



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES



"La tierra no es de nosotros, nosotros somos de la tierra"

**BIODEGRADACIÓN DE COMPUESTOS AZO EN
CONDICIONES REDUCTORAS POR BACTERIAS
AISLADAS DE LIXIVIADOS, AGUAS RESIDUALES Y
LADOS ACTIVADOS**

TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES

Presenta

MARÍA SEBASTIANA PEDRAZA CHAN

Asesora de tesis:
Dra. María Lilia Cedillo Ramírez

Septiembre 2014



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES



"La tierra no es de nosotros, nosotros somos de la tierra"

**BIODEGRADACIÓN DE COMPUESTOS AZO EN
CONDICIONES REDUCTORAS POR BACTERIAS
AISLADAS DE LIXIVIADOS, AGUAS RESIDUALES Y
LODOS ACTIVADOS**

TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES

Presenta

MARÍA SEBASTIANA PEDRAZA CHAN

Comité tutorial:

Asesor y Tutor	Dra. María Lilia Cedillo Ramírez
Integrante Comité Tutorial	Mc. Andrés Adolfo Muñoz García
Integrante Comité Tutorial	Dr. Gunther Geissler Dahlheim

Septiembre 2014



BUAP

ING. AMB. MARÍA SEBASTIANA PEDRAZA CHAN

Presente:

Por este conducto me permito comunicarle que los miembros del jurado integrado por:

<i>Dra. Vianey Marín Cevada</i>	<i>Presidente</i>
<i>Dra. Ricardo Munguía Pérez</i>	<i>Secretario</i>
<i>Dra. María Teresa Zayas Pérez</i>	<i>1er. Vocal</i>
<i>M. C. Constantino Gil Juárez</i>	<i>2do. Vocal</i>
<i>Dra. Sonia Emilia Silva Gómez</i>	<i>Suplente</i>

designado para la defensa de su tesis “*Biodegradación de compuestos azo en condiciones reductoras por bacterias aisladas de lixiviados, aguas residuales y lodos activados*”, han manifestado mediante su voto que ésta cumple con los méritos suficientes para ser defendida como tesis de grado de Maestría en Ciencias Ambientales, por lo que este Posgrado le autoriza la impresión de la misma.

Sin otro asunto en lo particular, quedo de usted.

Atentamente

“Pensar Bien, Para Vivir Mejor”

H. Puebla de Z., Septiembre 18 de 2014


Dr. J Santos Hernández Zepeda
Coordinador

JSHZ/anma
c.c.p. Archivo
c.c.p. Minutario



Dedicatoria

Quisiera dedicar primero este paso de mi vida profesional a Dios por darme las virtudes y fortalezas necesarias para salir siempre adelante pese a las dificultades, iluminando cada paso de mi vida.

A mi querida familia, a mi hija Marian que es mi inspiración y fuerza para luchar cada pelea que la vida me ofrece y que con su luz ilumina mi vida.

A mi esposo: Alejandro gracias por tu paciencia, comprensión, aportaciones y apoyo incondicional para culminar esta etapa de mi vida, porque siempre me impulsas y estas a mi lado haciéndome crecer como ser humano y profesionalmente. Gracias amor.

A mis padres y hermanas por su apoyo, porque siempre me han ofrecido amor y calidez.

Agradecimiento

Me complace a través de este trabajo exteriorizar mi sincero agradecimiento al Posgrado en Ciencias Ambientales y en ella a sus académicos y administrativos quienes con su profesionalismo y compromiso influyeron con sus lecciones y experiencias en formarme como una persona de bien.

A la Dra. Lilia por su apoyo, confianza y calidad profesional para poder culminar este trabajo de investigación.

Un especial agradecimiento al M.C. Andrés Muñoz García por su orientación, seguimiento y supervisión continua de este trabajo, por la motivación y apoyo recibidos a lo largo de estos años.

Quisiera hacer extensa mi gratitud a mis compañeros del Laboratorio de Microbiología de Suelos a Lizzet, Ricardo, Claudia, Liz por su amistad y colaboración.

A Yuri por su amistad, asesoría y colaboración en la realización del análisis filogenéticos de este trabajo.

También quisiera agradecer a la Dra. Vianey Marín Cevada, Dra. Sonia Emilia Silva Gómez, Dra. Teresa Zayas Pérez, M.C. Constantino Gil Juárez y Dr. Ricardo Munguía Pérez por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo de tesis que sirvió para enriquecerlo y mejorarlo.

De igual manera al Dr. Ernesto Mangas Ramírez del laboratorio de Limnología de la escuela de Biología del BUAP, por su apoyo con los análisis toxicológicos.

Agradecimiento a la industria textil Spintex S.A. de C.V. por las facilidades dadas para la obtención de las muestras de aguas residuales y de los colorantes azo industriales utilizados en este trabajo.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para el estudio de la Maestría.

Asimismo a la Vicerrectoría de Investigación y estudios de Posgrado de esta universidad por la beca otorgada para la culminación de la Tesis.

Resumen

El problema de la contaminación del agua por colorantes está muy presente en el Estado de Puebla por lo cual es necesario crear estrategias para resolver o aminorar los impactos ambientales de esta, es por ello que se desarrolló esta investigación en la búsqueda de un tratamiento para aguas contaminadas con colorantes mediante microorganismos que sean capaces de mineralizar estos compuestos. En este trabajo se aislaron 114 bacterias de diversos ambientes con actividad azoreductasa y se incorporaron 44 colonias provenientes del relleno sanitario de la ciudad de Puebla “Chitepeque” procedentes del cepario del laboratorio de Microbiología de Suelos del Centro de Investigaciones Microbiológicas del ICUAP. Todas estas colonias fueron probadas en diferentes colorantes sintéticos para evaluar su potencial en la degradación de estos compuestos, seleccionando a 27 de ellas.

Las colonias seleccionadas fueron identificadas en la mayoría de los casos por métodos fenotípicos y solo para tres casos se utilizó la herramienta molecular “Reacción en cadena de la Polimerasa” (PCR) para la identificación genotípica. Adicionalmente se probó la capacidad de estos microorganismos de crecer en sustancias y en parámetros fisicoquímicos semejantes al de las aguas residuales así como la capacidad de eliminar el color de agua residual artificial coloreada.

Los resultados satisfactorios de remoción de colorantes por parte de *Shewanella putrefaciens* la cual se aisló de aguas residuales municipales, lodos activados y lixiviados del relleno sanitario, llevaron a que estas cepas fueran elegidas para usarse en un tratamiento de aguas coloreadas artificiales montado en un biorreactor de lecho fijo prototipo.

Índice general

Dedicatoria.....	i
Agradecimiento.....	ii
Resumen.....	iii
Índice general.....	iv
Índice de Tablas	vii
Índice de figuras	ix
Introducción	11
Capítulo I. Marco Teórico y Referencial	14
1.1 Historia de los colorantes	14
1.2 Principales componentes de los colorantes.....	15
1.3 Colorantes azo	15
1.3.1 Toxicidad de los colorantes azo.....	17
1.4 Problemática ambiental por colorantes sintéticos.....	20
1.5 Sistemas de tratamientos de efluentes con colorantes sintéticos	21
1.6 Biodegradación de colorantes sintéticos.....	22
1.6.1 Biodegradación de colorantes por hongos.....	22
1.6.2 Biodegradación de colorantes por levaduras.....	23
1.6.3 Biodegradación de colorantes por algas.	24
1.6.4 Biodegradación de colorantes por bacterias.....	24
Capítulo II. Metodología 1a etapa: Muestreo y aislamiento de microorganismos... 27	
2.1 Muestreo para el aislamiento de las bacterias	28
2.2 Aislamiento y selección de las colonias bacterianas.....	28
2.2.1 Preparación del inóculo	28
2.2.2 Inoculación del medio de crecimiento.	29
2.2.3 Pruebas selectivas, diferenciales y preliminares.....	30
2.3 Resultados del muestreo y aislamiento	31
Capítulo III. Metodología 2a etapa: Identificación de bacterias degradadoras	35
3.1 Identificación mediante métodos fenotípicos	35
3.2 Identificación mediante métodos genotípicos	39

3.3	Resultados del proceso de identificación	40
3.3.1.	<i>Métodos fenotípicos.</i>	40
3.3.2.	<i>Métodos genotípicos.</i>	44
Capítulo IV. Metodología 3 ^a etapa. Biodegradación de colorantes industriales		46
4.1	Identificación de parámetros para la degradación de colorantes azo ...	46
4.1.1	<i>Biodegradación con diferentes fuentes de carbono.</i>	47
4.1.2	<i>Biodegradación con diferentes condiciones de respiración.</i>	47
4.1.3	<i>Crecimiento en diferentes pH, temperaturas y concentraciones de NaCl.</i> 51	
4.1.4	<i>Crecimiento con posibles sustancias xenobióticas (metales, antibióticos, detergentes y metabolitos de degradación de contaminantes).</i>	52
4.1.5	<i>Pruebas de antagonismo.</i>	52
4.1.6	<i>Cinética de degradación de 5RGLDh_{BUAP} y AO_{BUAP}.</i>	53
4.1.7	<i>Análisis toxicológico del tratamiento para la degradación del Azul de Levafix CA usando las colonias 5RGLDh_{BUAP} y AO_{BUAP}.</i>	54
4.2	Diseño y funcionamiento de un biorreactor de lecho fijo para la biodegradación de colorantes azo.	54
4.2.1	<i>Preparación del material de soporte.</i>	55
4.2.2	<i>Inoculación del biorreactor.</i>	56
4.2.3	<i>Aclimatación del biofilms.</i>	56
4.3	Resultados de la biodegradación de colorantes	57
4.3.1.	<i>Diferentes fuentes de carbono.</i>	57
4.3.2.	<i>Diferentes condiciones de respiración.</i>	59
4.3.3.	<i>Crecimiento en diferentes pH, temperaturas y concentraciones de NaCl.</i> 61	
4.3.4.	<i>Crecimiento con posibles sustancias xenobióticas (metales, antibióticos, detergentes y metabolitos de degradación de contaminantes).</i>	61
4.3.5.	<i>Pruebas de antagonismo.</i>	64
4.3.6.	<i>Cinética de degradación de 5RGLDh_{BUAP} y AO_{BUAP}.</i>	64
4.3.7.	<i>Análisis toxicológico del tratamiento para la degradación del Azul de Levafix CA usando 5RGLDh_{BUAP} y AO_{BUAP}.</i>	66
4.3.8.	<i>Biodegradación de colorantes azo en el biorreactor de lecho fijo.</i>	66
Capítulo V. Discusiones		69
Conclusión		77
Anexo		78

Apéndice A: Medio CPS ID 3.....	86
Apéndice B: API 20 E (REF 20 100/20 160).....	87
Apéndice C: API 20 NE (REF 20 050).	92
Referencias	97

Índice de Tablas

Tabla I.1. Aminas aromáticas, y metabolitos de los colorantes potenciales, que pueden ser considerados como cancerígenos para los humanos (Brown y De Vito, 1993).	19
Tabla I.2. Consumos relativos de agua de cada uno de los procesos y aplicaciones de la industria textil (Gilabert, 2002).	20
Tabla II.1. Número de células bacterianas por medio del método de recuento en placa con diluciones seriales, en placa con adición de colorantes sintéticos.	32
Tabla II.2. Resultados de la decoloración de las colonias seleccionadas en el medio de asilamiento con una concentración 100 ppm de colorante durante 5 días.	34
Tabla III.1. Condiciones de amplificación del gen ribosomal 16s para PCR.	39
Tabla III.2. Resultados del crecimiento en el medio CPS ID 3 en 24 hrs., de incubación y la morfologías observada en la tinción de Gram.	41
Tabla III.3. Identificación de las colonias mediante los sistemas estandarizados API 20 E y API 20. NE.	42
Tabla III.4. Identificación de las colonias mediante pruebas complementarias.	43
Tabla III.5. Confirmación de la identificación de diversas colonias mediante pruebas bioquímicas.	43
Tabla IV.1. Porcentajes de remoción de cinco colorantes Azo por diferentes bacterias seleccionadas en condiciones aerobias.	60
Tabla IV.2. Porcentajes de remoción de cinco colorantes Azo por diferentes colonias seleccionadas en condiciones reductoras.	60
Tabla IV.3. Resultados del crecimiento microbiológico en diferentes condiciones.	61
Tabla IV.4. Resultados del crecimiento en diversos detergentes.	62
Tabla IV.5. Resultados del crecimiento con diversas sustancias.	63
Tabla IV.6. Resultados del análisis toxicológico.	66
Tabla IV.7. Resultados de los parámetros monitoreados en el biorreactor.	68
Tabla A. Resultados de pruebas complementarias para el perfil de los sistemas estandarizados API 20E y API 20NE.	78
Tabla B. Resultados de pruebas complementarias que se realizaron a 7 colonias para su identificación.	79
Tabla C. Resultados de pruebas confirmatorias que se realizaron a 8 colonias para su completa identificación.	80
Tabla D. Porcentajes aproximados de remoción del Rojo Congo (100ppm) con diferentes fuentes de carbono, 5 días de incubación.	81

Tabla E. Porcentajes aproximados de remoción del Azul de Levafix CA (100ppm) con diferentes fuentes de carbono, 5 días de incubación.....	82
Tabla F. Matriz de identidad de la secuencias del gen 16S rDNA de 3 aislamientos y otras cepas obtenidas de la base de datos del NCBI, obtenida por el programa BioEdit Sequence Alignment.....	83
Tabla G. Resultado del crecimiento en diferentes concentraciones de metales.....	84
Tabla H. Resultado de la interpretación de los halos de inhibición de las bacterias por varios antibióticos, usando la técnica de multidiscos Bio-Rad.....	85

