del ZnO se observó que nuestro material si estaba compuesto unicamente de O y Zn. Por otro lado se obtuvo que las NPs no era uniformes y que su tamaño variaba de entre un rango de 30 a 100 nm.

De la evaluación de la toxicidad de las ZnO NPs a diferentes concentraciones ( $500\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $1,000\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $3,000\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) sobre la cepa de levadura, se obtuvo que a  $500\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  hubo un potencionamiento del crecimiento celular, notificando eso con la presencia de un número mayor de células a esta concentración en comparación con las que se encontraban en el control, también fue observada una secreción mayor de lo que se infiere una capa de exopolisacáridos, que es producida de manera natural por las células de levadura. Por otro lado, el EDX detectó la presencia de Zn en la pared celular del microorganismo, lo

que nos dice que si hay una interacción directa con el microorganismo y que las células están actuando como un biadsorbente como ya ha sido reportado en otras investigaciones.

A concentraciones mayores como lo es  $1,000\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $3,000\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  existe una inhibición del crecimiento por lo que podemos decir que hubo un efecto fungicida y que posiblemente se deba a una saturación de Zn en las paredes de la levadura.

## AGRADECIMIENTOS

A CIMAV, Chihuahua por el apoyo para el uso de sus instalaciones y las micrografías de SEM y TEM, a la Dirección de apoyo a la Investigación y al Posgrado (DIAP, UGTO) por la beca otorgada (proyecto “Impacto de NPs metálicas sobre la biodiversidad bacteriana”) a CONACyT por el apoyo financiero al proyecto C0010 2011 010 CNPQ 175089 y a la Universidad de Guanajuato por el impulso a la investigación.

## REFERENCIAS

- [1] Aguilar Uscanga, B. et al (2005) Estudio de la variación de la composición de los polisacáridos contenidos en la pared celular de la levadura *Saccharomyces Cerevisiae*. e-Genesis, Revista Digital Científica y Tecnológica. 1-8.
- [2] Amelia, C. H., et al. (2014) An approach to the mechanism of the cytotoxic effect of Silver and Zinc Oxide Nanoparticles. En revisión. 1-20.
- [3] Cañizares-Villanueva, R. O. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. Revista Latinoamericana De Microbiología 42(3), 131-143.
- [4] Gutierrez-Praena, D. et al (2009). Nuevos riesgos tóxicos por exposición a nanopartículas. Revista de Toxicología, 26(2-3), 87-92.
- [5] Hernández, J. M. G. (2013) Aplicaciones médicas y efectos tóxicos de nanopartículas de ZnO, TiO<sub>2</sub>, Ag y nanotubos de carbono, Tesis doctoral. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, 9-127.
- [6] Stephen J. Klaine et al. (2008) Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability and effects. Environment Toxicology and Chemistry, Vol. 27, N 9, 1-23.
- [7] Vilaseca, M. M. (2001). Observación microscópica de fangos activados en los tratamientos de depuración biológica. Boletín Intertex (UPC), 67-72.



## 13. CONCRETO HIDRÁULICO CON PET DE BOTELLAS

*Chávez-Valencia, L.-E.<sup>1</sup>✉; Ruiz-Jaime, C.-L.<sup>2</sup>; Sánchez-Cadena, L.-E.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>PTC en DI-CGT de la Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Mexico,

<sup>2</sup>T.A. del Departamento de Ingeniería Civil Di-CGT de la Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México.

*Av. Juárez 77 Centro, Guanajuato, Gto. México*

e-mail: <sup>1</sup>✉[lechavez@ugto.mx](mailto:lechavez@ugto.mx)

### ABSTRACT

*This work was aimed to study the possibility for polyethylene terephthalate recycled for use in the manufacture of materials, this being a waste that is generated in abundance by the food industry. In this research the PET was incorporated in concrete for construction materials. Holcim-Apasco brand cement and raw PET with mesh particle size 9.5 mm was used. The PET was added at 10 wt%. The compressive strength was determined in cylinders with 30 cm of height and 15 cm of diameter. The average values for compressive strength are 20 MPa for the reference, 22 MPa for PET of 9.5 mm.*

*In developing this project, we observed that it is feasible to use raw PET as a substitute raw material in the concrete considering that the mechanical properties obtained, which meet the limits of ACI 211.11 [1].*

**Keywords:** *Recycled PET, Concrete, Mortar.*

### RESUMEN

El objetivo del presente proyecto de investigación fue evaluar la factibilidad del empleo del politereftalato de etileno (PET) en la elaboración de materiales de construcción al ser incorporado al concreto hidráulico. El PET es un residuo generado en abundancia por la industria alimentaria, siendo empleado como materia prima de tamaño de partícula malla 9.5 mm, junto con el cemento de la marca Holcim Apasco. El PET se incorporó en un 10% en peso y se evaluó la resistencia a la compresión en cilindros de 30 cm de altura por 15 cm de diámetro, obteniéndose resultados de 20 MPa para la referencia y 22 Mpa para el PET de malla 9.5 mm.

En el desarrollo de este proyecto, se observó que es factible el uso de PET en bruto como sustituto del concreto teniendo en cuenta que las propiedades mecánicas obtenidas, cumplen con los límites de la ACI 211.11 [1].

**Palabras clave:** *PET reciclado, concreto, mortero.*

### INTRODUCCIÓN

Muchos de los materiales que utilizamos y desechamos cotidianamente son plásticos, los cuales, pertenecen a una categoría de materiales más amplia, que

son los polímeros, quienes se caracterizan por ser moléculas muy grandes y se forman por la unión química de muchas moléculas pequeñas (monómeros). Las propiedades físicas y químicas de los

polímeros son completamente diferentes a las de los monómeros que los formaron originalmente [2].

Un plástico (polímero) de uso muy difundido como es el PET, es utilizado para la fabricación de botellas para gaseosas, debido a que se le considera no reactivo y no tóxico, por lo que se utiliza habitualmente para envasar bebidas y alimentos. Este plástico tiene el nombre técnico de poli(etilentereftalato), comúnmente se le conoce como poliéster (como el utilizado en forma de fibra textil) o por sus siglas PET. Así pues, el PET consiste de cadenas muy largas compuestas por cientos de estas unidades (n unidades), similarmente a una cadena muy larga que está formada de muchos eslabones. A pesar de ser considerado no tóxico, potencialmente representa un peligro si no es desechado de manera adecuada. Además de ocupar espacio en los rellenos municipales, si es incinerado puede producir sustancias sumamente tóxicas, como por ejemplo, dioxinas.

Hoy en día muchos plásticos son reciclados físicamente, para ello, generalmente son recolectados, lavados y molidos. Una vez molidos se les calienta (funde) y se le da la forma que se desea para su nueva aplicación. Este proceso es relativamente sencillo, pero no puede aplicarse a todos los plásticos ni realizarse numerosas veces, los plásticos reciclados son de menor calidad que el material nuevo (material virgen). Cada vez que el material es reciclado sufre un proceso de degradación que disminuye sus propiedades. Además, el reciclaje físico requiere que el material se encuentre libre de impurezas y contaminación, no sólo de sustancias tóxicas o peligrosas, sino también de otros plásticos o mate-

riales. Este es uno de los inconvenientes más grandes para lograr un buen reciclaje físico, la separación de los materiales.

Como una alternativa al reciclaje físico se puede realizar el reciclaje químico, el cual, a diferencia del primero, implica cambios en la estructura química del material. El reciclaje químico, al basarse en una reacción química específica, no necesita los complicados pasos de purificación que son indispensables para el reciclaje físico. Además, permite utilizar al desecho plástico como fuente de materia prima, no sólo para producir nuevamente el material original (como material virgen), sino producir otros materiales con diferentes características.