Índice de figuras

Fig. 1.1. Estructura química de colorantes azo monoazoico y tetraazoico.....	16
Fig. 1.2. Estructura química de colorantes azo sulfonados y no sulfonados con diferentes sustituyentes en los anillos aromáticos.....	16
Fig. 1.3. Ejemplo de una reducción colorante azo por una vía de bacterias anaerobia. (Wallace, 2001).....	17
Fig. 1.4. Estructuras químicas que muestran toxicidad después de la activación metabólica de los colorantes azo (Tan, 2001).....	18
Fig. 1.5. Ejemplo de reducción azo de colorantes azo sulfonados resultando en la formación de aminas aromáticas sulfonadas y no-sulfonadas (Tan, 2001).....	24
Fig. 2.1. Esquema de la metodología del trabajo de investigación.....	27
Fig. 2.2. Estructura química de tres colorantes utilizados en el aislamiento de las bacterias (Sigma-aldrich, 2014).	29
Fig. 2.3. Fotografía de las placas del aislamiento de microorganismos (diluciones 10^{-2}) para la degradación de colorantes sintético a) en Azul de Levafix CA y b) Rojo Congo....	30
Fig. 2.4. Fotografía de las pruebas de degradación en medio semigelificado con 100 ppm de colorante, Rojo Congo después de a) 1 día, b) 5 días y c) Azul de Levafix en 1 día...	31
Fig. 2.5. Fotografía de las placas en crecimiento en medio selectivo y diferencial, a) crecimiento en agar Mac Conkey y b) Chromagar Salmonella.....	33
Fig. 3.1. Fotografía de las pruebas requeridas para la identificación bioquímica de las colonias seleccionadas, a) determinación de la enzima oxidasa, b) medio OF y c) medio CPS3.	37
Fig. 3.2. Árbol filogenético Neighbor-joining generado a partir del alineamiento múltiple de la secuencia del gen 16S rDNA de 3 colonias aisladas y agrupadas en <i>Stenotrophomonas</i> (S.), <i>Citrobacter</i> (C.), <i>Shewanella</i> (Sh.) y otras cepas obtenidas de la base de datos del NCBI (el número de acceso aparece después de cada cepa). Los valores de bootstrap se muestran en cada nodo. La escala de la distancia filogenética se indica en la barra inferior.....	45
Fig. 4.1. Fotografías de los tubos de ensaye en condiciones de respiración a) aerobia y b) anaerobia del Rojo Congo y Azul de Levafix CA, a las 24 horas.....	48
Fig. 4.2. Curva de calibración correspondiente al Azul de Levafix CA. Recuadro: espectro de absorbancia del mismo colorante industrial.	49
Fig. 4.3. Curva de calibración correspondiente al Rojo Congo. Recuadro: espectro de absorbancia del mismo colorante industrial.	49
Fig. 4.4. Curva de calibración correspondiente al Marino Remazol RGB. Recuadro: espectro de absorbancia del mismo colorante industrial.	50

Fig. 4.5. Curva de calibración correspondiente al Rojo Intenso RGB. Recuadro: espectro de absorbancia del mismo colorante industrial.....	50
Fig. 4.6. Curva de calibración correspondiente al Marino Remazol C. Recuadro: espectro de absorbancia del mismo colorante industrial.....	51
Fig. 4.7. Fotografías de las pruebas de antagonismo usando la técnica de doble capa, a las 48 horas de incubación, a) presencia de halo de inhibición y b) sin actividad antibacteriana.....	53
Fig. 4.8. Plano del biorreactor (medidas en cm).....	55
Fig. 4.9. Fotografías de la vista frontal del biorreactor de lecho fijo empacado con tezontle, a) después del periodo de incubación y b) después de 3 días de tratamiento con Azul de Levafix CA.	57
Fig. 4.10. Porcentajes de remoción del Rojo Congo (100 ppm) con diferentes fuentes de carbono después de 5 días de incubación.....	58
Fig. 4.11. Porcentajes de remoción del Azul de Levafix CA (100 ppm) con diferentes fuentes de carbono después de 5 días de incubación.	58
Fig. 4.12. Cinética de degradación de <i>Shewanella putrefaciens</i> (5RGLDh _{BUAP}) en condiciones aerobias y anaerobias, con barras de error.	65
Fig. 4.13. Cinética de degradación de <i>Citrobacter freundii</i> (AO _{BUAP}) en condiciones aerobias y anaerobias, con barras de error.	65
Fig. 4.14. Espectro UV-Vis, que refleja la decoloración a las 24 horas del Azul de Levafix CA.	67
Fig. 4.15. Porcentajes de remoción del Azul de Levafix CA en 4 días en el biorreactor....	67

Introducción

Es innegable el incumplimiento de las promesas del modelo de desarrollo neoliberal, mismo que ha llevado a una sociedad de riesgo y a una globalización con proliferación incontrolada de la contaminación del ambiente. Uno de los problemas ambientales de interés en estos tiempos es la contaminación del agua a lo cual se le suma la poca disponibilidad de este vital líquido.

El consecuente aumento de la demanda de agua origina una fuerte presión sobre este recurso, y por ende se vuelve difícil satisfacer las necesidades de agua potable de la población sin alterar los ecosistemas que dependen de ella. Este problema de disponibilidad de agua potable tiende a agravarse si no tiene las características requeridas para el consumo humano o si se encuentra contaminada. A nivel mundial, en los países en desarrollo se da tratamiento a menos del 10% del agua residual. En el caso de México sólo se trata cerca del 36% de las aguas residuales, considerando la descarga municipal e industrial. Cada año se generan 7.24 km³ de agua residual proveniente de las ciudades y 6.61 km³ de agua de otras fuentes, principalmente de la industria. De estos enormes caudales sólo se trata el 43.51% de aguas residuales municipales y un 28.9% de las industrias (CONAGUA, 2013).

Una de las sustancias que podemos encontrar en estas aguas contaminadas son los colorantes que se utilizan para el teñido de pieles, papel, alimentos, telas y una gran variedad de artículos.

El Estado de Puebla cuenta con una gran tradición textilera que data de 1835 con el inicio de las actividades de la primera fábrica textil en América Latina: "La Constancia Mexicana". Esta fábrica fue el pivote de la industrialización de la región, tradición que persiste en nuestros tiempos debido a la expansión de la industria maquiladora en la rama textil durante la segunda mitad de la década de 1990. Aunque el establecimiento de la industria maquiladora fomentó la generación de empleos, ésta también trajo consigo grandes impactos ambientales, principalmente sobre los cuerpos de agua de la región. Dentro del Estado y estados vecinos que tienen actividades industriales que utilizan colorantes (principalmente los de tipo azo), han llegado a verter sus aguas residuales resultado de los procesos de teñido de las prendas de vestir sin tratamiento previo a los ríos o al alcantarillado público, convirtiéndose ello en un problema de estética, pero el más

importante, un problema de salud debido a la dinámica del contaminante donde se pueden generar metabolitos cancerígenos para los seres vivos que pueden acabar en cáncer de hígado, riñón e intestino, leucemias, etc.

Por lo tanto el tratamiento de estas aguas residuales es de gran interés debido a la peligrosidad que representa su toxicidad en los ecosistemas, a los impactos estéticos, y a la importancia de implementar la cultura del reciclaje del agua dentro de los procesos industriales para lograr un aprovechamiento sustentable del agua en nuestra región y evitar que los cuerpos de agua se vean rebasados en su capacidad de carga de contaminantes. Los tratamientos convencionales de estos contaminantes no se desarrollan de manera sustentable, ya que de un problema de agua se pasa a un problema de lodos residuales, los cuales llegan en muchos casos a ser utilizados como abono sin un control adecuado.

Este trabajo apoya uno de los objetivos centrales del desarrollo sustentable, que es la creación y selección de opciones tecnológicas adecuadas para reducir la transferencia de tecnología de otros países. Tecnologías que contribuyan a proteger la capacidad de regeneración de la naturaleza y evitar los efectos adversos de los contaminantes a la salud de las sociedades y de los ecosistemas, es decir pasar de una sociedad de riesgo a una sociedad sustentable donde se abata la contaminación local con propuestas propias y amigables con el ambiente.

Dada la problemática expuesta, se deriva la importancia de generar tecnologías limpias como lo son los tratamientos microbiológicos que resultan ser accesibles, eficientes, novedosos y de bajo impacto al ambiente para el tratamiento de aguas residuales teñidas con colorantes sintéticos. Por lo que en este estudio se plantea que mediante tratamientos microbiológicos de cultivos puros y utilizando un biorreactor de lecho fijo es posible lograr una remoción apreciable (~90%) de compuestos azo presentes en agua residual artificial.

En la necesidad de generar propuestas de solución para la problemática ambiental de nuestra región, se concibe el objetivo de esta investigación de lograr una biodegradación eficiente de colorantes sintéticos mediante el uso de bacterias mesófilas no fermentadoras aislada de diversos ambientes, mediante un sistema de tratamiento microbiológico de cultivos puros y mediante un biorreactor de lecho fijo.

Biodegradación de compuestos azo en condiciones reductoras por bacterias aisladas de lixiviados, aguas residuales y lodos activados

También se planeó el identificar bajo qué condiciones de respiración bacteriana se lleva a cabo eficientemente la degradación de los compuestos azo, además de elucidar los elementos necesarios para que los microorganismos puedan realizar la decoloración del agua residual artificial usando bacterias mesofílicas aisladas de diversos ambientes. Así mismo, la determinación de los factores físicos y químicos presentes en las aguas residuales que podrían afectar la biodegradación de los colorantes azo. Y por último, la identificación de las colonias bacterianas más aptas para acoplarse en un biorreactor.

Capítulo I

Marco Teórico y Referencial

1.1 Historia de los colorantes

Hasta mitad del siglo XIX todos los colorantes aplicados eran de origen natural, a partir de 1856 inicio la manufacturación de colorantes sintéticos gracias al inglés William Henry Perkin que sintetizó por accidente la primera anilina artificial derivada del carbón, el primer colorante malva; después de 18 años al patentar su invento, Perkin comenzó la fabricación a gran escala de este colorante. A partir de entonces más de 100 mil diferentes colorantes se han estado produciendo en todo el mundo, con una producción anual de más de 700 mil toneladas (Ali, 2010).

El descubrimiento más importante para la industria del color después de Perkin, se debió a Peter Griess, quien proporciono los cimientos para el desarrollo de la química de los pigmentos y tintes azoicos en 1858. Este hecho fue seguido de nuevas investigaciones y desarrollo de nuevos colorantes sintéticos gracias a los descubrimientos de la estructura molecular del benceno por parte del químico alemán August Kékulé en 1865 y para principios del siglo XX alrededor del 90% de los tintes textiles eran sintéticos en lugar de naturales y los tintes azoicos se afianzaron como la clase químicamente dominante (Christie, 2001).

Los colorantes sintéticos productos de la industria química de transformación, son utilizados en un gran número de procesos industriales y cada vez aumenta el número de producción y aplicación de esto compuestos, por lo que es difícil mencionar que producto en la actualidad no tiene algún colorante.

1.2 Principales componentes de los colorantes

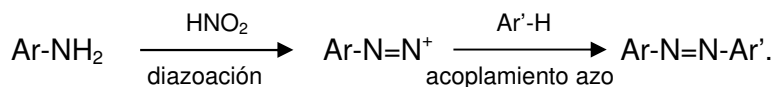
Los colorantes son compuestos que se caracterizan por ser capaces de absorber radiación electromagnética en una parte donde el ojo humano es sensible, es decir en la región visible 380 a 720 nm (Christie, 2001). Todos los compuestos aromáticos absorben energía electromagnética pero solamente los que absorben luz en longitudes de onda en el rango visible son de color (Van der Zee, 2002).

La molécula de un colorante está conformada por un grupo llamado cromóforo que es el grupo de átomos responsables de su color y por el auxócromo, definido como los grupos que normalmente aumentan la intensidad del color y desplazan la absorción a longitudes de onda mayores de la luz. Los cromóforos más usuales son los grupos azo (-N=N-), carbonilo (-C=O), nitro (-NO₂) y metino (-CH=), los auxocromos habitualmente encontrados son los grupos hidroxilo (OH) y amino (NR₂) (Christie, 2001). Cuando describimos una molécula de colorante, la parte nucleofílica es referida como auxocromo, mientras que los grupos aromáticos son llamados cromóforos. Juntos, las moléculas de color se describen como un cromógeno (Wallace, 2001).

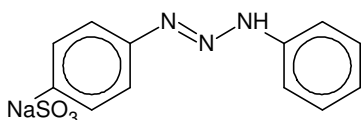
1.3 Colorantes azo

Los tintes (compuestos solubles en agua) y pigmentos (compuestos insolubles) azoicos constituyen la familia química más importante entre los colorantes orgánicos comerciales. Corresponden al 60-70% de los colorantes utilizados en las aplicaciones textiles tradicionales (Christie, 2001) y por ende son los más comúnmente liberados en el ambiente. Tiene gran importancia comercial debido a ser capaces de proporcionar un rango de matices completo, son los que presentan un mayor rendimiento económico entre todas las familias de colorantes debido a que su producción industrial es sencilla y de altos rendimientos, las materias primas son de bajo costo, el disolvente para las reacciones es el agua, los procesos se realizan a temperatura ambiente o inferior reduciendo los costos por energía (Wallace, 2001).

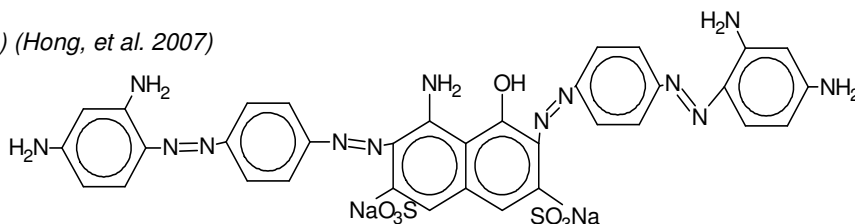
Existen varias vías para sintetizar los compuestos azo, a escala industrial se obtienen mediante un mismo mecanismo de reacción que consiste en dos etapas: la diazoación y el acoplamiento azo, tal como indica el esquema de reacción:



Debido a su estructura química los colorantes azo absorben luz en el espectro visible, el sistema cromóforo de este tipo de colorante consiste esencialmente del grupo azo (-N=N-) en asociación con uno o más sistemas aromáticos, su estructura puede contener uno o varios de estos grupos: monoazoicos (un grupo), diazoicos (dos grupos) y triazoicos (tres grupos).



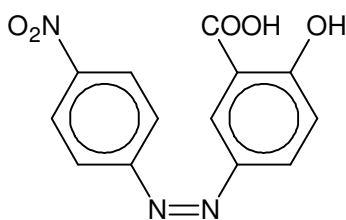
Amarillo Metanil (monoazoico) (Hong, et al. 2007)



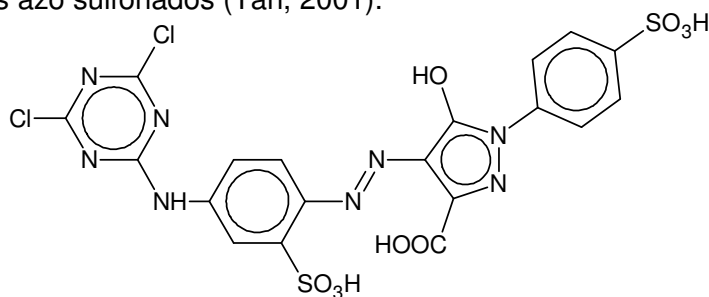
Negro directo 19 (tetraazoico) (Van der Zee, 2002)

Fig. 1.1. Estructura química de colorantes azo monoazoico y tetraazoico.

El grupo azo es sustituido con el grupo benceno o naftaleno, que pueden contener diferentes sustituyentes por ejemplo cloro (-Cl), metilo (-CH₃), nitro (-NO₂), amino (-NH₂), hidroxilo (-OH) y carboxilo (-COOH). Un sustituyente que a menudo se encuentra en los colorantes azo es el grupo ácido sulfónico (-SO₃H). Los colorante azo cuando tienen este sustituyente se denomina colorantes azo sulfonados (Tan, 2001).