Debido a su amplio uso existe un creciente interés por aprovechar los desechos de PET. Una alternativa es reciclar químicamente este plástico desechado para fabricar un material con aplicación en el campo de la construcción. En resumen, la idea es descomponer químicamente el PET, es decir, romper la cadena para obtener sus eslabones separados. Estos eslabones son utilizados para formar una nueva cadena, diferente de la anterior (PET). Esta nueva cadena tiene la particularidad de poseer algunos eslabones que pueden unirse a otros tres (en vez de sólo a dos), Esta nueva cadena se llama poliéster insaturado. Esta nueva característica de las cadenas hace que todas las cadenas puedan unirse formando una especie de red tridimensional (este proceso de unión de cadenas se conoce como entrecruzamiento o curado). El resultado es una estructura o matriz muy grande, interconectada y muy fuerte. Si por ejemplo, esta matriz es rellenada con arena o grava, el producto final es una especie de concreto cuyo “pegamento” o

aglutinante es un polímero (en vez de cemento en el caso de concretos tradicionales). A este concreto lo llamamos concreto polimérico.

Este concreto polimérico posee propiedades diferentes a las del concreto convencional. Comparado con el concreto de cemento Portland los productos de concreto polimérico son de 3 a 5 veces más fuertes, mucho más resistentes a la absorción de humedad y presentan mayor capacidad de absorción de energía de impacto. Además, puede dársele propiedades según las necesidades de cada aplicación. En el presente trabajo se elaboró concreto con PET reciclado y se midió sus propiedades mecánicas.

## METODOLOGÍA

El cemento debe colocarse con la cantidad mínima de agua de mezclado compatible con su manejo adecuado, ya que ello tenderá a mejorar ampliamente su resistencia, durabilidad y otras propiedades deseables. El proporcionamiento [3] debe seleccionarse para producir un concreto: de la resistencia más seca (menor revenimiento) que pueda colocarse efectivamente hasta obtener una mezcla homogénea, con el tamaño máximo de agregado disponible económicamente y compatible con su colocación satisfactoria, de durabilidad adecuada para resistir satisfactoriamente el intemperismo y otros agentes destructores a que puedan estar expuestos y de la resistencia requerida para soportar sin peligro de falla por cargas que le serán impuestas [4].

El método ACI 211.11 fue empleado para determinar la dosis de las materias pri-

mas encontrando que para un cilindro con volumen de 5.3 litros se requiere 1.28 kg de cemento, 3.05 kg de arena, 5.38 kg de grava, 0.91 litros de agua para una resistencia de proyecto de 150 kg/cm<sup>2</sup>, así mismo se le adición un 10 En la metodología del American Concrete Instituto se establece la secuela para la elaboración, el curado y la determinación de las propiedades en estados fraguado. Para los cual se someten a carga los cilindros de concreto hidraulico en una maquina universal de pruebas marcar Forney. Con los datos del area real del cilindro y la carga que soporta hasta la falla se determina su resistencia a compresion simple.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 13.1 muestra los resultados de las muestras patrón y del concreto con PET.

De esa misma tabla, se puede observar que la presencia de PET incrementa la resistencia a compresión simple del concreto y que ambos resultados son mayores a la resistencia de proyecto. Además, hubo pequeños errores en las arenas y gravas, ya que algunas partes de los depósitos estaban húmedas y otras secas, y como no cuarteamos y revolvi- mos bien antes de hacer las estimaciones, no se tomó en cuenta el agua que había de más, es por eso que hubo una variación en los cilindros de PET, mismo que había mucha diferencia en los revenimientos. También no se tomó en cuenta la humedad con la que ya contaba la maquina revolovedora, ya que por cada uso, se tenía que lavar, entonces hubo variaciones de agua.

Tabla 13.1: Resultados de las propiedades mecánicas de las muestras

No. Prueba	Patrón 1	Patrón 2	Patrón 3	PET 1	PET2	PET 3
Peso del cilindro (Kg)	11.91	11.85	11.96	11.83	11.84	11.87
Diámetro del cilindro (cm)	15.0	15.0	15.0	14.9	14.9	14.8
Altura cilindro (cm)	30.0	30.0	30.0	29.8	30.0	29.4
Resistencia (Mpa)	19.87	20.12	20.0	22.3	22.3	21.7
Tipo de familia	4	2	1	4	7	2

## CONCLUSIONES

Podemos llegar a la conclusión de que el concreto con base a PET es funcional, y puede llegar a utilizarse en obras de infraestructura ya que es bajo en costo y le confieren una mayor resistencia.

## REFERENCIAS

- [1] Eichhorn, S.J. 2003 ). Composites Science and Technology. 63 :1225-1230 .
- [2] Halpi, J.C., Tasai, S.W. 1976. Enviornmental factors in composite materials design. Air Force Material Laboratory Technical Report. AFML-TR-67-42.
- [3] Saad Felix, M.A., Mayor Gonzalez Orus Asso. Materiales de Construccion Tomo I y II Serie Schaum. 4 edicion. 1997.
- [4] American Society for Testing and Materials. 2000. Annual Book of ASTM Standards. Section Four. Construction. Volume 04.03. Roads and paving material; vehicle-pavement systems.

## 14. PAPERCRATE

*Chávez-Valencia, L.-E.<sup>1</sup>✉; Saucedo-Estrada, C.-A.<sup>2</sup>; Mendoza-Puga, L.-E.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>PTC en DI-CGT de la Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México,

<sup>2</sup>Alumno del PE de Ingeniería Civil Di-CGT de la Universidad de Guanajuato,  
Guanajuato, México.

*Av. Juárez 77 Centro, Guanajuato, Gto. México*

e-mail: <sup>1</sup>✉[lechavez@ugto.mx](mailto:lechavez@ugto.mx)

### ABSTRACT

*This work focused on developing a feasible to meet the minimum requirements for certain fields of society contemplating the idea of creating new materials from existing care over-exploitation of our environment, is give you what you already use It served its useful life, use it and improve it for better quality in the material; but with an exploratory approach, in this study the idea that only determine the characteristics of the solution to be implemented, and despite already has some history of or the materials used in this paper, it is introduced to the work contemplated the idea why not do a little better or strengthen the use and implementation. In this paper, blocks papercrate and in combination with titanium dioxide were prepared, to be applied in mortar and flattened, the preliminary results suggest its implementation as a alternative construction material.*

**Keywords:** *Papercraft, mortar, flattened*

### RESUMEN

El presente trabajo se enfocó en un desarrollo factible para cubrir los requisitos mínimos para algunos campos de la sociedad contemplando la idea de generar nuevos materiales a partir de los ya existentes cuidado una sobre explotación de nuestro entorno, es decir darle un uso a aquello que ya cumplió su vida útil, emplearlo y mejorarlo para una calidad mejor en el material; aunque con un enfoque exploratorio, en este estudio se contempló la idea de que solo determinar las características de la solución a implementar, y a pesar de que ya se cuenta con algunos antecedentes del o los materiales a emplear en el presente trabajo, se introduce al trabajo la idea de por qué no hacerlo un poco mejor o reforzar el uso y aplicación del mismo. En el presente trabajo se elaboraron bloques de papercrate y en combinación con el Dióxido de Titanio, con aplicación a mortero y aplanado, cuyos resultados preliminares, sugieren su implementación como material de construcción alternativo.

**Palabras clave:** *Papercrate, mortero, aplanados*

### INTRODUCCIÓN

La sustentabilidad es uno de los temas de importancia de la cultura de nuestro tiempo y plantea las soluciones a dile-

mas a los que nos enfrentamos. El problema de la sustentabilidad del desarrollo nos remite a aquella contradicción entre necesidades humanas, las capacidades del mundo natural en el cual coexistimos, el

entorno a través del tiempo, y de las consecuencias que de ello se derivan para ambos [1].

La esencia de la sustentabilidad no es nueva, es un antiguo principio de la cultura humana y del comportamiento animal. Sin embargo, el crecimiento demográfico y la capacidad tecnológica desarrollada por el hombre ha tenido efecto en el consumo de los recursos naturales. La sobreexplotación de estos recursos ha tenido consecuencia desastrosas, ejemplo de ello, son las reservas forestales del mediterráneo, aniquiladas por los fenicios que utilizaban grandes cantidades de madera para la construcción de naves. En nuestro país una hipótesis dice que el esplendor de la civilización maya decayó al rebasarse los límites sustentables de la selva que mantenía a la población [2].

Actualmente, el papercrete se ha utilizado en la construcción de pequeños proyectos constructivos como casas y pequeños edificios comerciales, es importante señalar, que no debe emplearse como muro de carga, sin embargo, su fuerza en la estructura del modelo ha sido probado, además de que, hay poca evidencia de su durabilidad a largo plazo [3]. En el presente proyecto de investigación se realizó el reciclado del papel, el cual, se mezcló con arena, cemento y óxido de titanio, para ser empleado como material no estructural.