Naranja mordiente 1 (Van der Zee, 2002)



Naranja reactivo 14 (Dos Santos et al. 2005)

Fig. 1.2. Estructura química de colorantes azo sulfonados y no sulfonados con diferentes sustituyentes en los anillos aromáticos.

1.3.1 Toxicidad de los colorantes azo

Los colorantes azoicos representan un riesgo bajo de toxicidad cuando no han sufrido ninguna alteración. Muchos de ellos tienen una DL_{50} (dosis letal que permite vivir al 50% de la población del ensayo) por vía oral superior a 1 g/kg en ratas y ratones (Guía de Productos químicos, 2001). Pero puede considerarse de riesgo grave la fabricación de estos compuestos azo debido al uso de las aminas aromáticas, o cuando estas se presentan como impureza de los productos terminados, cuando son liberadas las aminas aromáticas debido a una reacción química o como resultado de una degradación metabólica. Cada vez se presta más atención al potencial cancerígeno de los compuestos azoicos.

La mayoría de los colorantes azoicos carcinogénicos no lo son de forma directa, sino como precarcinógenos, debiendo transformarse mediante una activación metabólica *in vivo*, para pasar de precarcinógenos a carcinógenos finales. Por ejemplo, el *metilaminoazobenceno* experimenta primero una N-hidroxilación y una N-desmetilación en el grupo amino y después se conjuga el grupo sulfato con el derivado N-hidroxi para formar el carcinógeno final, que reacciona con los ácidos nucleicos. Es importante señalar que los colorantes diazoicos derivados de la bencidina pueden transformarse en el potente carcinógeno bencidina a través de los procesos metabólicos normales del organismo. El propio organismo o las bacterias del intestino reducen *in vivo* los dos grupos azo a bencidina. Un ejemplo de una vía reductora es aquella mediada por bacterias intestinales anaeróbicas que inducen la formación de bencidinas como se muestra en la Fig. 1.3. Reacciones y productos similares pueden ser posibles en un sistema de tratamiento anaerobio.

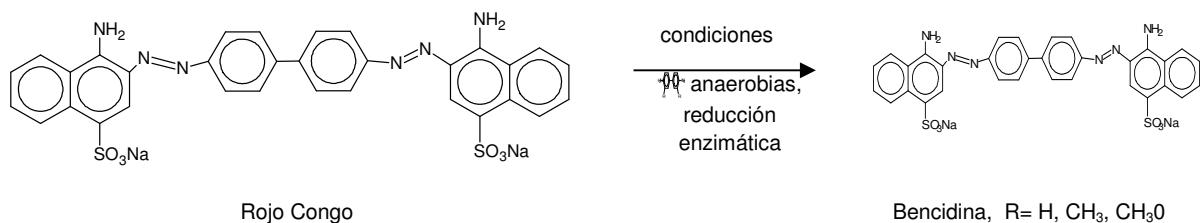


Fig. 1.3. Ejemplo de una reducción colorante azo por una vía de bacterias anaerobia. (Wallace, 2001).

Más ejemplos de aminas aromáticas tóxicas, que pueden ser creados a partir de la degradación de los compuestos de colorantes azo, pueden verse en la tabla 1.1, además su estructura y órganos que afecta.

Existe una clara relación entre la estructura química de los compuestos y su potencial de riesgo. Los colorantes azo que contienen un grupo nitro resultan ser mutagénicos y su alta toxicidad de estos colorantes también puede ser observada en el lodo metanogénicos (Tan, 2001). La mayoría de los colorantes azo pueden producir productos tóxicos de degradación. Ejemplo de tales se pueden ver en la Fig. 1.4.

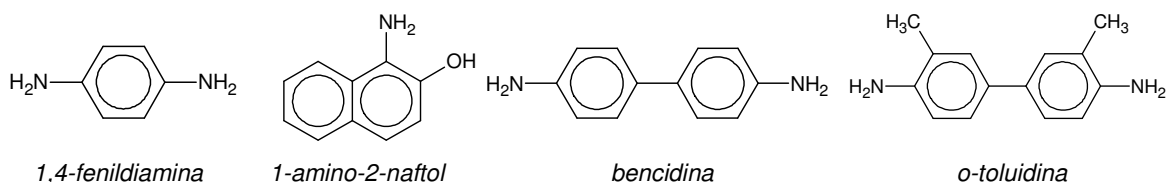


Fig. 1.4. Estructuras químicas que muestran toxicidad después de la activación metabólica de los colorantes azo (Tan, 2001).

En el caso de los colorantes azo sulfonados muestran un efecto menor o no mutagénico comparado con los colorantes azo no sulfonados debido a su carga eléctrica y baja afinidad por lípidos, que precede a que este acepte una activación metabólica (Tan, 2001).

Comprendiendo la estructura de los colorantes azo y como son degradados es posible conocer cómo son creados los productos tóxicos. Brown y De Vito (1993), basados en una extensa revisión bibliográfica referente a la toxicidad de los colorantes azo, dan lugar a los siguientes postulados (Tan, 2001):

- Los colorantes azo pueden ser tóxicos solamente después de una reducción y división de las uniones azo, produciendo aminas aromáticas.
- Puede causar toxicidad los colorantes azo que en su estructura contengan grupos libres de aminas aromáticas que puede ser metabólicamente oxidados sin reducción azo.
- La activación tóxica de los colorantes azo puede ocurrir seguido de una oxidación directa de las uniones azo produciendo sales de diazonio, altamente reactivas y electrofílicas.

Biodegradación de compuestos azo en condiciones reductoras por bacterias aisladas de lixiviados, aguas residuales y lodos activados

Tabla I.1. Aminas aromáticas, y metabolitos de los colorantes potenciales, que pueden ser considerados como cancerígenos para los humanos (Brown y De Vito, 1993).

GRUPO DE AMINA AROMÁTICA	ESTRUCTURA	EVIDENCIA CANCERIGENA HUMANA	ORGANOS AFECTADOS
α -naftilamina		Leve / mixto	Vejiga, piel (cáncer de vejiga)*
β -naftilamina		Bueno	Vejiga, piel (cáncer de vejiga)*
3,3'-diclorobencidina		Leve / mixto	Vejiga, hígado, pulmones, piel, tracto GI (en animales: cáncer de hígado y vejiga)*
3,3'-dimetoxibencidina		Leve / mixto	Vejiga (en animales: tumores en vejiga, piel, intestino, estomago)
3,3'-dimetilbencidina		Leve	Ojos, sistema respiratorio hígado, riñones (en animales: tumores en hígado, vejiga y glándulas mamarias)*
4-bifenilamina 4-aminodifenilo		Bueno	Vejiga; piel (cáncer de vejiga)*
4-nitrobifenilo		Leve/Mixto	Puede causar cáncer en el ser humano
4,4'-metilen bis(o-cloroanilina)		Leve	Puede causar cáncer de vejiga
auramina		Leve	Puede causar cáncer de vejiga
bencidina		Bueno	Vejiga, riñones, hígado, piel, sangre (cáncer de hígado, riñón y vejiga)*
N-fenil-2-naftilamina		A veces	Puede causar cáncer en el ser humano

*Las vías de entrada son: Inhalación, absorción, ingestión, consumo

1.4 Problemática ambiental por colorantes sintéticos

Los colorantes son compuestos altamente visibles, por lo que incluso pequeñas cantidades (1 mg/l) liberadas en los cuerpos de agua es rápidamente perceptible. La fuente principal de emisión de color al medio ambiente se asocia con la incorporación incompleta de los colorantes sobre las fibras textiles a partir de un proceso de tinción acuosa, en el caso particular de colorantes reactivos es de especial interés debido a la hidrólisis del colorante, que compite con la reacción tinte-fibra, apareciendo inevitablemente en las descargas de agua el tinte no fijado y el hidrolizado (Christie, 2001). Cerca del 50% de los colorantes reactivos se pierde en las aguas residuales. (Ali, 2010).

La industria textil es la principal consumidora de colorante y es una de las más grandes generadoras de efluentes contaminados debido a la alta cantidad de agua usada en los procesos, así como vierte grandes cantidades de productos contaminantes. Para la fabricación de una tonelada de producto textil se necesitan aproximadamente 200 m³ de agua, y durante su proceso se vierten el 90% del total de productos químicos utilizados (Gilabert, 2002). En una industria de lavado textil se consume cerca de 100 l de agua para producir cerca de 1 kg de material textil y se estima que 280,000 toneladas de colorantes textiles son descargados en las aguas residuales cada año en todo el mundo (Ali, 2010).

Tabla 1.2. Consumos relativos de agua de cada uno de los procesos y aplicaciones de la industria textil (Gilabert, 2002).

PROCESOS DE LA INDUSTRIA TEXTIL	CONSUMO RELATIVO DE AGUA	TINTURA	CONSUMO RELATIVO DE AGUA
Desencolado	5%	Tina	2%
Descrudado	1%	Dispersos	33%
Blanqueo	46%	Directos	14%
Mercerizado	2%	Ácidos	17%
Tintura	8%	Básicos	20%
Estampación	7%	Reactivos	14%
Lavados	30%		
Acabados	1%		

La disposición final de aguas residuales contaminadas con colorantes a cuerpos de agua puede causar serios daños al ambiente y riesgos a la salud. Estos pueden reducir la penetración de la luz a los cuerpos de agua y afectar la actividad fotosintética de la flora acuática y afectar seriamente la fuente de alimento de organismos acuáticos. La delgada capa en la superficie formada por los colorantes también disminuye la cantidad de oxígeno disuelto en el agua afectando la fauna acuática y la presencia de estos contaminantes aumenta la DBO (demanda bioquímica de oxígeno) de las aguas (Ali, 2010), es decir, la materia disuelta consume éste del agua y provocan la asfixia de la flora acuática.

Debido a su carácter recalcitrante en el ambiente aerobio, los colorantes azo eventualmente pueden acabar en sedimentos anaerobios, acuíferos poco profundos, y aguas subterráneas o en el tracto gastrointestinal de animales superiores. (Razo, et al. 1997).

1.5 Sistemas de tratamientos de efluentes con colorantes sintéticos

Se han desarrollado varias técnicas para el tratamiento de efluentes con colorantes, como los métodos fisicoquímicos como la adsorción (usando: carbón vegetal activado, sílica gel, resinas de intercambio iónico), oxidación avanzada, coagulación/floculación, membranas de filtración, electrolisis, mineralización ultrasónica, fotodegradación (radiación UV), reducción química y los métodos biológicos utilizando bacterias, hongos, levaduras y algas en procesos de tratamiento aerobio, anaerobio, anóxico, o una combinación aerobio/anaerobio. Los métodos fisicoquímicos tiene la gran desventaja por tener altos costos, baja eficiencia, versatilidad limitada, el interferir con otros constituyentes de las aguas residuales y el manejo de los residuos sólidos generados (Ali, 2010).

Los métodos biológicos son considerados de bajo impacto para el ambiente y tienen el potencial de mineralizar los contaminantes orgánicos a dióxido de carbono, agua e iones inorgánicos tales como nitratos, sulfatos y cloruros, siendo un método prometedor para el tratamiento de aguas coloreadas a un bajo costo y eficiente. La combinación de tratamientos químicos y biológicos o físicos y biológicos también han resultado ser eficientes. Es importante considerar la composición de las aguas residuales de los efluentes para estos tipos de tratamientos ya que no solo llevan consigo colorantes sino

Biodegradación de compuestos azo en condiciones reductoras por bacterias aisladas de lixiviados, aguas residuales y lodos activados

una serie de sustancias utilizadas en sus procesos como son ácidos, bases, sales, oxidantes, reductores, humectantes, espesantes, adhesivos, tensoactivos, ligantes, antisépticos, etc.

1.6 Biodegradación de colorantes sintéticos

Se ha extendido la investigación en la biodegradación en condiciones aerobias, anaerobias, microaerófilas o en sistemas de tratamiento secuenciados, así como la aplicación de diversos microorganismos capaces de interactuar con estos compuestos para lograr la degradación (Ali, 2010).

La biodegradación de un colorante es entendida como la ruptura de un compuesto en partes más simples a través de la acción de las enzimas del microorganismo, en la mayoría de los casos este proceso de degradación inicia con la ruptura del grupo cromóforo, debido a ello se lleva a cabo la decoloración del efluente coloreado. Este proceso de decoloración también puede realizarse gracias a la adsorción de la biomasa microbiana. Esta adsorción puede ocurrir por células microbiológicas vivas así como muertas y es normalmente llamada biosorción. En este proceso la estructura del colorante permanece intacta, por lo que no se resuelve el problema, debido a que la contaminación no es destruida, en lugar de eso es atrapada dentro de la matriz del adsorbente y puede ser un tratamiento ineficiente para tratar grandes volúmenes de efluentes ya que también se genera una gran cantidad de biomasa después de la biosorción, aún puede ser un proceso efectivo en el caso de querer recuperar el colorante (Ali, 2010).

Varios microorganismos incluyendo bacterias, hongos, levaduras y algas han sido usados para la decoloración y degradación de colorantes sintéticos.

1.6.1 Biodegradación de colorantes por hongos.

En el caso de la biodegradación de colorantes sintéticos por medio del uso de hongos se ha estudiado exhaustivamente el hongo blanco de la pudrición (White-rot) el cual ha sido capaz de metabolizar las moléculas de los colorantes en condiciones aerobias, debido a su sistema enzimático extracelular no selectivo y no específico consistente en lignina peroxidasa (LiP), manganasa peroxidasa (MnP) y laccasa (Ali, 2010, Van der Zee, 2002). La reacción catalizada por esta enzima son reacciones oxidativas, en el caso de la lignina

peroxidasa oxida compuestos aromáticos no fenólicos, mientras que las enzimas manganasa peroxidasa y laccasa oxidan compuestos fenólicos (Sarnthima, Khammuang, y Svasti, 2009). Debido a la semejanza de la estructura molecular del colorante con las moléculas a fines para estas enzimas es por lo que son buenas candidatas para la degradación de estos compuestos. Dentro de las limitaciones que puede implicar un tratamiento de efluentes textiles con colorantes por hongos es que se necesita el suministro de nutrientes y energía para el crecimiento de los cultivos, así como la presencia de un cofactor enzimático y de un pH ácido para la expresión del sistema enzimáticos responsable de la degradación, lo cual puede ser un problema en el tratamiento, ya que el pH de las aguas residuales textiles son alcalinas (Van der Zee, 2002).