## METODOLOGÍA

1. Desgarrar en tiras el papel a emplear, ya sea manual o con recicladora de oficina. Colocar en un balde de una profundidad aproximada de 10 a 15 cm, dependiendo de la cantidad de mortero a elaborar.

2. Adicionar agua, manteniendo un tirante de 5 cm, dejar en reposo aproximadamente 10 a 20 minutos, con la finalidad de que el papel o cartón empleado absorba la mayor cantidad de agua y se facilite su mezclado.

3. Emplear broca y taladro eléctrico, para realizar la mezcla, con movimientos circulares hasta lograr la desintegración del papel, cuidando que el proceso sea uniforme, hasta obtener la consistencia similar al de una pulpa y facilite su manipulación.

4. Obtenida la pulpa, se adiciona 5 Kg de arena y 5 Kg de cemento CPC 30R CEMEX, se revuelve la mezcla de manera uniforme con la ayuda de una pala o cucharón hasta lograr una consistencia espesa, con poco asentamiento y humedad.

5. Para realizar los ladrillos de papel con óxido de titanio, se repiten los pasos 1 al 4. Al momento de adicionar el cemento y la arena se coloca una cantidad de aproximadamente 15 ml de dióxido de titanio sobre la mezcla y se agita hasta lograr la uniformidad del material.

Una recomendación muy simple para saber si la preparación anterior tiene la consistencia adecuada, es a través del empleo de un vaso de cristal, el cual, se llena con la mezcla y se coloca sobre una superficie plana y lisa, se levanta el vaso de la placa y se observa la muestra y su movimiento, un lote utilizable conservará la forma del vaso sin desmoronarse.

Obtenida la mezcla con la consistencia adecuada, se vierten en dos moldes previamente impregnados con diesel para evitar que se adhiera la preparación al molde una vez seco el papercrete. Se recomienda secar al sol por espacio de una hora aproximadamente.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los bloques que se habían empleado como pruebas piloto, los que no contenían el Dióxido de Titanio, fueron los que presentaban más rastros de lo que aparentemente es moho, e incluso presentaban crecimiento de musgo, lo que indica que la humedad que se le estaba suministrando era apropiada, pequeños rastros de moho negro y manchas color verdoso son las características princi-

pales que presentaban los bloques lo que aparentemente se podría tomar como algo relevante para la conclusión del proyecto (Figura 14.1). En los bloques a los cuales se les agregó el Dióxido de Titanio presentaban una casi nula presencia de moho, en solo uno se apreciaba que comenzaba con la aparición, sin embargo solo eran mancha de color oscuro, sin llegar a la tonalidad café o verdosa que tiene el moho (Figura 14.2)

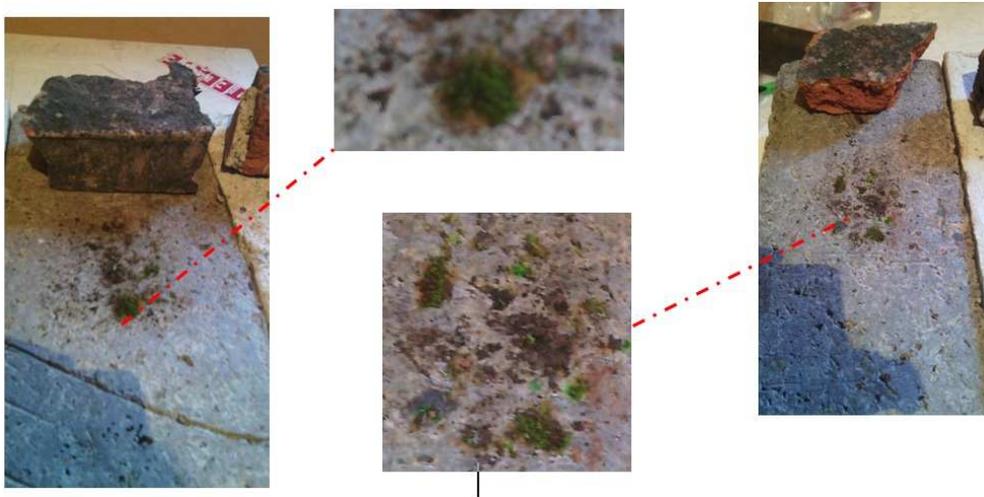


Figura 14.1: Bloques de papercrate sin óxido de titanio.



Figura 14.2: Bloques de papercrate con óxido de titanio.

Los bloques que se emplearon tenían un aspecto como el de un block, sin embargo, los resultados que arrojaron fueron un poco inesperados, ya que dentro del proceso de elaboración y determinación de los métodos para la elaboración del papercrate se contempla una incertidumbre a considerar pues es la primera vez que se implementa de esta forma y pues no como en realidad se hace generalmente a base de vibrocompresin.

Por el análisis de estos resultados solo de aspecto cualitativo, se observan las muestras empleadas y el resultado es que el objetivo del proyecto, el papel se puede reciclar y la presencia de organismos disminuy, como se planteó en un inicio del trabajo pues los resultados aunque no satisfacen del todo nuestro planteamiento nos dejan con un buen resultado para ser la primera implementación de esto y una gran nicho de oportunidad.

## CONCLUSIONES

Al culminar el proyecto, nos podemos dar cuenta de que el papercrate si es factible con lo que es la construcción sustentable, pues, como ya se sabe a pesar de que no es para diseño estructural, recibe muy bien la edificación de una pequeña casa habitación. El resultado que nos arrojó la adición del dióxido de titanio fue muy bueno, pues las propiedades limpiantes y

sépticas que posee esta sustancia; si bien no elimina al 100% el moho ni el óxido o el smog, se puede contemplar que al menos disminuye su crecimiento de organismos como los anteriores, lo cual ya es de importancia y relevancia para el presente trabajo. Si bien, se contempla que al momento de su realización hubo incertidumbre respecto a ciertos materiales, usos y posible manipulación de los mismo, lo cual puede repercutir en los resultados, ya sea en la elaboración, en la supervisión o simple y sencillamente al momento de la observación, sin embargo, el resultado que arrojó el experimento es satisfactorio de acuerdo a las expectativas iniciales planteadas.

## REFERENCIAS

- [1] Almagro Vazquez Francisco y Venegas Martinez Francisco, (2009) Crecimiento y desarrollo con Sustentabilidad Ambiental, México. Economía y Sociedad., XIV(23), 79-103.
- [2] Stoeglehner, G. y G. Wegerer (2006), The sea-Directive and the seaProtocol Adopted to Spatial Planning, Similarities and Differences, Environmental Impact Assessment Review, 26, pp. 586-599.
- [3] Vazquez Narvaez Yolanda (2012) El reciclaje: una opción para minimizar la generación de residuos sólidos urbanos domiciliarios. DELOS: Desarrollo Local Sostenible., 5(15), 1-5.

## 15. MICROORGANISMOS NATIVOS EN UN PROCESO DE BIOLIXIVIACIÓN PARA RECUPERACIÓN DE PLATA A PARTIR DE RELAVES MINEROS CON ALTO CONTENIDO DE MANGANESO

*Huerta-Rosas, Brenda*<sup>1</sup>; *Cano-Rodríguez, I.*<sup>1</sup>✉; *Gamiño-Arroyo, Z.*<sup>1</sup>;  
*Gómez-Castro, F.-I.*<sup>1</sup>; *Carrillo-Pedroza, F.-R.*<sup>2</sup>; *Romo-Rodríguez, P.*<sup>3</sup>;  
*Gutiérrez-Corona, F.*<sup>3</sup>; *Santiago-Sernas, P.-I.*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Guanajuato, DCNE, *Noria Alta S/N, Guanajuato, Gto., 36050, México.* <sup>2</sup>Facultad de Metalurgia, Universidad Autónoma de Coahuila, *Monclova, Coahuila, 25710, México.* <sup>3</sup>Departamento de Biología, Universidad de Guanajuato, Campus Guanajuato, DCNE, *Noria Alta S/N, Guanajuato, Gto., 36050, México.*

e-mail: ✉[irene@ugto.mx](mailto:irene@ugto.mx)

### ABSTRACT

*An alternative to reduce the environmental impact and costs generated by the use of toxic chemicals using when the metals were extracted in the mining industry, is to use processes involving microbial activity to accelerate the metals dissolution reactions. However, before used it as bioleaching agents, is required to isolate the native microorganisms, enrich and identify them in a selective media. In the case of bioleaching silver from mine tailings with a high concentration of manganese, three kind of filamentous fungi and two of bacterial stains were isolated on minimal medium 9K. The presence of *Cladosporium sp* and *Penicillium chrysogenum* fungi and coconuts type bacteria have been identifying. Those microorganisms have leached approximately 38.3% of total silver and 3.8% manganese. The identification was performed by sequencing of the ITS-1-ITS-2 segment of the genome coding region in ribosomal RNA.*

**Keywords:** *Biotechnology, Mining Tailings, Bioleaching, Fungi, Bacteria.*

### RESUMEN

Una alternativa para disminuir el impacto ambiental y costos generados por el empleo de sustancias tóxicas cuando se extraen metales en la industria minera, es utilizar procesos que involucran actividad microbiana para acelerar las reacciones de la disolución de metales. Sin embargo, previo a su uso como agentes biolixiviantes, se requiere aislar los microorganismos en sus sustratos nativos, enriquecerlos en medios selectivos e identificarlos. En el caso particular de la biolixiviación de plata a partir de relaves mineros con un alto contenido de manganeso, se logró aislar en el medio mínimo 9K tres tipos de hongo filamentosos y dos cepas de bacterias. Los hongos fueron identificados similares al género *Cladosporium sp* y *Penicillium chrysogenum* y bacterias tipo coco que lograron lixiviar aproximadamente el 38.3% del total de la plata y el 3.8% de manganeso. La identificación se realizó mediante secuenciación del segmento ITS-1-ITS-2 de la región del genoma codificante del RNA ribosómico

**Palabras clave:** *Biología, relaves mineros, biolixiviación, hongos, bacterias.*

## INTRODUCCIÓN

La contaminación de suelos por actividad minera en México se genera durante el ineficiente proceso de beneficio del oro y la plata. Realizado comúnmente por amalgamación con mercurio y por cianuración. En ninguno de los dos casos es posible la recuperación total de los compuestos y/o elementos adicionales, por lo que es común encontrarlos en los residuos del proceso (relaves) en forma soluble [1]. Otra problemática es la característica recalcitrante del mineral, lo cual ocasiona que el método de recuperación a través de cianuración sea poco óptimo [2]. Debido a esto, la industria minera está en constante búsqueda de métodos menos contaminantes y de bajo costo para la extracción de metales, ya que se ha observado que los métodos convencionales generan altos costos en lo económico y ambiental. En las últimas décadas, la biolixiviación se ha considerado una tecnología metalúrgica verde con características de menor costo de operación, menor inversión en infraestructura y mayor recuperación. Dicho proceso consiste en la extracción de metales contenidos en diferentes tipos de minerales por la acción de ciertos microorganismos [3]. Este proceso surge como alternativa de los procesos químicos habituales, sobre todo, para ser aplicado en minerales de baja ley o en los desechos resultantes de la extracción convencional de minerales con alto contenido de metal.

## OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es aislar microorganismos nativos que pueden estar presentes en relaves mineros con alto con-

tenido de manganeso y plata y que a su vez pueden participar como agentes biolixiviantes para la recuperación de plata.

## METODOLOGÍA

La muestra sólida fue tomada de los relaves mineros de una mina de extracción de plata ubicada en el estado de Coahuila al norte de México. Estos relaves presentan contenido de manganeso y plata.

### Caracterización parcial

La plata detectada en los relaves mineros en estudio está en forma de inclusión en tamaños menores de 1-5 micras en óxidos de manganeso. Una previa caracterización química determinó que los relaves están altamente oxidados.

### Determinación Mn y Ag

La muestra del relave minero se sometió a una digestión ácida colocando 1 g de la muestra en un tubo para digestión, a la que se le adicionó 3 ml de  $\text{HNO}_3$  y 2 ml  $\text{HCl}$ . Posteriormente el tubo con la muestra y los ácidos se colocaron en un reactor de digestión (Hanna Instruments, Modelo C 9800) durante 30 min a  $105^\circ\text{C}$ . Posteriormente se agregó 1 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  dejándolo en calentamiento por otros 30 min a  $105^\circ\text{C}$ . Al finalizar el calentamiento la solución se filtró, y en la solución se determinó la concentración de plata y manganeso por Espectroscopía de Absorción Atómica (EAA) en un equipo Perkin Elmer, AAnalyst 100, previa elaboración de una curva de calibración con estándares conocidos.

### **Biolixiviación de Mn y Ag en sistema por lote**

Muestras de relaves mineros se sembraron por duplicado en 250 mL de medio de cultivo líquido 9K con la siguiente composición:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 3 g/L;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.5 g/L;  $\text{MgSO}_4$ , 0.5 g/L;  $\text{KCl}$ , 0.1 g/L;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0.01 g/L;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  40 g/L y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado para ajustar a pH 2.5 [4]. El medio inoculado se mantuvo en agitación a 200 rpm en un agitador orbital durante 21 días a 27 °C, después de este tiempo se colectaron muestras de la solución, se filtraron y As y Mn se cuantificaron por EAA. De este crecimiento, también se inoculó en medios de cultivos sólidos 9K en caja Petri, estas fueron incubadas, durante tres días a 27 °C. Se realizó una resiembra por la técnica de dilución por estría en medio sólido 9K y PDA (Agar Papa Dextrosa) y se incubaron durante tres días. Después de la incubación se tomó una muestra de una colonia para su observación microscópica.

### **Aislamiento de hongo filamentoso que participa en el proceso de biolixiviación**

Finalizando el tiempo de incubación de la resiembra en medio 9K sólido, durante tres días a 27 °C, se tomó una muestra con una asa de platino esterilizada, se aísla por la técnica de siembra de dilución por estría en placa de PDA y se incuban durante 7 d a 27 °C. Para observar y diferenciar los microorganismos crecidos en PDA, se prepararon muestras de los cultivos antes mencionados y se observaron al microscopio óptico Axioskop 40 (ZEISS, Alemania) con un aumento real de 40X veces.

### **Aislamiento de bacterias que participan en el proceso de biolixiviación**

En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se agregó 115 mL de medio 9K esterilizando, posteriormente se añadieron 10 mL de la muestra que contiene relaves. El cultivo de interés, fue incubado 35 °C y 180 rpm. Los microorganismos se aislaron realizando resiembras cuando el medio haya virado a color rojizo (oxidación de hierro ferroso a férrico). A este tiempo se tomó una alícuota de 10 mL de la solución y se agregó nuevamente a un medio líquido 9K fresco. El procedimiento se repitió hasta obtener microorganismos completamente adaptados al medio, estimado a partir de un tiempo mínimo de vire al mínimo [5]. De este cultivo se tomaron muestra para realizar la tinción Gram [6]. Y visualización en un microscopio Axioskop 40 (ZEISS, Alemania) con un aumento real de 1000 veces.

### **Técnicas de biología molecular para identificación de microorganismos – Extracción de ADN genómico del hongo**

Para la extracción del ADN genómico, el micelio se colectó por filtración de cultivo de 12 h en medio PDB. El micelio se pulverizó en un mortero estéril empleando nitrógeno líquido y la extracción de ADN se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Aljabani y Martínez [7].

### **Amplificación del segmento ITS**

Se amplificó el fragmento de la de la región ITS ribosomal mediante la reacción en cadena de la

polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), empleando los oligonucleótidos universales: ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') e ITS2 (5'GCTGCGTTCTTCATCGATGC3') [8] y la enzima High Fidelity (Invitrogen), siguiendo las instrucciones establecidas por el proveedor Thermo Scientific. Los productos obtenidos de la amplificación se separaron en un gel de agarosa al 1%. La purificación de bandas se realizó usando el Kit GeneJET Gel Extraction de la marca Thermo Scientific, bajo las especificaciones del fabricante. Las bandas purificadas se introdujeron al plásmido pJET1.2/blunt utilizando el Kit CloneJET PCR Cloning de la marca Thermo Scientific, para realizar la reacción de ligación.