1.6.2 Biodegradación de colorantes por levaduras.

Pocos son los trabajos que se han enfocado a la biodegradación de colorantes sintéticos por levaduras, estos microorganismos tiene la ventaja de un crecimiento rápido y forma filamentos como los hongos además de presentar resistencia a ambientes desfavorables (Ali, 2010). En los estudios realizados por Yu y Wen en el 2005 investigaron la decoloración del colorante rojo brillante reactivo K-2BPn (colorante azo) con 44 cepas de levadura, encontraron que las cepas *Pseudozyma rugulosa* Y-48 y *Candida krusei* G-1 fueron capaces de biodegradar el colorante en una concentración de 200 mg/l. El 99% de remoción de color se efectuó en solo 24 horas, así como mostraron la capacidad de degradar otros siete colorantes sintéticos en menores porcentajes y a una concentración más baja. Ellos proponen que el mecanismo de decoloración se da primero con una adsorción del colorante por parte de la matriz de la célula del microorganismo el cual se observa de color rosado a rojo, pero posteriormente la matriz pierde el color debido a la biodegradación. Saratale, et al. (2009) estudiaron la biodegradación del colorante azo azul marino HER [50 mg/l] por *Trichosporon beigelii* NCIM-3326 observando decoloración completa después de 24 horas de incubación en condiciones estáticas bajo condiciones óptimas de pH y temperatura, 7.0 y 37°C correspondientemente. Así mismo, se demostró que la levadura utiliza a los subproductos de la degradación como una fuente de carbono, por lo que se da una completa mineralización del colorante por un mecanismo de reducción enzimática, probablemente por la acción de la reductasa NADH-DCIP y azoreductasa.

1.6.3 Biodegradación de colorantes por algas.

La biodegradación de colorantes por algas se ha estudiado muy poco. Los trabajos realizados por Jinqi y Houtian (1992) reportan la capacidad de *Chlorella vulgaris* para degradar 31 colorantes industriales diferentes, estableciendo que la capacidad de decoloración del microorganismo está relacionada directamente con la estructura molecular del colorante. Adicionalmente, reportan la capacidad de la cianobacteria para usar los colorantes azul SE y negro T Ericromo como una fuente de carbono y nitrógeno. Sugieren que la destrucción del colorante se deba a la presencia de una azoreductasa que rompe el enlace azo surgiendo aminas aromáticas, lo cual es muy similar con el mecanismo de las bacterias.

1.6.4 Biodegradación de colorantes por bacterias.

Estudios han probado que la decoloración por bacterias de colorantes sintéticos es normalmente más rápida que en el caso de los hongos. Los estudios sobre la biodegradación de colorantes se han centrado en los colorantes azo, y es bien conocido que su degradación reductiva en condición anaerobia genera aminas aromáticas no coloreadas que pueden ser tóxicas, mutagénicas y carcinogénicas para humanos y animales (Ali, 2010).

En el caso del colorante azo Amarillo Mordente 10, que sufre una reducción y se forman dos aminas aromáticas (Fig. 1.5).

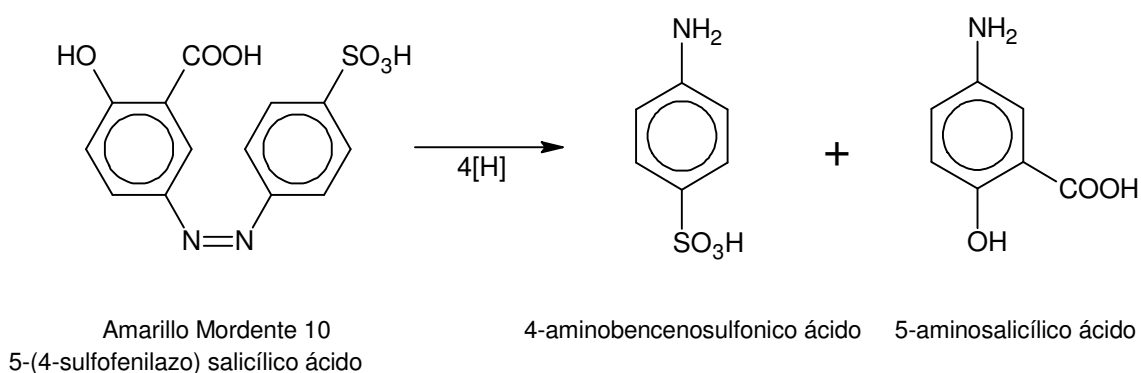


Fig. 1.5. Ejemplo de reducción azo de colorantes azo sulfonados resultando en la formación de aminas aromáticas sulfonadas y no-sulfonadas (Tan, 2001).

Las aminas aromáticas no absorben luz en el espectro visible y por consiguiente la reducción del Amarillo Mordente 10 representa un proceso de decoloración. El mecanismo de la reducción anaerobia puede implicar procesos enzimáticos diferentes, no enzimáticos, intracelulares, extracelulares y las diversas combinaciones de estos (Tan, 2001).

La habilidad de una bacteria para reducir colorantes azo los cuales tiene alta estabilidad a la biodegradación por lo que persisten en los ambientes (Wallace 2001), es principalmente atribuido a una actuación enzimática como la azoreductasa, cual puede romper el enlace azo (R-N=N-R) bajo condiciones anaerobias; esta hipótesis aceptada generalmente es porque muchas cepas bacterianas poseen enzimas citoplasmáticas no específicas que transfieren electrones vía flavin solubles. Los colorantes azo sulfonados que tienen alta polaridad, no son capaces de penetrar a través de la membrana de la célula, en estos casos la reducción del colorante azo es catalizada en el exterior de la membrana de la célula. En cambio, extracelularmente se llevaría a cabo por la acción de un compuesto mediador, el cual es capaz de la transferencia de electrones desde la membrana de la célula de la bacteria al colorante (Van der Zee, 2002; Chen, et al., 1999). Por otra parte algunos estudios sugieren que la azoreducción bacteriana bajo condiciones anaerobias es un proceso de transporte de electrones por un componente actuando como azoreductasa y el proceso es conectado a la cadena de transporte de electrones, no solamente a mediadores redox (Van der Zee, 2002).

Padmavathy et al. (2003) probaron la presencia y disponibilidad de un co-sustrato que actúa como un donador de electrones para la reducción del colorante. Ellos probaron a la glucosa, lactosa, almidón, agua residual con carga orgánica para la biodegradación por un cultivo mixto de *Pseudomonas sp*, *Bacillus sp*, *Halomonas sp*, *Arthrobacter sp* y *Micrococci*, en ocho diferentes colorantes azo reactivos. Bajo este estudio, el almidón demostró que fue el mejor donador de electrones para la decoloración de los colorantes azo reactivos, seguido por las aguas residuales municipales.

La tasa del proceso de azo reducción depende del tipo de co-sustrato utilizado y/o la estructura química del colorante, además se han observado que los compuestos que facilitan el transporte de electrones, como los mediadores redox (algunos productos resultado de la biodegradación del colorante) pueden mejorar el proceso de azoreducción (Van der Zee, 2002, Tan, 2001).

Usualmente dentro de los procesos de tratamiento de agua residual convencionales no se pueden remover eficientemente el color ya que estos compuestos son aeróbicamente recalcitrantes pero si el microorganismo aerobio es sujeto a condiciones microaerófilas, se ha reportado que la tasa de decoloración aumenta (Hong et al, 2007). Padmavathy et al. (2003) sostienen que la degradación del colorantes azo por bacterias es iniciada con la reducción catalizada por la enzima azoreductasa que puede darse en condiciones microaerófilas.

Se han demostrado la mineralización de colorantes azo en un sistema integral y secuencial anaerobio-aeróbico (Tan, 2001 y Wallace 2001). La biodegradación de los colorantes azo se lleva a cabo en primer lugar con la reducción del colorante bajo condiciones anaerobias donde se da la formación de aminas aromáticas. Los consorcios anaerobios generalmente son incapaces de estabilizar estos compuestos, pero son fácilmente biodegradados bajo condiciones aeróbicas a moléculas más sencilla, por lo que es ventajoso seguir procesos secuenciados (Tan, 2001). De la misma manera se ha encontrado que los lodos aeróbicos pueden usarse para estabilizar los metabolitos de la biodegradación de los colorantes (Wallage, 2001; Zissi, Lyberatos Pavlou, (1997).

Algunos cultivos bacterianos aerobios específicos fueron encontrados capaces de reducir la unión azo por una reacción enzimática mediada por la azoreductasa. Exitosas conversiones aeróbicas de los colorantes azo sulfonados han sido reportadas desde los 90's, encontrándose que en algunos casos hay una completa mineralización de un colorante azo sulfonado bajo condiciones aeróbicas. En otros estudios, la remoción aerobia de colorante fue lograda, pero requirió una fuente de energía y de carbono adicional para su crecimiento. Después del suministro de este sustrato fácilmente es posible que diera paso a la formación de micronichos anaerobios, concluyendo que la reducción anaerobia del colorante azo ciertamente no puede quedar excluida (Wong y Yuen, 1996; Zissi, et al. (1997).

Las células inmovilizadas y sistemas de biofilms microbianos han mostrado ser eficientes para el tratamiento de aguas residuales debido a su capacidad de trabajar a diferentes tasas de diluciones y permitir el uso de células repetidamente. Estos sistemas proporcionan un desempeño operativo estable, potencial para el uso repetido de la biomasa y excelentes características de decoloración (Anjaneya, et al. 2013).

Capítulo II

Metodología 1^a etapa: Muestreo y aislamiento de microorganismos

Para este trabajo de investigación la metodología propuesta consistió en tres etapas como se muestra en el siguiente esquema:

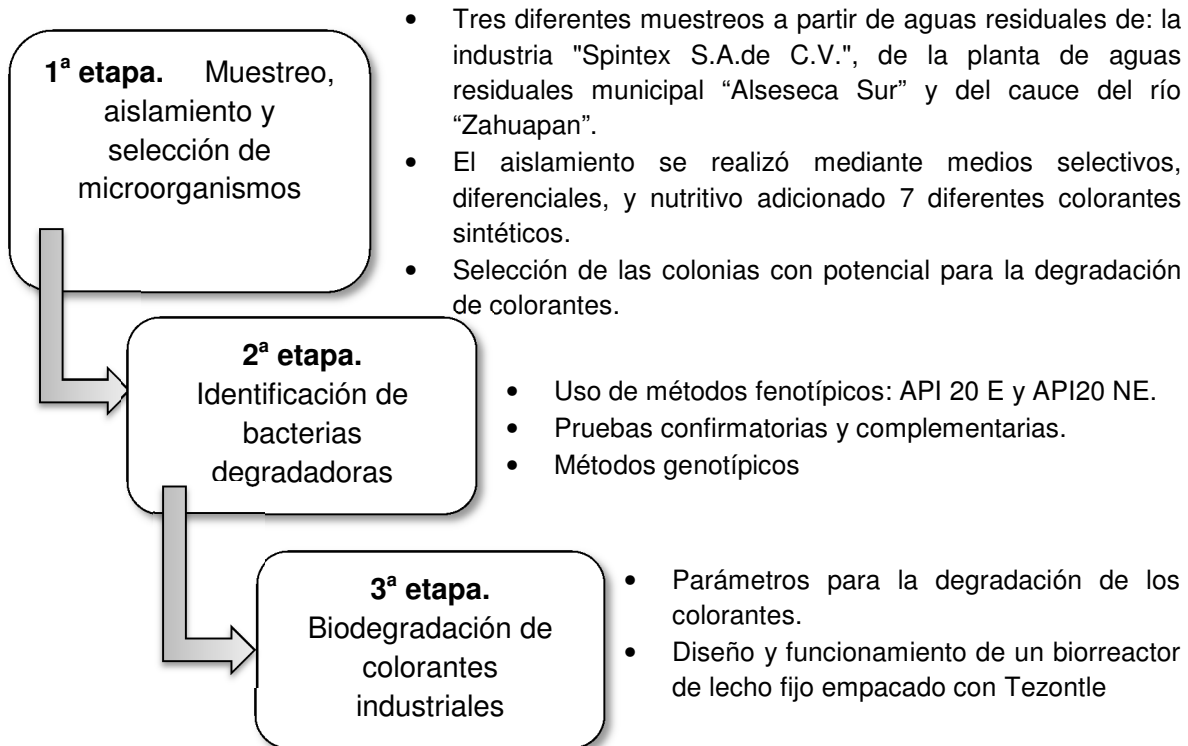


Fig. 2.1. Esquema de la metodología del trabajo de investigación.

2.1 Muestreo para el aislamiento de las bacterias

Para el aislamiento de las bacterias que se emplearon en esta investigación se realizaron muestreos de tres sitios estratégicos: a) industria textil “Spintex, S. A. de C.V.”, ubicada en el estado de Tlaxcala (tomando una muestra del efluente de descarga del sistema de tratamiento de aguas residuales, que trata aguas proveniente de su proceso de teñido y lavado); b) planta de tratamiento de aguas residuales municipal “Alseseca Sur” donde se tomaron tres muestras, (una del influente de la planta de tratamiento, otra del efluente del reactor anaerobio y la última del efluente del proceso de deshidratación de lodos); c) río Zahuapan del estado de Tlaxcala, tomando la muestra en la intersección del río y el puente sobre la carretera Federal Puebla-Tlaxcala. Este río recibe descargas industriales y municipales; sus aguas se incorporan al río Atoyac al pasar al estado de Puebla.

El muestreo se realizó bajo las normas mexicanas NMX-AAA-003-1980 “Aguas Residuales”, NMX-AA-014-1980 “Cuerpos Receptores-Muestreo”, NOM-014-SSA1-1993 “Procedimientos Sanitarios para el Muestreo de Agua para Uso y Consumo Humano en Sistemas de Abastecimiento de Agua Públicos y Privados”; específicamente en la preparación de envases, la toma de la muestra y el traslado y la utilización del equipo de seguridad correspondiente.

2.2 Aislamiento y selección de las colonias bacterianas

2.2.1 Preparación del inóculo

Para el aislamiento de los microorganismos de las muestras líquidas, se preparó 90 ml de solución salina (85%) estéril en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se realizaron diluciones decimales seriadas (hasta 10^{-5}), estos pasos se realizan para cada una de las muestras líquidas. En el caso de la muestra procedente de los lodos deshidratados de la planta de tratamiento Municipal “Alseseca Sur”, se tomaron 10 g de la muestra y se disolvieron en 90 ml de solución salina estéril en un matraz Erlenmeyer de 125 ml. Posteriormente se inocularon en el medio del cultivo descrito en el siguiente apartado, para el aislamiento de bacterias de interés para este estudio.

2.2.2 Inoculación del medio de crecimiento.

El aislamiento de las bacterias con potencial en la degradación de colorantes sintéticos se realizó mediante un medio sólido en placas adicionado con colorante sintético en una concentración de 50 ppm. Se utilizaron cinco colorantes industriales (Marino Remazol RGB, Marino Remazol C, Azul de Levafix CA, Rojo Intenso RGB y Azul Marino GKTS) proporcionados por la industria textil Spintex S.A. de C.V., y dos colorantes de grado reactivo (Naranja de Metilo y Rojo Congo) adquiridos de Sigma-Aldrich.

Por cada colorante se prepararon 12 cajas petri para inocular con las diluciones correspondientes (10^{-1} a 10^{-5}), el testigo y por duplicado. Se dejaron incubar por 24 horas a 30°C en un cuarto oscuro.

La composición del medio para el aislamiento fue (g/l) peptona de carne (5), extracto de levadura (2.5), NaCl (5), ZnSO_4 (0.1), colorante azo (0.05), agar (20), agua destilada (1 l) a pH de 6.8-7.0.