### **Transformación de *E. coli* por electroporación**

En microtubos estériles se mezclaron 20  $\mu$ l de células electrocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  con 3  $\mu$ l de la mezcla de ligación (manteniendo en hielo), esta mezcla se colocó en una celda BIO-RAD con 0.2 cm de separación entre electrodos. Las células fueron sometidas a un pulso eléctrico de 200 Volts, utilizando un electroporador Gen Pulser Xcell (BIO-RAD). Posteriormente las células se pasaron a un tubo Eppendorf, se les adicionó 1 ml de medio Luria Bertani (LB) y se incubaron a 37 °C durante 40 min; una vez transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugaron a 13,000 rpm durante 20 s y se eliminó el sobrenadante; las pastillas celulares se sembraron en placas de medio LB-agar adicionado con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina como marcador de selección y se

incubaron a 37 °C por 12 horas. Se recuperaron las colonias resistentes (presuntas transformantes).

### **Clonación**

Se seleccionaron colonias transformantes resistentes a ampicilina y fueron sembradas en medio LB/Amp a 37 °C y 200 rpm durante 12 h, se tomaron 1.5 ml del cultivo de bacterias en un tubo Eppendorf y se centrifugaron durante 2 min a 12 000 rpm. Se retiró cuidadosamente el sobrenadante (con micropipeta). La extracción de plásmido se realizó con el kit GeneJET Plasmid Miniprep, siguiendo las especificaciones del fabricante (Thermo Scientific). Cada transformante resistente a ampicilina se sometió al análisis de PCR para determinar la presencia de insertos de la región ITS ribosomal. Para ello se emplearon los oligonucleótidos pJET1.2 forward y pJET1.2 reverse que amplifican el fragmento ligado. El producto de amplificación se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v). Una vez purificados los plásmidos que contenían el fragmento de interés, se enviaron a secuenciar a la empresa Elim Biopharmaceuticals Inc. de California, Estados Unidos de América. A las secuencias obtenidas se les realizó un análisis bioinformático usando el programa megAlign DNASTAR de LaserGene, así como el servidor del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mediante el uso de la herramienta BLAST (Basic Local Alignment SearchTool).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización parcial

En la Tabla 15.1 se observa el resultado del análisis químico parcial de las principales especies minerales que conforma la muestra de relaves mineros. La presencia de manganosita provoca la naturaleza refractaria del mineral.

Tabla 15.1: Especies minerales principales en las muestras de relaves mineros

Espece mineral	%
Cuarzo	22.10
Hematita	15.40
Goetita	12.60
Manganosita	11.30

### Determinación de Mn y Ag

La cuantificación de la concentración total de manganeso (748.1 mg/L) y plata (1.4 mg/L) representa el límite máximo que se puede obtener de los elementos a monitorear. La alta concentración

de manganeso en la muestra de relaves provoca un comportamiento semejante al encapsulamiento del metal de interés causando la disminución de la eficiencia en la extracción de plata por los métodos tradicionales.

### Biolixiviación de Mn y Ag en sistemas por lote

Muestras de relaves mineros expuestas a los microorganismos nativos mostraron una disolución al medio de cultivo 9K de 0.55 mg/L de Ag y 28.04 mg/L de Mn, que representa el 3.8% y 38.3% respectivamente de la concentración total del relave minero.

### Aislamiento de hongo filamentoso que participa en el proceso de biolixiviación

Tres cepas participan en el proceso de biolixiviación en el medio mínimo 9K, dos cepas *Cladosporium sp.* (Figura 15.1) y la cepa *Penicillium chrysogenum* (Figura 15.2).



Figura 15.1: Conidióforo *Cladosporium sp.* en tinción lugol en campo claro



Figura 15.2: Conidióforo *Penicillium chrysogenum* en tinción lugol en campo claro

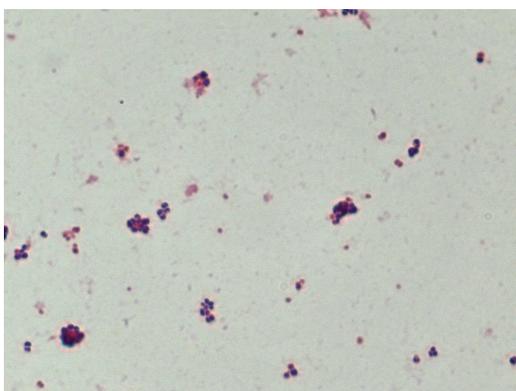
### Aislamiento de bacterias que participa en el proceso de biolixiviación

En la Figura 15.3 se muestra el resultado de la tinción Gram, observando bacterias Gram negativas en forma de Bacilos, presentes en el medio de 9K de-

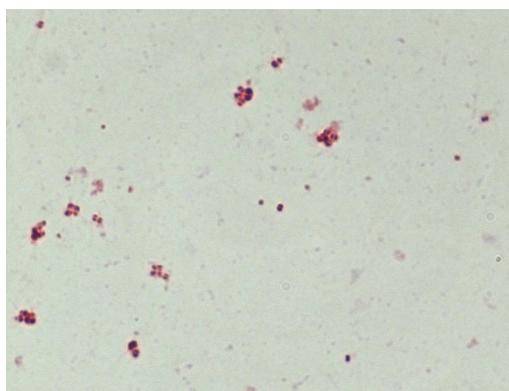
pués el enriquecimiento sucesivo para la adaptación de microorganismos. En la Figura 15.4, se observa la identificación de bacterias en forma de cocos Gram negativos y positivos, presentes en los relaves después de un sucesivo enriquecimiento con medio 9K.



Figura 15.3: Tinción Gram de Bacilos presentes en medio 9K en la biolixiviación.



a)



b)

Figura 15.4: Tinción Gram de Cocos a) positivo y b) negativo presentes en medio 9K después del enriquecimiento microbiano.

### Técnicas de biología molecular para la identificación de microorganismos

Para la identificación molecular de las cepas aisladas de los relaves, se amplificó un fragmento de aproximadamente 700

pb del la region ITS ribosomal. El análisis de las secuencias obtenidas, resulto en la identificación molecular de hongos filamentosos correspondientes a *Cladosporium sp* y *Penicillium chrysogenum*, con una identidad del 100% (Tabla 15.2).

Tabla 15.2: Identidad de los hongos filamentosos aislados

Aislado	Identidad	Porcentaje de identidad	Acceso
2L3	<i>Cladosporium sp</i>	100%	LN809014.1
1L3	<i>Penicillium chysogenum</i>	100%	LN809047.1

## CONCLUSIONES

Mediante la digestión ácida se detectó grandes cantidades de plata y manganeso en los relaves con concentración total de manganeso y plata de 748 y 1.4 mg/L respectivamente. Se lograron aislar dos cepas de hongos y dos cepas de bacterias nativas del relave minero. Se identificó microorganismos fungicos similares al género *Cladosporium sp.* y *Penicillium chrysogenum* y se obtuvieron dos cepas bacterianas del tipo Cocos y Bacilos que participan en el proceso de biolixiviación. La lixiviación de plata y manganeso por el consorcio microbiano obtenido del relave minero fue del 38% y 4%, respectivamente y comparando al relave estéril usado como control solo aportó 2% y 6%, de plata y manganeso, respectivamente.

## REFERENCIAS

- [1] Sánchez, L.E. (1995) *Manejo de residuos sólidos en minería*. Aspectos Geológicos de Protección Ambiental. Vol. I, UNESCO. 239-250.
- [2] Parga J. R. y Carrillo F. R (1995)

Avances en los métodos de recuperación de oro y plata de minerales refractarios, Revista de metalurgia , 254-261.

[3] Debaraj Mishra et al (2005) *Bioleaching: A Microbial Process of Metal Recovery*; A Review, Metals and Materials International., 11(3), 249-256.

[4] Silverman, M. P., y Lundgren, D. G.,(1958) *Studies on the chemoautotrophic iron bacterium Ferrobacillus ferrooxidans*. 642-647.