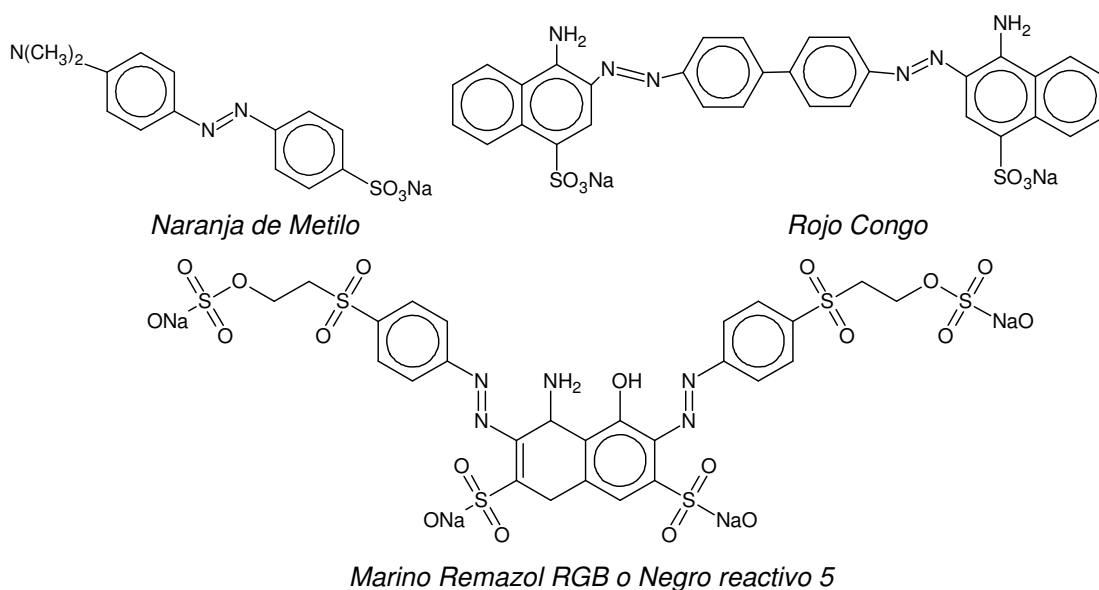


Fig. 2.2. Estructura química de tres colorantes utilizados en el aislamiento de las bacterias (Sigma-aldrich, 2014).

Después de 24 horas de incubación las placas fueron observadas, se contó el número promedio de población y se eligieron aquellos microorganismos que mostraron zonas claras alrededor de la colonia y forma bien definida.

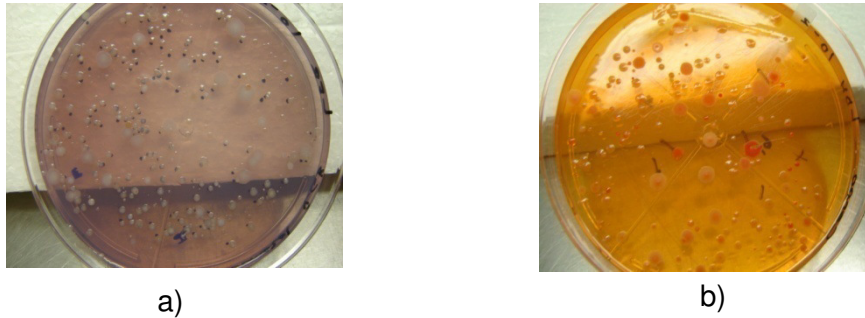


Fig. 2.3. Fotografía de las placas del aislamiento de microorganismos (diluciones 10^{-2}) para la degradación de colorantes sintético a) en Azul de Levafix CA y b) Rojo Congo.

2.2.3 Pruebas selectivas, diferenciales y preliminares.

Con la finalidad de seleccionar a los microorganismos que no fueran potencialmente patógenos de humanos o requirieran condiciones especiales de crecimiento, las colonias que mostraron tener potencial de degradar colorante fueron sembradas en medios selectivos y diferenciales en placa, los medios utilizados fueron: agar Mac Conkey, agar Cetrimida, Chromagar Salmonella que fueron preparados según las indicaciones del fabricante, se sembraron por la técnica de estría en superficie y se encubaron a 30°C por 48 horas.

Se realizaron pruebas preliminares de degradación para las colonias aisladas como un parámetro de selección, para ello se usó el mismo medio de aislamiento probando: a) siete colorantes en una concentración de 50 ppm en placa; b) el Rojo Congo, Naranja de Metilo y Azul de Levafix en 100 ppm, en un medio semigelificado (reduciendo un 87.5% el agar del medio) y en tubos de ensaye para las colonias provenientes de muestras líquidas y; c) el Rojo Congo, Naranja de Metilo y Azul de Levafix en 100 ppm en un medio sólido en placas para las colonias de los lodos deshidratados. Se incubaron por cuatro días en un cuarto oscuro a 30°C contando con un control positivo.

Asimismo se sometieron a pruebas preliminares de degradación a 44 colonias provenientes de los lixiviados del relleno sanitario de Puebla “Chiltepeque” que habían sido utilizados satisfactoriamente en la degradación de compuestos fenólicos en un estudio previo a esta investigación, debido a la similitud de la estructura química de estos

Biodegradación de compuestos azo en condiciones reductoras por bacterias aisladas de lixiviados, aguas residuales y lodos activados

compuestos con los colorantes azo se planteó como posibles candidatos para la degradación de aguas coloreadas.

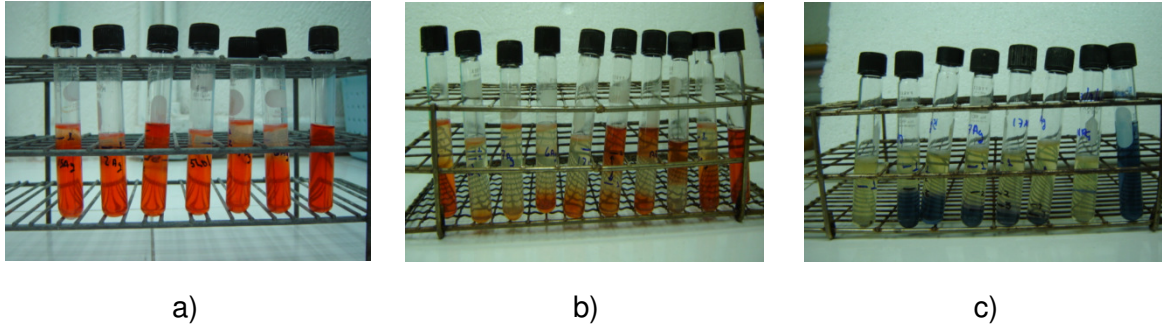


Fig. 2.4. Fotografía de las pruebas de degradación en medio semigelificado con 100 ppm de colorante, Rojo Congo después de a) 1 día, b) 5 días y c) Azul de Levafix en 1 día.

Las colonias usadas en este estudio se conservaron en glicerol (10%) a -80°C .

2.3 Resultados del muestreo y aislamiento

El pH de las muestras osciló entre 7.51 y 7.84, la temperatura entre 20 y 35°C , el color de las muestras fue gris. Solo para el caso de la muestra proveniente del efluente del proceso de deshidratación de lodos de la planta de tratamiento municipal “Alseseca Sur” su estado fue sólido.

Pasando las 24 horas de incubación de las placas del aislamiento se observaron a contra luz cada una de ellas, el tamaño de las colonias era diverso al igual que su morfología, se hizo el conteo de la población los resultados pueden observarse en la tabla II.1.

Se aislaron 114 colonias que mostraban zonas decoloradas alrededor de ellas de los diferentes sitios muestreados. De las cuales, 30 colonias se aislaron del efluente de descarga del sistema de tratamiento de aguas residuales de la industria textil “Spintex, S. A. de C.V.”; 18 del influente de la planta de tratamiento municipal “Alseseca Sur”; 17 del efluente de la salida del reactor anaerobio (lodos frescos); 19 del efluente de salida del proceso de deshidratación de lodos de la misma planta municipal y por último, se aislaron 30 colonias a partir del río Zahuapan.

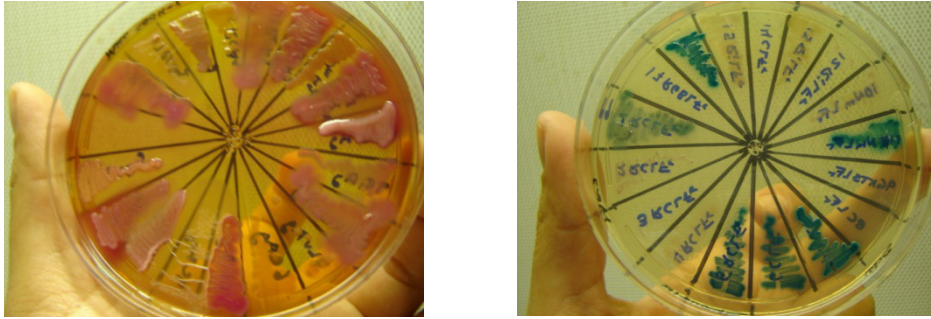
Tabla II.1. Número de células bacterianas por medio del método de recuento en placa con diluciones seriales, en placa con adición de colorantes sintéticos.

	10 ⁻² Ufc/ml	10 ⁻³ Ufc/ml	10 ⁻⁴ Ufc/ml	10 ⁻⁵ Ufc/ml	10 ⁻² Ufc/ml	10 ⁻³ Ufc/ml	10 ⁻⁴ Ufc/ml	10 ⁻⁵ Ufc/ml
	Agua residual planta "Alseseca Sur"				Lodos frescos de la planta "Alseseca Sur"			
Rojo Congo	++	5.9x10 ⁵	5.0x10 ⁵	/	++	1.4x10 ⁵	/	/
Azul Marino GKTS	++	3.9x10 ⁵	1.9x10 ⁶	2.0x10 ⁶	++	1.2x10 ⁵	2.0x10 ⁵	/
Marino Remazol RGB	++	5.0x10 ⁵	1.7x10 ⁶	1.0x10 ⁶	++	2.2x10 ⁵	3.0x10 ⁵	/
Rojo Intenso RGB	++	1.1x10 ⁶	1.1x10 ⁶	/	++	2.0x10 ⁵	1.0x10 ⁵	/
Naranja de Metilo	++	7.9x10 ⁵	2.5x10 ⁶	4.0x10 ⁶	++	1.1x10 ⁵	2.0x10 ⁵	/
Azul de Levafix	++	7.8x10 ⁵	1.2x10 ⁶	2.0x10 ⁶	++	2.3x10 ⁵	/	/
Marino Remazol C	++	3.9x10 ⁵	2.4x10 ⁶	/	++	1.7x10 ⁵	1.0x10 ⁵	/
	Lodos deshidratados de la planta "Alseseca Sur"				Agua residual de la Planta Textil "Spintex, S.A. de C.V."			
Rojo Congo	++	3.3x10 ^{5*}	3.0x10 ^{5*}	/	++	++	1.0x10 ⁶	1.0x10 ⁶
Azul Marino GKTS	++	1.06x10 ^{6*}	6.0x10 ^{5*}	/	++	++	5.0x10 ⁵	1.0x10 ⁶
Marino Remazol RGB	++	6.7x10 ^{5*}	3.0x10 ^{5*}	2.0x10 ^{6*}	++	++	2.0x10 ⁶	/
Rojo Intenso RGB	++	4.6x10 ^{5*}	1.9x10 ^{6*}	1.0x10 ^{6*}	++	++	1.3x10 ⁶	1.0x10 ⁶
Naranja de Metilo	++	5.4x10 ^{5*}	7.0x10 ^{5*}	/	++	++	2.2x10 ⁶	3.0x10 ⁶
Azul de Levafix	++	6.8x10 ^{5*}	1.0x10 ^{6*}	1.0x10 ^{6*}	++	++	8.0x10 ⁵	1.0x10 ⁶
Marino Remazol C	++	6.9x10 ^{5*}	5.0x10 ^{5*}	1.0x10 ^{6*}	++	++	2.0x10 ⁶	1.0x10 ⁶

++ Incontable / Sin crecimiento * población dada en ufc/g

Los resultados de las pruebas selectivas y diferenciales aplicadas a las colonias aisladas revelaron que el 70% son bacterias gramnegativas y de estas el 56% son lactosa positivo en base al crecimiento en agar Mac Conkey; el 33% de las colonias creció en el agar Cetrimida lo cual sugiere que se puede tratar del género *Pseudomonas*, y el 12% modificó el color en el medio Chromagar Salmonella produciendo un color malva. En base a estos resultados de las 30 colonias aisladas se descartaron 15 provenientes del efluente de descarga del sistema de tratamiento de aguas residuales de la industria textil "Spintex, S. A. de C.V."

Con respecto a los tratamientos preliminares de degradación, se observó que solo el 51% de ellas creció en el medio en placa con 50 ppm del colorante Naranja de Metilo, el 68.7% creció en el Marino Remazol C, el 69.7% creció en el colorante Azul Marino GKTS, el 71.7% en el Azul de Levafix CA, el 72.7% creció en el Rojo Intenso RGB, en los colorantes donde se tuvo un mayor crecimiento fue en el Marino Remazol RGB y el Rojo Congo, con 78.8% y 80.8% respectivamente.



a)

b)

Fig. 2.5. Fotografía de las placas en crecimiento en medio selectivo y diferencial, a) crecimiento en agar Mac Conkey y b) Chromagar Salmonella.

Para las colonias proveniente de los lixiviados del relleno sanitario la mayoría creció en el medio con el colorante Naranja de Metilo (70.4%), seguido por el Rojo Congo con un 68.2% y el 65.9% de las colonias creció por igual en Azul Marino GKTS, Marino Remazol RGB y Azul de Levafix CA, mientras que la menor población se observó en el medio con el colorante Marino Remazol C con un 56.8%.

El ensayo que determinó la selección final de las bacterias a trabajar en los tratamientos de degradación, fue las pruebas de decoloración en tubo de ensayo en medio semigelificado (condiciones de respiración microaerófilas), donde se escogieron aquellas bacterias que tuvieran los más altos porcentajes de decoloración. Estos ensayos revelaron que solo 14 colonias fueron capaces de decolorar parcial o totalmente el medio de cultivo conteniendo una concentración de 100 ppm del colorante Rojo Congo, solo 5 colonias revelaron decoloración con el Naranja de Metilo y 24 para el caso del Azul de Levafix CA, tal y como lo muestra la tabla II.2.

En base a los resultados de decoloración del medio probado se seleccionaron para continuar con la investigación a 24 colonias de las cuales 9 colonias provienen del influente de la planta de tratamiento municipal "Alseseca Sur", 1 colonia del efluente del reactor anaerobio de la planta de tratamiento "Alseseca Sur", 2 colonias del efluente del proceso de deshidratación de lodos de la misma planta, 4 del efluente de descarga del sistema de tratamiento de aguas residual de la industria textil "Spintex, S.A. de C.V.", 3 colonias de la muestra tomada en el río Zahuapan y 5 colonias de los lixiviados del relleno sanitario de la ciudad de Puebla "Chiltepeque" (tabla II.2).