[5] Mishra, A. K., et al (1983) *Isolation of Thiobacillus ferrooxidans from Various Habitats and their growth pattern on solid medium*. Current Microbiology, Vol. 8, 147-152.

[6] Smith, A. y Hussey, M. (2005) *Gram Stain Protocols*, American Society for Microbiology.

[7] Aljanabi, S. M., y Martínez, I. (1997). *Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques*. Nucleic Acids Research, 25(22), 4692-4693.

[8] White, T.J., et. al (1990) *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.,315-322.



## 16. PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE SECRETABLE GOX ENZYME FROM Ed8 STRAIN OF *A. TUBINGENSIS*

*Flores-Amaro, Oscar-Abraham*<sup>1✉</sup>; *Romo-Rodríguez, Pamela*<sup>1</sup>; *Corrales-Escobosa, Alma-Rosa*<sup>2</sup>; *Wrobel, Kazimierz*<sup>2</sup>; *Wrobe, Katarzyna*<sup>2</sup>; *Villagómez-Castro, Julio-Cesar*<sup>1</sup>; *Gutiérrez-Corona, Félix*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología y <sup>2</sup>Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Campus Guanajuato, México.  
e-mail: <sup>1✉</sup>[ozckar\\_1603@hotmail.com](mailto:ozckar_1603@hotmail.com)

### ABSTRACT

Previous studies have shown that Ed8 strain of *Aspergillus niger var. tubingensis* has the capability to produce high levels of GOX activity in the extracellular space when cultured in minimal medium with low or high glucose concentration. Compared with the reference strains NRRL593 of *Aspergillus tubingensis* and FGSCA732 of *Aspergillus niger*; it was observed that the presence of citric acid (45 mM) increase the level of secretable GOX activity. It was also observed that these differences in GOX activity among the strains are not due to differences in the transcription of *goxC* or *gox2* genes. In the present work we describe the purification and characterization of the extracellular GOX enzyme from Ed8 strain. The extracellular GOX enzyme activity from Ed8 was purified from concentrates of the spent medium by a combination of chromatographic methods (ion exchange and molecular exclusion). The purified GOX enzyme from Ed8 was compared with the purified commercial GOX enzyme from *A. niger* analyzing different parameters: kinetic properties, effect of pH, buffer, temperature and metal ions, and the stability of the enzyme activity. The results showed that the purified GOX from Ed8 is more thermostable, higher affinity for glucose and has higher reaction rate than the commercial one. Finally, proteomic analysis by HPLC-ESI-QTOF of the spent medium allowed the identification of the GOX enzyme secreted by the Ed8 strain as a GOXC protein, which were previously described in *A. niger*.

**Keywords:** Ed8 strain, *Aspergillus tubingensis*, secretable GOX enzyme.

### RESUMEN

Estudios previos han mostrado que la cepa Ed8 de *Aspergillus niger var. tubingensis* tiene la capacidad de producir niveles elevados de actividad enzimática GOX en el espacio extracelular cuando es cultivada en medio mínimo con bajas o altas concentraciones de glucosa. Comparada con las cepas de referencia NRRL593 de *Aspergillus tubingensis* y FGSCA732 de *Aspergillus niger*; se observó que la presencia de ácido cítrico (45 mM) incrementa los niveles de actividad GOX. Además, se ha observado que estas diferencias en la actividad GOX entre las cepas no se deben a diferencias en el nivel de transcrito de los genes *goxC* o *gox2*. En el presente trabajo describimos la purificación y caracterización de la enzima GOX extracelular de la cepa Ed8. La GOX extracelular de la cepa Ed8 fue purificada de concentrados del medio de crecimiento por una combinación de métodos

cromatográficos (intercambio iónico y exclusión molecular). La enzima GOX purificada de Ed8 fue comparada con la enzima GOX purificada de origen comercial de *A. niger* analizando diferentes parámetros: propiedades cinéticas, efecto del pH, buffer, temperatura y iones metálicos, y la estabilidad de la actividad enzimática. Los resultados muestran que la enzima GOX purificada de Ed8 es más termoestable y tiene una alta afinidad por la glucosa y una mayor velocidad de reacción, comparando con la enzima GOX comercial. Finalmente, el análisis proteómico por HPLC-ESI-QTOF del medio de crecimiento de la cepa Ed8 permitió la identificación de la enzima GOX secretada como la proteína GOXC, la cual fue previamente descrita en *A. niger*.

**Palabras clave:** *Cepa Ed8, Aspergillus tubingensis, enzima GOX secretable.*

## INTRODUCCIÓN

En estudios previos se realizó el aislamiento y la caracterización de cepas fúngicas nativas de sitios contaminados con Cr(VI), con el interés de elucidar los mecanismos implicados en su interacción con el ion, así como indagar sobre las posibles aplicaciones biotecnológicas de dichas interacciones [1, 3-4]. Entre los microorganismos aislados de dichos sitios, la cepa Ed8 de *Aspergillus niger* var. *tubingensis* ha sido estudiada con más detalle, debido a que es tolerante a Cr(VI) y posee la capacidad de reducirlo a Cr(III) [1]; se ha demostrado que en esta cepa el proceso de reducción ocurre con una acumulación mínima de cromo en la biomasa, de menos del 1%, lo que indica que la reducción de Cr(VI) ocurre en el medio extracelular [1]. Estudios adicionales mostraron que en la cepa Ed8 la capacidad de reducción de Cr(VI) se estimula cuando se cultiva en medio adicionado con citrato y otros ácidos orgánicos [3]. En un estudio reciente se analizó la capacidad de reducción de Cr(VI) de la cepa Ed8 en comparación con las cepas de referencia FGSC322 de *A. niger* y NRRL593 de *A. tubingensis*, observándose que la cepa Ed8 muestra claramente una mayor eficiencia para realizar dicho proceso [8]. En colonias desar-

rolladas en medio sólido y en concentrados del medio de cultivo de la cepa Ed8 se observó mayor actividad GOX que en las cepas de colección NRRL593 de *A. tubingensis* y FGSC322 de *A. niger*. Los concentrados del medio de crecimiento de la cepa Ed8, pero no los de las cepas de referencia mencionadas, causaban la disminución de Cr(VI) de una forma dependiente de glucosa, lo que indicó una correlación entre la capacidad de reducción de Cr(VI) y la actividad GOX extracelular [8]. Finalmente, se demostró que la enzima GOX purificada de origen comercial de *A. niger* es capaz de reducir al Cr(VI) en Cr(III). En conjunto, todos estos datos indicaron que la actividad GOX secretable forma parte de la maquinaria bioquímica para la reducción de Cr(VI) por cepas de *Aspergillus* [8].

## OBJETIVO

Con el fin de conocer las características de la enzima GOX secretable de la cepa Ed8, respecto de sus propiedades cinéticas y de estabilidad, en este trabajo se purificó dicha enzima y se caracterizó en forma comparativa con la enzima GOXC purificada de origen comercial de *A. niger*

## METODOLOGÍA

### Medio de cultivo y condiciones de crecimiento

La cepa Ed8 de *A. tubingensis* y las cepas de referencia NRRL593 de *A. tubingensis* y FGSC322 de *A. niger* se inocularon a partir de conidias ( $5 \times 10^5$  conidias por mL) en medio mínimo Lee (LMM) [11] con diferentes concentraciones de glucosa y los cultivos se incubaron a 28 °C.

### Determinación de proteína total y actividad GOX extracelular

La cuantificación de proteína se realizó por el Método de Lowry [6]. Esta determinación se realizó para conocer y cuantificar la producción de la actividad específica de glucosa oxidasa de cada cepa en el medio extracelular. La determinación de la referida actividad enzimática en estas muestras se realizó con el método de ABTS (Sigma-Aldrich. MO, USA).

### Purificación de la enzima GOX de la cepa ambiental Ed8 de *A. tubingensis*

Con las condiciones óptimas del medio de cultivo para obtener una alta actividad enzimática, se cultivó la cepa Ed8 en 1 litro de medio LMM, se incubó 48 horas a 28 °C y se recuperó el sobrenadante libre de células, el cual se sometió a ultrafiltración en sistema Amicon dotado de una membrana con límite de exclusión de 30 kDa y se concentró 140 veces, aproximadamente. Posteriormente, el concentrado se eluyó por una columna de Biogel P6 de 30 mL, para después aplicar las fracciones con actividad GOX a una columna de intercambio

iónico (DEAE sefarosa) y finalmente las fracciones que contenían actividad GOX se aplicaron a una columna de exclusión molecular (Sephacryl S200HR). Las fracciones con actividad GOX de este último paso se usaron para determinar el grado de pureza mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (PAGE) y para caracterizar la enzima.