Biodegradación de compuestos azo en condiciones reductoras por bacterias aisladas de lixiviados, aguas residuales y lodos activados

Tabla II.2. Resultados de la decoloración de las colonias seleccionadas en el medio de asilamiento con una concentración 100 ppm de colorante durante 5 días.

	Rojo Congo	Naranja de Metilo	Azul de Levafix CA	Procedencia
1MRGB _{BUAP}	50% del medio	sin cambios	100% del medio	ETT
4GKTS _{BUAP}	sin cambio	sin cambios	100% del medio	ETT
8RI _{BUAP}	30% del medio	sin cambios	100% del medio	ETT
17MRC _{BUAP}	sin cambio	sin cambios	100% del medio	ETT
3CAG _{BUAP}	sin cambio	sin cambios	100% del medio	IPT
6CAG _{BUAP}	100% del medio	100% del medio	100% del medio	IPT
7LvAG _{BUAP}	100% del medio	40% del medio	100% del medio	IPT
8GKTSAG _{BUAP}	sin cambio	sin cambios	100% del medio	IPT
10 NmAG _{BUAP}	sin cambio	sin cambios	80% del medio	IPT
12NmAG _{BUAP}	60% del medio	sin cambios	100% del medio	IPT
13NmAG _{BUAP}	sin cambio	sin cambios	100% del medio	IPT
14RCAG _{BUAP}	sin cambio	sin cambios	50% del medio	IPT
15RCAG _{BUAP}	50% del medio	100% del medio	100% del medio	IPT
11NmLFr _{BUAP}	sin cambio	producción de gas	30% del medio	LPT
3RI LDh _{BUAP}	30% del medio	100% del medio	100% del medio	LDPT
5RGLDh _{BUAP}	60% del medio	100% del medio	100% del medio	LDPT
G _{BUAP}	sin cambio	sin cambios	100% del medio	LX
X _{BUAP}	sin cambio	sin cambios	100% del medio	LX
AN _{BUAP}	60% del medio	sin cambios	100% del medio	LX
AÑ _{BUAP}	60% del medio	sin cambios	100% del medio	LX
AO _{BUAP}	50% del medio	sin cambios	100% del medio	LX
6 _{BUAP}	30% del medio	sin cambios	100% del medio	AGZ
36 _{BUAP}	40% del medio	sin cambios	100% del medio	AGZ
40 _{BUAP}	40% del medio	sin cambios	100% del medio	AGZ

ETT, Efluente de descarga del sistema de tratamiento de la industria textil "Spintex S.A. de C.V."
 IPT, Influyente de la planta de tratamiento municipal "Alsesecca Sur"
 LPT, Efluente del reactor anaerobio de la planta de tratamiento "Alsesecca Sur"
 LDPT, Efluente del proceso de deshidratación de lodos de la planta de tratamiento "Alsesecca Sur"
 LX, Lixiviados del Relleno Sanitario de Puebla "Chiltepeque"
 AGZ, Muestra del río Zahuapan

Capítulo III

Metodología 2^a etapa: **Identificación de bacterias degradadoras**

La mayor parte de la identificación de las bacterias se realizó por medio de métodos convencionales basados en las características fenotípicas debido a su accesibilidad y bajo costo. Para el proceso de identificación se optó por una batería de pruebas fiables que son API 20E el cual ha sido reportado como de gran utilidad para la identificación de gramnegativos no fermentadores más comunes (Shayegani, Maupin, y McGlynn, 1977), así como API 20NE (Dance, et al. 1989).

La ausencia de concordancia entre las características observables, morfológicas y/o fenotípicas de las bacterias a identificar y de las especies tipo, hizo que se recurriera a los métodos genotípicos, como un procedimiento complementario o alternativo. Debido a que no se contaba con los recursos suficientes para la identificación de todas las colonias, solo fueron utilizados para identificar a tres bacterias de esta investigación, de las cuales no se tenía datos concluyentes mediante las pruebas bioquímicas.

3.1 Identificación mediante métodos fenotípicos

A las 24 colonias seleccionadas por tener potencial para la degradación de colorantes azo se les hicieron pruebas de tinción de Gram para garantizar que se utilizan para esta investigación bacterias gramnegativas y poder observar su morfología.

Con la finalidad de contar con información preliminar del tipo de microorganismo que se había aislado y seleccionado se crecieron las colonias en placas del medio CPS ID 3 (ver Apéndice A) de bioMérieux Inc; que permite identificar los grupos bacterianos siguientes:

- *Escherichia coli*
- *Enterococcus*
- *Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter* (KESC)
- *Proteus, Providencia, Morganella (Proteeae)*.

La siembra se hizo depositando el inóculo en un solo punto y la incubación se hizo de acuerdo a lo establecido por el fabricante.

La identificación bioquímica final se hizo con dos sistemas estandarizados comerciales, el “API 20 E” que nos permiten identificar bacterias del género *Enterobacteriaceae* y otros bacilos gramnegativos no exigentes y el “API 20 NE” que nos permite identificar bacilos gramnegativos no fermentadores; estos kits fueron adquiridos con bioMérieux, Inc. Las pruebas se hicieron siguiendo las instrucciones del fabricante (ver Apéndice B y C). Las pruebas complementarias necesarias para integrar el perfil número para estos ensayos fueron:

- Pruebas de Catalasa/Oxidasa.
- Crecimiento en agar Mac Conkey.
- Oxidación y fermentación de la glucosa.
- Prueba de movilidad.

Para la prueba de catalasa y oxidasa previamente se sembraron las colonias en placa con agar nutritivo cuya composición (g/l) es peptona de carne (3), peptona de caseína (5), NaCl (0.85), agar (20) y agua destilada (1 l) a pH de 6.8-7 y se dejaron encubar por 24 horas.

En la prueba de catalasa, se le adiciono directamente a la colonia por goteo 100 μ l de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) en una concentración del 3%, para observar la formación inmediata de burbujas indicativo de la presencia de la enzima.

Para la determinación de la enzima oxidasa se utilizaron los cartones “Dryslide™ oxidase” de laboratorios DIFCO, estas se inocularon colocando con un asa de nicromio

Biodegradación de compuestos azo en condiciones reductoras por bacterias aisladas de lixiviados, aguas residuales y lodos activados

una pequeña cantidad del microorganismo recientemente crecido (24 horas) y observando el cambio de coloración.

El agar Mac Conkey se preparó en base a lo establecido por el fabricante, se sembraron las colonias por la técnica de estría en superficie con cultivos jóvenes de 24 horas y se encubaron a 30°C por 48 horas.

La prueba de oxidación y fermentación de la glucosa se hizo con base en el medio Hugh & Leifson o medio O F. Se inocularon los tubos a partir de cultivos puros de 24 horas utilizando una aguja de inoculación.

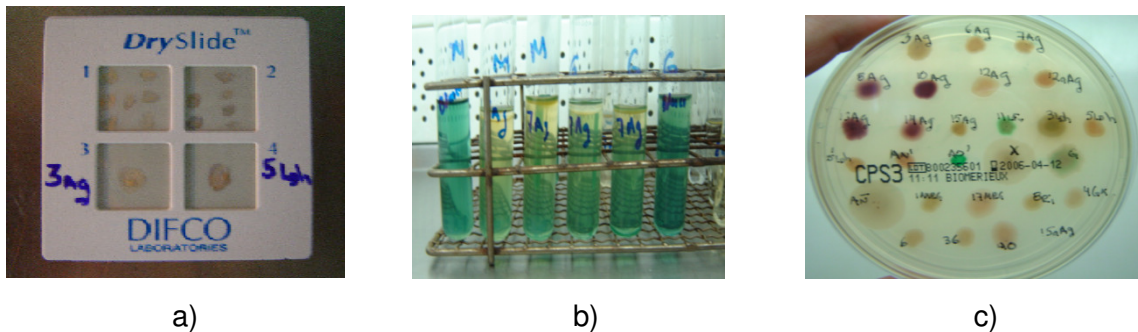


Fig. 3.1. Fotografía de las pruebas requeridas para la identificación bioquímica de las colonias seleccionadas, a) determinación de la enzima oxidasa, b) medio OF y c) medio CPS3.

Antes de iniciar con las pruebas de API 20 E y API 20 NE, se sembraron las colonias en agar TSA (Trypticase Soy Agar) preparándolo de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Para aquellos microorganismos que son bacilos gramnegativos, oxidasa negativo, catalasa positivo y fermentan la glucosa se utilizó la prueba API 20 E (para *Enterobacteriaceae* y otros bacilos gramnegativos no exigentes) y para el resto de las colonias el API 20 NE (para bacilos gramnegativos no fermentadores).

Se hicieron pruebas complementarias para complementar la identificación, las cuales fueron elegidas de acuerdo a la sospecha del género al que correspondía la bacteria. Los ensayos utilizados fueron crecimiento en agar Sulfito Bismuto, agar TCBS, producción de Lecitinasa, crecimiento con glucosa, glicerol, reducción de NO₃, crecimiento en los detergentes Tween 80 (polisorbato 80 N.F.), Tritón X-100 y SDS (sodio dodecilsulfato), cetrimida, crecimiento al 1, 1.5, 2, 3 y 4% de NaCl, con un pH de 3, 3.5, 4,

Biodegradación de compuestos azo en condiciones reductoras por bacterias aisladas de lixiviados, aguas residuales y lodos activados

4.5, 5, 8, 8.5, 9, 9.5 y 10, crecimiento en sacarosa a 3.5, 7 y 10%; crecimiento a 42°C. Estas pruebas se detallan a continuación.

Las pruebas en Sulfito de Bismuto y TCBS fueron preparados de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Para probar la degradación de lecitina, se utilizó el agar Egg Yolk, se inoculó y se dejó incubar por 24 horas. Se utilizó el medio O F para las pruebas de crecimiento con glucosa al 1%. Para el crecimiento con glicerol se usó este mismo medio adicionado con 5 ml de glicerol por litro. La reducción de NO₃ también se probó con el medio O F adicionado con 1 g por litro de KNO₃. El crecimiento con Tween 80, Triton X-100, SDS y cetrimida se hicieron en agar TSA (Trypticase Soy Agar) usando una concentración para 1 l de agua destilada de 4 ml de Tween 80, 0.2 g de Tritón X-100, 3 g de SDS y 0.3 g/l de cetrimida. Las pruebas de crecimiento con diferentes concentraciones de NaCl, de sacarosa y diferentes pH, se usó caldo nutritivo con la siguiente composición (g/l): peptona de carne (8) y extracto de levadura (3), incubando por 24 horas.

Se hicieron pruebas confirmatorias para algunas colonias que consistieron en agar Pseudomonas, crecimiento con maltosa, crecimiento al 4 y 6.5% de NaCl, crecimiento a 4, 35 y 42°C, crecimiento con Inositol, con lactato férrico y agar Pseudomonas con glicerol. Para cerciorarse de que se tratará de *Pseudomonas spp.*, se utilizó el agar Pseudomonas que se preparó para placa de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se inoculó con cultivos de 24 horas, a pH de 6.8-7.2. También se utilizó el medio O F para las pruebas de crecimiento con maltosa al 1% y se utilizó el agar Pseudomonas con glicerol (adicionando 5 ml/l de glicerol y 5 g/l de agar) buscando la aparición de pigmentos fluorescentes.

Las pruebas de diferentes concentraciones de NaCl (4 y 6.5%) y de temperaturas (4, 35 y 42 °C) se hizo mediante un caldo de peptonas cuya composición es (g/l), peptona de carne (3), peptona de caseína (5), agua 1 l; para el caso de crecimiento en diferentes temperatura se usó 0.85 g de NaCl, pH de 6.8-7 y se incubó por 24 horas. Estas pruebas fueron con la finalidad de confirmar entre el género *Shewanella* y *Pseudomonas*.

Para el crecimiento con lactato férrico se preparó el medio con la siguiente composición (g/l): peptona de carne (2.5), NaHCO₃ (2.5), NH₄Cl (1.5), KH₂PO₄ (0.6), KCl (0.1), extracto de levadura (0.05), Na₂MoO₄ (0.00025), MgSO₄ (0.1), MnSO₄ (0.05), agar

Biodegradación de compuestos azo en condiciones reductoras por bacterias aisladas de lixiviados, aguas residuales y lodos activados

(20), azul de bromotimol (0.03) y lactato (2 ml/l). pH 6.8-7, y se dejaron encubar por 24 horas. Medio recomendado para el aislamiento del género *Shewanella*.

Las pruebas de crecimiento de inositol cuya finalidad fue descartar el género *Acinetobacter*, se hizo mediante el medio Acetato-NO₃ modificado, cuya composición es (g/l): inositol (2), KNO₃ (1), K₂HPO₄ (0.5), MgSO₄ (0.1), NaCl (0.1) y agar (18), pH de 6.8-7, y se dejaron encubar por 14 horas.

3.2 Identificación mediante métodos genotípicos

Para las tres colonias que se hizo la identificación mediante métodos moleculares, se inocularon en medio nutritivo líquido para disminuir la síntesis de polisacáridos, incubando durante 48 horas a 28°C. Posteriormente se efectuó la extracción de DNA de las células mediante el kit "Wizard Genomic DNA purification" de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

Se amplificó el gen ribosomal 16s por PCR a partir del DNA extraído utilizando oligonucleótidos universales FGPS-6 (5'-GGA GAG TTA GAT CTT GGC TCA G-3) y FGPS-1509 (5'-AAG GAG GGG ATC CAG CCG CA-3') (Normand et al., 1992). El oligonucleótido universal permite amplificar un fragmento de aproximadamente 1500 pares de base (pb).

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Tabla III.1. Condiciones de amplificación del gen ribosomal 16s para PCR.

Proceso	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Desnaturalización inicial	5 min	94°C	1
Desnaturalización	30 seg	94°C	35
Alineamiento	30 seg	60°C	35
Elongación enzimática	2 min	72°C	35
Extensión final	7 min	72°C	1

Se calcularon las concentraciones de DNA en correlación al marcador de Bioline de 10 kb en geles de agarosa al 1%. El producto de amplificación se verificó mediante la electroforesis en geles de agarosa al 1% a 100 mV, luego de ser teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) para su observación. Se purificó mediante la utilización del set “Qiagen Gel Extraction Kit” y se mandó a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM).

Las secuencias obtenidas de la amplificación del gen 16s rDNA fueron comparadas con secuencias del mismo gen encontradas en la base de datos de National Center for Biotechnology Information (NCBI), en “Nucleotide Blast” con el fin de identificar el género bacteriano al que pertenecen. Para la colonia 7LvAg_{BUAP} se obtuvo 625 nucleótidos (nt), AO_{BUAP} 791 nt y para 1MRG_{BUAP} 457 nt.

Posteriormente se obtuvieron secuencias del gen 16s rDNA de las colonias de referencia de cada género del grupo *Shewanella sp.*, *Citrobacter Sp.* y *Stenotrophomonas sp.*, para la elaboración del árbol filogenético. El alineamiento se llevó a cabo con Clustal X; para la edición de éste, se utilizó el software BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999), el análisis filogenético se utilizó el método matemático Neighbor joining y para la edición de los árboles se manejó el software Mega 4.1 (Tamura et al. 2007).

Como out-group se tomó a un representante de *Rhizobium*. La confiabilidad del árbol fue hecha mediante el análisis de bootstrap con 1000 repeticiones.

3.3 Resultados del proceso de identificación

De las 24 colonias seleccionadas se añadieron tres más que fueron localizadas que crecían junto a tres cepas seleccionadas. Se verificó que el 100% correspondió a bacterias gramnegativas.

3.3.1. Métodos fenotípicos.

Según lo observado por el crecimiento de las bacterias en el medio CPS ID3 de las 27 colonias 4 se tratan del grupo bacteriano *Escherichia coli*, dos del grupo KESC (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*) y un posible *Proteus*. Estos resultados fueron confirmados por la batería bioquímica API 20 E. La descripción de la morfología

Biodegradación de compuestos azo en condiciones reductoras por bacterias aisladas de lixiviados, aguas residuales y lodos activados

de cada bacteria así como los resultados del crecimiento en CPS ID3 pueden consultarse en la siguiente tabla.

Tabla III.2. Resultados del crecimiento en el medio CPS ID 3 en 24 hrs., de incubación y la morfologías observada en la tinción de Gram.

COLONIA	COLOR DE LA COLONIA EN MEDIO CPS 3	IDENTIFICACIÓN POR CPS3	TINCIÓN DE GRAM
1MRGB _{BUAP}	Blanca	No concluyente	Bacilos cortos pleomorficos G(-)
4GKTS _{BUAP}	Blanca	No concluyente	Bacilos G(-)
8RI _{BUAP}	Blanca	No concluyente	Cocobacilos G(-)
17MRC _{BUAP}	Anaranjado	No concluyente	Bacilos G(-)
3CAg _{BUAP}	Blanca	No concluyente	Bacilos cortitos G(-)
6CAg _{BUAP}	Anaranjado	No concluyente	Bacilos cortitos G (-)
7LvAg _{BUAP}	Anaranjado	No concluyente	Bacilos cortitos G(-)
8GKTSAg _{BUAP}	Malva con bordes blancos	<i>E. coli</i>	Cocobacilos G(-)
10 NmAg _{BUAP}	Malva con pequeños bordes blancos	<i>E. coli</i>	Cocobacilos G(-)
12NmAg _{BUAP}	Anaranjado	No concluyente	Bacilos largos flacos G(-)
12(a)NmAg _{BUAP}	Anaranjado	No concluyente	Bacilos largos con granulos metacromaticos G(-)
13NmAg _{BUAP}	Malva	<i>E. coli</i>	Bacilos curvos G(-)
14RCAg _{BUAP}	Malva con bordes blancos	<i>E. coli</i>	Cocobacilos gram variable G(-)
15RCAg _{BUAP}	Amarillo claro	No concluyente	Bacilo curvos G(-)
15(a)RCAg _{BUAP}	Amarillo claro	No concluyente	Bacilos G(-)
11NmLFr _{BUAP}	Verde bandera con centro color crema	KESC	Bacilo curvos G(-)
3RiLDh _{BUAP}	Marrón	<i>Proteus</i>	Cocobacilo pleomorficos G(-)
5RGLDh _{BUAP}	Anaranjado	No concluyente	Bacilos pequeños G(-)
5(a)RGLDh _{BUAP}	Anaranjado	No concluyente	Bacilos cortitos G(-)
G _{BUAP}	Blanca con centro verde	No concluyente	Cocobacilos G(-)
X _{BUAP}	Blanca mate	No concluyente	Bacilos en cadena G (-)
AN _{BUAP}	Anaranjado	No concluyente	Bacilos curvos G(-) chiquitos
AÑ _{BUAP}	Blanca mate	No concluyente	Bacilos gorditos con granulos metacromaticos
AO _{BUAP}	Verde fuerte	KESC	Cocobacilos G(-)
6 _{BUAP}	Blanca	No concluyente	Bacilos metacromaticos G(-)
36 _{BUAP}	Blanca	No concluyente	Bacilos pleomorficos G(-)
40 _{BUAP}	Anaranjado	No concluyente	Bacilos cortos curvos G(-)

Para 9 colonias que fueron bacilos gramnegativos, oxidasa negativo, catalasa positivo y fermentaron la glucosa se utilizó la prueba API 20 E y para el resto (18 colonias) el API 20 NE. De las 27 colonias probadas solo se lograron identificar por estos sistemas

Biodegradación de compuestos azo en condiciones reductoras por bacterias aisladas de lixiviados, aguas residuales y lodos activados

estandarizados 19, el resto fueron sometidas a pruebas bioquímicas complementarias para lograr su identificación de las cuales 3 fueron analizadas con métodos genotípicos.

Se lograron identificar mediante API's: *Aeromonas hydrophila/caviae*, *Agrobacterium radiobacter*, *Escherichia coli*, *Kluyvera spp*, *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Shewanella putrefaciens*. Los resultados, el perfil numérico y el porcentaje de identificación (ID) arrojados por el software de identificación del API 20 E y 20 NE (que se obtuvieron del sitio de internet: <https://apiweb.biomerieux.com>) se muestran en la tabla III.3.

Tabla III.3. Identificación de las colonias mediante los sistemas estandarizados API 20 E y API 20. NE.

COLONIA	PRUEBA REALIZADA	PERFIL NUMÉRICO	% ID	IDENTIFICACIÓN
4GKTS _{BUAP}	API 20NE	1 044 655	99.9	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
3CAg _{BUAP}	API 20E	0 174 000 (57)	99.9	<i>Morganella morganii</i>
6CAg _{BUAP}	API 20NE	3 4?? 754	98.9	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>
8GKTSAg _{BUAP}	API 20E	5 044 572 (57)	99.9	<i>Escherichia coli 1</i>
10 NmAg _{BUAP}	API 20E	5 044 102 (17)	99.6	<i>Escherichia coli 2</i>
12NmAg _{BUAP}	API 20NE	1 4?? 344	96.3	<i>Shewanella putrefaciens</i>
*12(a)NmAg _{BUAP}	API 20NE	1 4?? 744	99.0	<i>Agrobacterium radiobacter</i>
13NmAg _{BUAP}	API 20E	5 144 572 (57)	99.5	<i>Escherichia coli 1</i>
14RCAg _{BUAP}	API 20E	5 144 572 (57)	99.5	<i>Escherichia coli 1</i>
15RCAg _{BUAP}	API 20NE	1 410 044	93.7	<i>Shewanella putrefaciens</i>
*15(a)RCAg _{BUAP}	API 20NE	1 410 3?4	98.0	<i>Shewanella putrefaciens</i>
11NmLFr _{BUAP}	API 20E	1 344 173 (17)	98.2	<i>Kluyvera spp</i>
3RiLDh _{BUAP}	API 20E	0 476 021 (57)	99.9	<i>Proteus vulgaris</i>
5RGLDh _{BUAP}	API 20NE	1 4?1 1?4	99.8	<i>Shewanella putrefaciens</i>
*5(a)RGLDh _{BUAP}	API 20NE	1 41? 104	99.5	<i>Shewanella putrefaciens</i>
AN _{BUAP}	API 20NE	1 4?? 344	98.2	<i>Shewanella putrefaciens</i>
6 _{BUAP}	API 20NE	0 14? 457	99.5	<i>Pseudomonas putida</i>
36 _{BUAP}	API 20NE	0 142 4??	99.2	<i>Pseudomonas putida</i>
40 _{BUAP}	API 20NE	1 155 575	96.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

*. Estas colonias fueron encontradas en el crecimiento de la colonia principal de la que toma su nombre, en las pruebas de purificación.

?. La reacción de la colonia en algunas de las pruebas del sistema estandarizado es débil.

Las pruebas bioquímicas complementarias que se realizaron para ocho colonias (no tuvieron un resultado concluyente mediante API's) se muestran en la tabla III.4, así como

Biodegradación de compuestos azo en condiciones reductoras por bacterias aisladas de lixiviados, aguas residuales y lodos activados

la identificación propuesta. Los resultados obtenidos del crecimiento de éstas pruebas se pueden observar en la tabla A del anexo.

Tabla III.4. Identificación de las colonias mediante pruebas complementarias.

COLONIA	PRUEBA COMPLEMENTARIAS	IDENTIFICACIÓN
1MRGB _{BUAP}	Crecimiento en Esc, glucosa (acido), prueba de oxidasa, NO3(-)	<i>Sphingomonas sp.</i>
8RI _{BUAP}	Crecimiento en Mac Conkey y Twen 80 (1 ml/l), Morfología en agar nutritivo	<i>No identificable</i>
17MRC _{BUAP}	Lecitinasa, crecimiento a 42°C y reducción de nitratos a N	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
G _{BUAP}	Sembrar en sulfito de bismuto, Mac Conkey y Glicerol	<i>Citrobacter sp.</i>
X _{BUAP}	Sembrar en sulfito de bismuto,	<i>No identificable</i>
AÑ _{BUAP}	Oxidasa, Movilidad, reducción de nitratos, glucosa	<i>Enterobacteria</i>
AO _{BUAP}	Checar pureza	<i>No identificable</i>
7LvAg _{BUAP}	Checar pureza	<i>No identificable</i>

En la tabla III.5 se puede observar a cuales colonias se le aplicaron pruebas confirmatorias y cuales fueron éstas. Los resultados de cada una de las pruebas pueden verse en la tabla C del anexo.

Tabla III.5. Confirmación de la identificación de diversas colonias mediante pruebas bioquímicas.

COLONIA	PRUEBA CONFIRMATORIAS	IDENTIFICACIÓN
12NmAg _{BUAP}	Crecimiento en agar pseudomonas, en maltosa, a 4% y 6.5 % de NaCl, a 4°C, 35°C y 42°C y crecimiento con Lactato ferrico	<i>Shewanella putrefaciens</i>
15RCAg _{BUAP}	Crecimiento en agar pseudomonas, en maltosa, a 4% y 6.5 % de NaCl, a 4°C, 35°C y 42°C y crecimiento con Lactato ferrico	<i>Shewanella putrefaciens</i>
15(a)RCAg _{BUAP}	Crecimiento con Lactato ferrico	<i>Shewanella putrefaciens</i>
11NmLFr _{BUAP}	Crecimiento a 4°C	<i>Kluyvera spp</i>
5RGLDh _{BUAP}	Crecimiento en agar pseudomonas, en maltosa, a 4% y 6.5 % de NaCl, a 4°C, 35°C y 42°C y crecimiento con Lactato ferrico	<i>Shewanella putrefaciens</i>
5(a)RGLDh _{BUAP}	Crecimiento en agar pseudomonas, en maltosa, a 4% y 6.5 % de NaCl, a 4°C, 35°C y 42°C y crecimiento con Lactato ferrico	<i>Shewanella putrefaciens</i>
AN _{BUAP}	Crecimiento en agar pseudomonas, en maltosa, a 4% y 6.5 % de NaCl, a 4°C, 35°C y 42°C y crecimiento con Lactato ferrico	<i>Shewanella putrefaciens</i>
40 _{BUAP}	Crecimiento con inositol y en agar pseudomonas con glicerol	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

X_{BUAP} y $8Ri_{BUAP}$ no lograron ser identificadas mediante las pruebas bioquímicas, así como tampoco se les aplicó el análisis genotípico ya que fueron descartadas del estudio al revisar que tenían bajo potencial de degradación de colorantes.

3.3.2. Métodos genotípicos.

Las tres colonias a las que se hizo la identificación mediante métodos moleculares fueron AO_{BUAP} , $1MRG_{BUAP}$, $7LvAg_{BUAP}$.

El número de pares de base de las bacterias a identificar estuvo entre 457 y 791. El análisis de cada una de las secuencias obtenidas se llevó a cabo mediante la comparación de éstas con secuencias de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), así como cepas de referencia. Las ramas relacionadas con las bacterias aisladas fueron remarcadas en color azul.

La matriz de identidad de las secuencias fue obtenida con el programa BioEdit Sequence Alignment y se muestra en la tabla F del anexo.

Al llevar a cabo la identificación molecular de AO_{BUAP} , $1MRG_{BUAP}$, $7LvAg_{BUAP}$; podemos observar que mediante la amplificación del gen ribosomal 16S rDNA se detectaron 3 géneros diferentes *Stenotrophomonas*, *Citrobacter* y *Shewanella*.

AO_{BUAP} correspondió a *Citrobacter freundii*, $1MRG_{BUAP}$ a *Shewanella oneidensis* y $7LvAg_{BUAP}$ correspondió a *Stenotrophomonas acidaminiphila*, tal y como se puede ver en la Fig. 3.2.

La colonia $1MRGB_{BUAP}$ fue identificada como *Sphingomonas sp.* por pruebas complementarias, pero se hizo el análisis de 16s rDNA debido a que se tenía dudas sobre su identificación. Mediante éste se emparejó con *Shewanella oneidensis*, con valores de bootstrap de 948.