### Caracterización de la enzima GOX de la cepa Ed8 y la enzima GOX comercial de *A. niger*

Se realizaron ensayos de caracterización de la enzima GOX purificada de la cepa ambiental Ed8 de *Aspergillus niger var. tubingensis* y de la enzima GOX comercial de *A. niger*, analizando el efecto sobre la actividad de diferentes factores y la determinación de varios parámetros cinéticos y bioquímicos, con el fin de hacer un estudio comparativo entre ambas enzimas. Los parámetros evaluados fueron efecto de pH, temperatura, iones metálicos y de ácido cítrico, así como la estabilidad de la actividad y la determinación de los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$ .

### Identificación de la enzima GOX

La identidad de la enzima GOX extracelular de la cepa Ed8 se determinó por el análisis de las proteínas del medio extracelular (cultivo de 500 mL en medio LMM) mediante HPLCESI-Q-TOF-MS; los resultados de patrones peptídicos obtenidos fueron analizados en la base de datos MASCOT.

## Ensayos de reducción de Cr (VI) con la enzima GOXC purificada de la cepa Ed8

Se realizaron ensayos de reducción de Cr(VI) por las enzimas GOX purificadas de la cepa Ed8 de *A. tubingensis* y por la enzima GOX comercial de *A. niger* (Sigma) de acuerdo al procedimiento de Romo Rodríguez y col. (2015) [8]. En los ensayos se determinó la concentración de Cr(VI) espectrofotométricamente utilizando difenilcarbazida [5].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Proteína secretada y actividad enzimática GOX en el medio extracelular en cepas de *Aspergillus*

Para establecer las condiciones óptimas de cultivo en las cuales se obtenga mayor cantidad de actividad específica, se midió la proteína total secretada y la actividad GOX extracelular. La proteína secretada en el medio extracelular a concentraciones de glucosa (0.25% y 2%) fue baja (0.001 a 0.065 mg/mL respectivamente). La adición de ácido cítrico a los cultivos en estas mismas condiciones aumentó los niveles de proteína extracelular

(0.009 a 1.08 mg/mL, respectivamente). Teniendo en cuenta esta observación, se repitió el experimento a mayores concentraciones de 3.5% y 5% glucosa y en presencia de ácido cítrico; se observó mayor producción de proteína extracelular en ambas concentraciones del azúcar, siendo de 0.24 a 1.2 mg/mL con 3.5% de glucosa y de 0.74 a 1.82 mg/mL con 5% de glucosa. A la par, se determinó la actividad GOX extracelular (Figura 16.1). La actividad específica GOX en el medio extracelular para las cepas Ed8, NRRL593 y FGSCA732, fue en los rangos de 0.05 a 0.22 y de 0.1 a 0.65 U/mg a concentraciones de 0.25% y 2% de glucosa, respectivamente. La actividad específica GOX obtenida en los medios de cultivo a diferentes concentraciones de glucosa, en presencia de ácido cítrico, tuvo un aumento considerable en todas las cepas, en comparación con las condiciones de cultivo antes mencionadas. La cepa Ed8 produce actividad enzimática de 1.2 y 1.5 veces más que las cepas NRRL593 y FGSCA732, respectivamente. La comparación de actividad GOX secretada de la cepa Ed8 con las cepas de referencia NRRL593 y FGSCA732 mostró que en todas las condiciones que se probaron la cepa Ed8 es la que presenta una mayor actividad enzimática, obteniéndose un

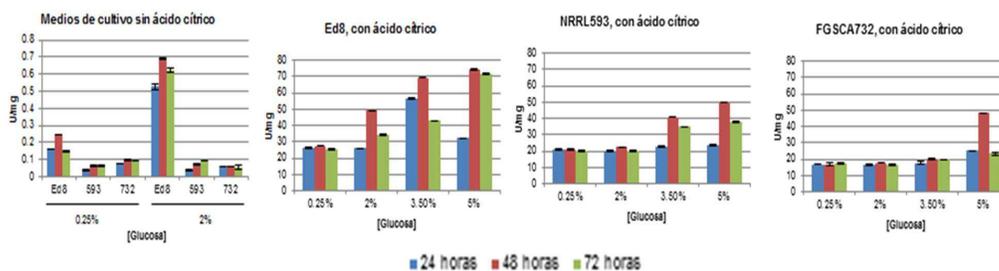


Figura 16.1: Actividad específica GOX secretada de las cepas Ed8, NRRL593 y FGSCA732, a diferentes concentraciones de glucosa en ausencia y presencia de ácido cítrico.

máximo de esta a las 48 horas de incubación con 5% de glucosa suplementado con 45 mM de ácido cítrico, con 74.3 U/mg para la cepa Ed8. Para las cepas de referencias NRRL593 y FGSCA732 estos valores fueron de 49.7 y 48.1 U/mg, respectivamente.

### Purificación de la enzima GOX de la cepa ambiental Ed8 de *A. tubingensis*

Dado que se ha reportado que en *A. niger* la GOX es una proteína que se secreta al medio extracelular [9], y que la GOX está implicada en la reducción del Cr(VI) [8], se planteó purificar la enzima GOX secretada de la cepa Ed8, con el fin de determinar sus características cinéticas y bioquímicas. Para ello, se utilizó como fuente de la actividad GOX el sobrenadante del medio de crecimiento de la cepa Ed8 el cual se concentró y

la muestra concentrada se eluyó por una columna de intercambio iónico (DEAE-sepharose), observando un pico de actividad que eluye a una concentración de 0.25 M de NaCl (Figura 16.2A). Las fracciones que presentaban actividad enzimática GOX provenientes de esta columna, se aplicaron a una columna de exclusión molecular (Sephacryl S200HR), observando en el perfil de elución que el pico de actividad enzimática se separa del pico de proteína (Figura 16.2B), lo cual indica que en este paso cromatográfico la actividad GOX queda con alto grado de pureza; esto se verificó mediante electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), en el que se observó una banda proteica mayoritaria de alrededor de 80 kDa (datos no mostrados). En este proceso la enzima GOX de la cepa Ed8 se purificó alrededor de 7 veces, con un rendimiento cercano al 36.0 %.

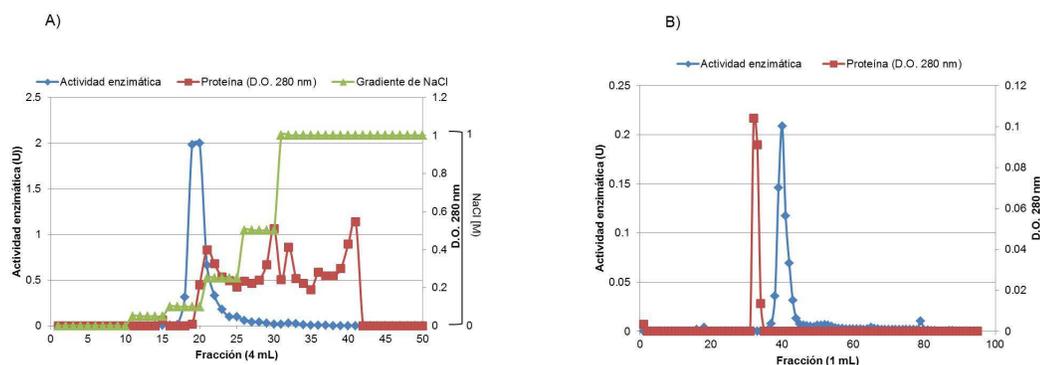


Figura 16.2: Perfil de elución de en la columna de intercambio iónico (DEAE-Sepharose) y de exclusión molecular (Sephacryl S200-HR).

### Caracterización de la enzima GOX pura de la cepa Ed8 de *Aspergillus niger var tubingensis*

En la Tabla 16.1 se muestran los parámetros óptimos que se determinaron

para una mayor actividad específica GOX de la cepa Ed8 y de la enzima GOX de *A. niger* de origen comercial. Se muestra que para ambas enzimas que los efectos del regulador, pH, temperatura y del citrato fueron prácticamente idénticos y

que las enzimas diferían en el efecto de los iones metálicos y en la estabilidad, siendo la enzima GOX de la cepa Ed8 menos in-

hibida por los iones Ca y Co y más termoestable que la enzima GOX comercial.

Tabla 16.1: Parámetros óptimos determinados de la enzima GOX de Ed8 y la enzima GOX de *A. niger* de origen comercial.

Parámetros	GOX de Ed8	GOX comercial
Regulador	Citrato-fosfato [50mM]	Citrato-fosfato [50mM]
pH	6.0	6.0
Temperatura	37 °C	37 °C
Iones	Inhib: Mn, Cu, Fe, Co [High], Hg	Inhib: Mn, Ca, Cu, Fe, Co, Hg
	No efecto: Mg, Ca, Co [baja]	No efecto: Mg
Citrato	15 mM	15 mM
Estabilidad 37 °C	Estable hasta las 24 h	Estable hasta las 2 h

### Determinación de los parámetros cinéticos de la enzima GOX pura

Para determinar las diferencias en los parámetros cinéticos de las enzimas GOX de Ed8 y la enzima GOX de *A. niger* de origen comercial, y como parte de la caracterización bioquímica, se determinaron los parámetros cinéticos de las

enzimas. Variando la concentración de sustrato, se obtuvo una cinética de tipo Michaeliano, y se calculó la  $K_m$  y la  $V_{max}$  de ambas enzimas (Tabla 16.2). Observándose con estos resultados que la GOX de Ed8 tiene una mayor afinidad ( $K_m$ ) al sustrato y una velocidad de reacción ( $V_{max}$ ) mayor que la GOX comercial de *A. niger*.

Tabla 16.2: Parámetros cinéticos calculados de la enzima pura de Ed8 y de *A. niger*

Parámetro <sup>1</sup>	GOX de Ed8	GOX comercial de <i>A. niger</i>
$K_m$ (mM)	14.71	36.94
$V_{max}$ (m/s)	4863.81	4411.11

<sup>1</sup> Parámetros cinéticos determinados de la enzima GOX pura de la cepa Ed8 y de la enzima GOX pura comercial de *A. niger*, obtenidos a partir de una variación de concentración de sustrato (glucosa).

### Ensayo de reducción de Cr (VI) con la enzima GOX de Ed8 pura

En presencia de su sustrato la enzima GOX de Ed8 reduce alrededor del 50% del Cr(VI) presente en la mezcla de

reacción; también, se observó que cuando el sustrato está ausente no hay reducción del oxianión. Por otra parte, en presencia de un inhibidor de la actividad GOX, como Hg, no hay reducción de Cr(VI) por la enzima. Estas observaciones indican

que, al igual que la enzima GOX de *A. niger* [8], la enzima GOX de Ed8 posee la capacidad de causar la reducción de Cr(VI).

### Identificación de la enzima GOX de la cepa Ed8

El análisis proteómico del sobrenadante del medio de crecimiento obtenido de cultivos hechos en las condiciones optimizadas, mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas de ionización por electrospray cuadrupolo y tiempo de vuelo (HPLC-ESI-Q-TOF-MS) y haciendo el análisis en la base de datos MASCOT, permitió determinar la presencia de una única proteína GOX secretable, la cual posee alto grado de identidad con la proteína GOXC de *A. niger*. Esto indica que, en las condiciones probadas, la cepa Ed8 secreta solo una de las 3 proteínas GOX potencialmente secretables, de acuerdo a los datos del genoma de *A. niger* [9]. Dado que los péptidos derivados de la proteína GOX de la cepa Ed8 alinearon perfectamente con regiones de la proteína GOXC de *A. niger* y con la proteína predicha del gen *goxC* de la cepa Ed8 [10], esto permite identificar a la proteína GOX secretable de la cepa Ed8 como la proteína GOXC. Es importante mencionar que la enzima GOX de la cepa Ed8 tiene un grado de identidad de 96.9% con respecto de la proteína GOXC de la base de datos del genoma de *A. niger* CBS513.88 [10] y que la proteína GOXC de la cepa Ed8 mantiene todos los residuos aminoacídicos descritos como importantes para la catálisis de la proteína GOXC de *A. niger*.

### CONCLUSIONES

- En las cepas Ed8, NRRL593 y FGSCA732, la producción de proteína y actividad extracelular aumenta en los medios de cultivo con altos niveles de glucosa como fuente de carbono (*i* 2%).
- El análisis de las proteínas extracelulares de la cepa Ed8 por HPLC-ESI-QTOF permitió la identificación de la enzima GOX secretable como la proteína GOXC.
- La enzima GOXC de la cepa Ed8 fue purificada 7 veces con un rendimiento del 36.4%.
- La enzima GOXC de la cepa Ed8 posee una mayor afinidad por el sustrato y una velocidad de reacción mayor que la enzima GOXC comercial de *A. niger*.
- La enzima GOXC de Ed8 tiene la capacidad de tolerar temperaturas más altas que la óptima y tiene una estabilidad mayor que la enzima GOX comercial.
- La enzima GOXC pura de Ed8 tiene la capacidad de reducir el Cr(VI) en una reacción dependiente de glucosa.

### AGRADECIMIENTOS

Consejo Nacional de Ciencia Y Tecnología (CONACYT). Clave de registro: 230575. C.B. 2014-01. Universidad de Guanajuato

### REFERENCIAS

- [1] Acevedo-Aguilar, F.J., Espino-Saldaña, A.E., León-Rodríguez, I.L., Rivera-Cano,

- M.E., Ávila-Rodríguez, M., Wrobel, K., Lappe, P., Ulloa, M., y Gutiérrez-Corona J.F.(2006). Hexavalent Chromium removal in Vitro and from industrial wastes, using chromate-resistant strains of filamentous fungi indigenous to contaminated wastes. Canadian Journal of Microbiology 52:809-15.
- [2] Clarke, K. G., Johnstone-Robertson, M., Price, B., & Harrison, S. T. L. (2006). Location of glucose oxidase during production by *Aspergillus niger*. Applied microbiology and biotechnology, 70(1), 72-77.
- [3] Coreño Alonso. (2009). Caracterización del sistema de reducción de Cr(VI) de la cepa Ed8 de *Aspergillus niger* resistente a cromatos. Tesis de Doctorado, Posgrado en Biología, Universidad de Guanajuato.
- [4] Espino Saldaña, A. (2002). Aislamiento y caracterización de hongos resistentes a cromatos nativos de desechos industriales. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, Universidad de Guanajuato.
- [5] Greenberg AD, Connors JJ, Jenkins DY, Franson MA. (1981). Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association. Washington, D.C. 15:187-190.
- [6] Lowry O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall. J. (1951) Biol. Chem. 193: 265-275.
- [7] Rodríguez Reyes, S. C. (2014). Regulación de la producción de actividad GOX secretable en cepas de *Aspergillus niger*. Tesis de Maestría, Posgrado en Biología, Universidad de Guanajuato.
- [8] Romo-Rodríguez, P., Acevedo-Aguilar, F. J., Lopez-Torres, A., Wrobel, K., Wrobel, K., & Gutiérrez-Corona, J. F. (2015). Cr (VI) reduction by gluconolactone and hydrogen peroxide, the reaction products of fungal glucose oxidase: Cooperative interaction with organic acids in the biotransformation of Cr (VI). Chemosphere.
- [9] Clarke, K.G., Johnstone-Robertson, M., Price, B., Harrison, S.T. (2006). Location of glucose oxidase during production by *Aspergillus niger*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 70, 7277.
- [10] Sánchez-Becerra, D. (2012). Sobre expresión de un gen codificante para una enzima GOX secretable en la cepa Ed8 de *Aspergillus niger var. tubingensis*. Tesis de Maestría, Posgrado en Biología, Universidad de Guanajuato.
- [11] Lee K. L., Buckley H.R. y Campbell C.C. (1975). An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeast forms of *Candida albicans*. Journal of Medical Veterinary Mycology. 13:148-153.