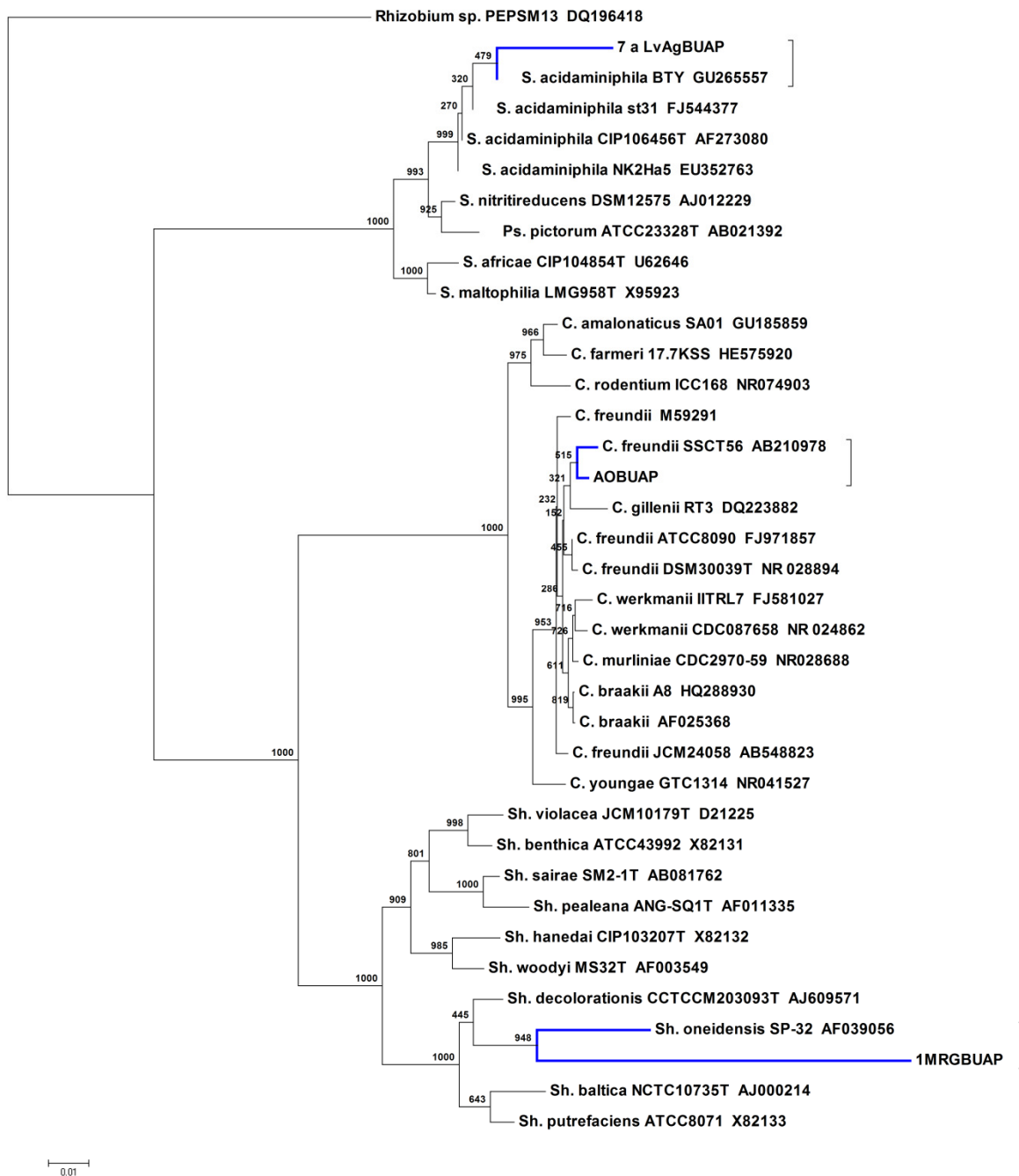


Fig. 3.2. Árbol filogenético Neighbor-joining generado a partir del alineamiento múltiple de la secuencia del gen 16S rDNA de 3 colonias aisladas y agrupadas en *Stenotrophomonas* (*S.*), *Citrobacter* (*C.*), *Shewanella* (*Sh.*) y otras cepas obtenidas de la base de datos del NCBI (el número de acceso aparece después de cada cepa). Los valores de bootstrap se muestran en cada nodo. La escala de la distancia filogenética se indica en la barra inferior.

Capítulo IV

Metodología 3^a etapa: **Biodegradación de colorantes industriales**

4.1 Identificación de parámetros para la degradación de colorantes azo

En esta etapa se sometió a las cepas seleccionadas a diferentes condiciones en busca de los apropiados parámetros de degradación para la remoción de los colorantes, así como identificar a las colonias más aptas para ser usadas en el tratamiento de agua residual artificial en un biorreactor de lecho fijo, es por esto que en el proceso de ésta etapa se fue descartando a las bacterias que demostraron ser menos prometedoras.

Los parámetros que se analizaron fueron la degradación con diferentes fuentes de carbono, en busca del mejor donador de electrones; bajo qué condiciones de respiración (aerobia y anaerobia) se lleva a cabo más rápido la degradación y los porcentajes de remoción más altos. Las bacterias seleccionadas se crecieron en diferentes concentraciones de antibióticos, metales, detergentes y sustancias que resultan como metabolitos de ciertos contaminantes con la finalidad de identificar su resistencia a estos compuestos y si resultaban aptas para ser propuestas en un sistema de tratamiento de aguas residuales de la industria textil. Además se analizó el crecimiento de los

Biodegradación de compuestos azo en condiciones reductoras por bacterias aisladas de lixiviados, aguas residuales y lodos activados

microorganismos en diferentes temperaturas, pH y concentraciones de NaCl, recordando que en las aguas residuales éstas condiciones varían dependiendo del tipo de descarga.

De la misma manera se estudió la cinética de degradación del Azul de Levafix CA (colorante ampliamente usado por la industria textil poblana) por parte de *5RGLDh_{BUAP}* y *AO_{BUAP}*, quienes mostraron porcentajes de remoción altos y pertenecen a dos géneros bacterianos distintos. Asimismo se hizo el análisis toxicológico de éste tratamiento.

Para hacer la propuesta de cultivos mixtos para un biorreactor de lecho fijo se desarrollaron pruebas de antagonismo.

4.1.1 Biodegradación con diferentes fuentes de carbono

Para hacer las pruebas de decoloración con diferentes fuentes de carbono se utilizó el medio nutritivo semigelificado cuya composición (g/l) es (5) peptona de carne, (2.5) extracto de levadura, (5) NaCl, (0.1) ZnSO₄, (0.1) colorante, (2.5) de agar, pH 6.8 - 7.0, en tubos de ensaye, utilizando por separado como fuente de carbono: metanol (5ml/l), etanol (25ml/l), acetato de sodio (2g/l) y sin fuente de carbono. Los colorantes usados fueron el Rojo Congo (grado reactivo) y el Azul de Levafix CA (grado industrial). Se dio seguimiento a la decoloración durante 5 días.

Debido a que estos experimentos se realizaron en un medio semigelificado no se hicieron mediciones espectrofotométricas, por lo que se dieron valores mediante una escala colorimétrica tomando como valor de 0% a aquellos tubos de ensaye que tenían el mismo color que antes de ser inoculados y de 100% a aquellos que se veían sin color.

4.1.2 Biodegradación con diferentes condiciones de respiración

Este ensayo solo se aplicó a aquellas bacterias que habían sido capaces de decolorar el medio con las diferentes fuentes de carbono principalmente con el colorante Rojo Congo debido a que se observó ser más difícil de biodegradar que el Azul de Levafix CA.

Para ello se montaron los experimentos en tubos de ensaye con rosca utilizando el medio nutritivo descrito en la etapa anterior, pero sin agar y 100 ppm del colorante a un pH 6.8-7, incubándose por 3 días a 30°C, bajo las siguientes condiciones de respiración:

- Aerobia con agitación a 200 rpm.
- Condiciones reductoras.



Fig. 4.1. Fotografías de los tubos de ensaye en condiciones de respiración a) aerobia y b) anaerobia del Rojo Congo y Azul de Levafix CA, a las 24 horas.

Para crear un ambiente de anaerobiosis (condiciones reductoras 5% aprox. de presión parcial de CO₂) se utilizó un frasco vitrolero con sellado hermético como jarra de anaerobiosis, en el interior de este recipiente se colocaron los tubos de ensaye previamente inoculados y a la par una pastilla de ácido acetilsalicílico efervescente a la cual se le adicionó agua destilada para iniciar la reacción que generó el CO₂. Se dejó incubar por 3 días para posteriormente centrifugar las muestras y hacer las mediciones espectrofotométricas correspondientes. Los colorantes industriales usados fueron Azul de Levafix CA, Rojo Intenso RGB, Marino Remazol C, Marino Remazol RGB y el Rojo Congo, descartando de este estudio a el Azul Marino GKTS y Naranja de Metilo debido a que mostraron ser compuestos más recalcitrantes que el resto.

El seguimiento de la decoloración se monitoreo con espectroscopía UV-VIS (Perkin Elmer Lambda 20 UV/VIS) y siguiendo la Ley de Beer Lambert (indica que la absorbancia es directamente proporcional a la absortividad y concentración del medio absorbente, así como la distancia que la luz recorre en éste). La curva de calibración de los colorantes pueden observarse en las gráficas 4.2 al 4.6, obteniéndose la relación absorbancia-concentración, así como los espectros de absorbancia y la longitud de onda máxima de cada uno de ellos. Los porcentajes de remoción de cada una de las colonias fueron calculados utilizando la siguiente formula (Chen, et al., 1999):

$$\%remoción = 100 - \frac{C \times 100}{C_0}$$

C = Concentración del colorante después del tiempo de incubación.

C_0 = Concentración inicial del colorante sin inocular

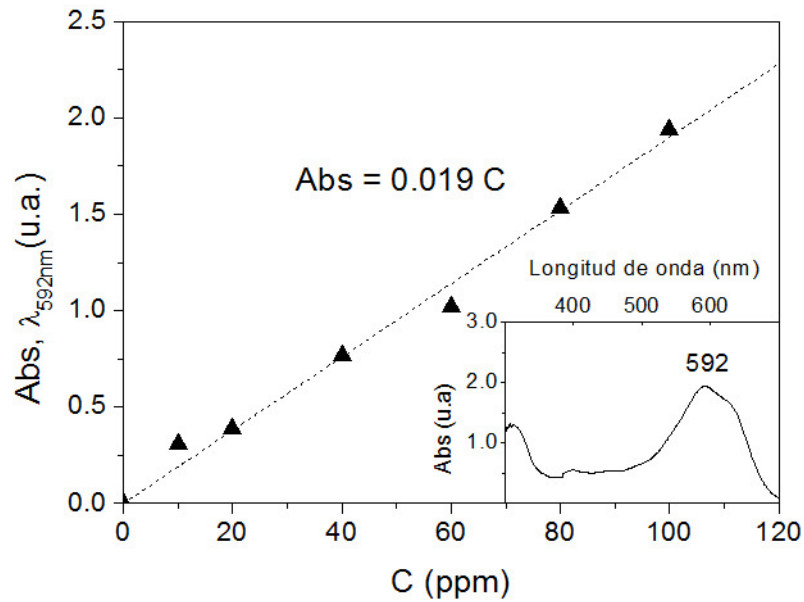


Fig. 4.2. Curva de calibración correspondiente al Azul de Levafix CA. Recuadro: espectro de absorbancia del mismo colorante industrial.

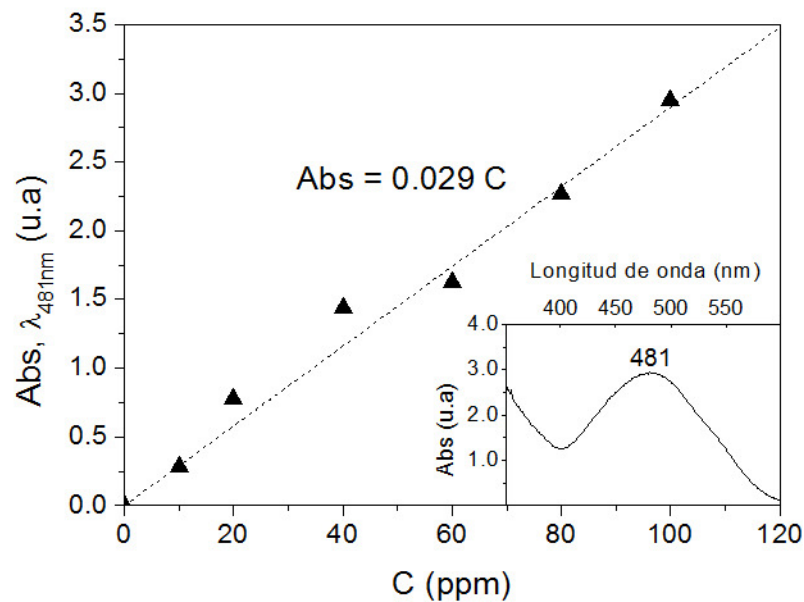


Fig. 4.3. Curva de calibración correspondiente al Rojo Congo. Recuadro: espectro de absorbancia del mismo colorante industrial.

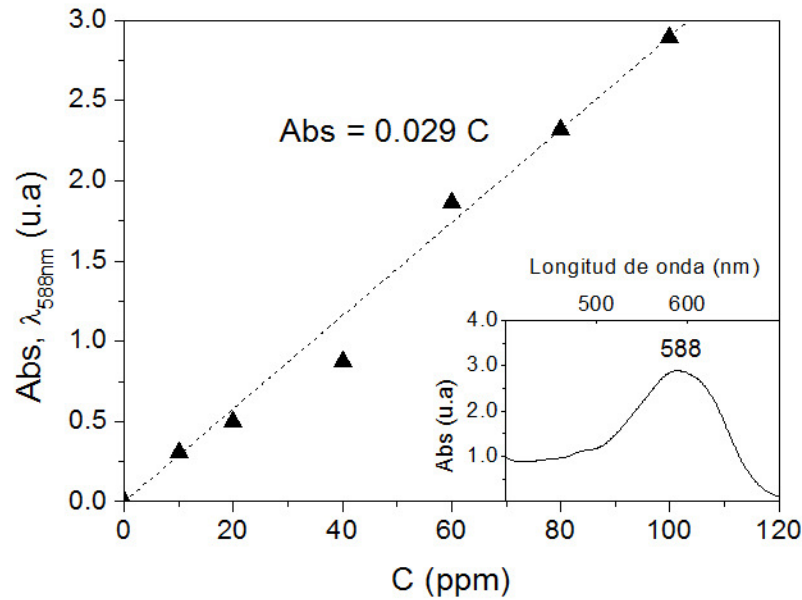


Fig. 4.4. Curva de calibración correspondiente al Marino Remazol RGB. Recuadro: espectro de absorbancia del mismo colorante industrial.

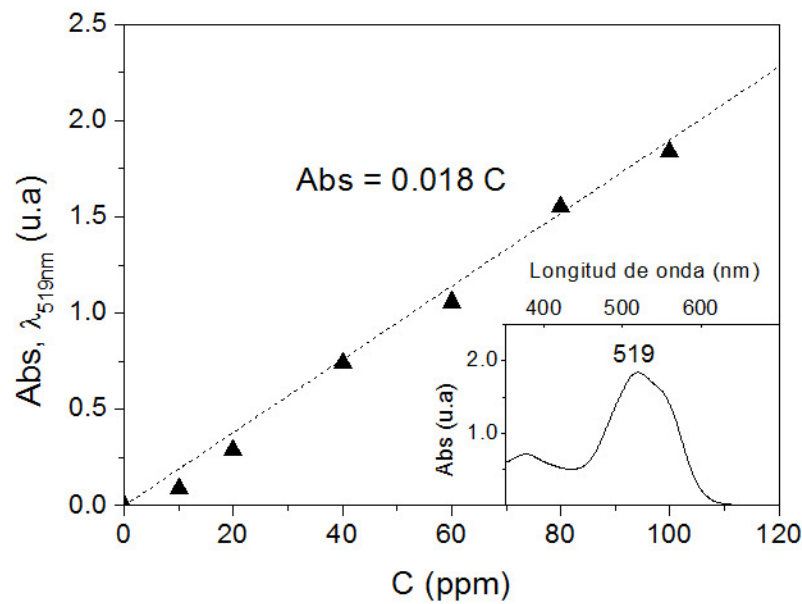


Fig. 4.5. Curva de calibración correspondiente al Rojo Intenso RGB. Recuadro: espectro de absorbancia del mismo colorante industrial.

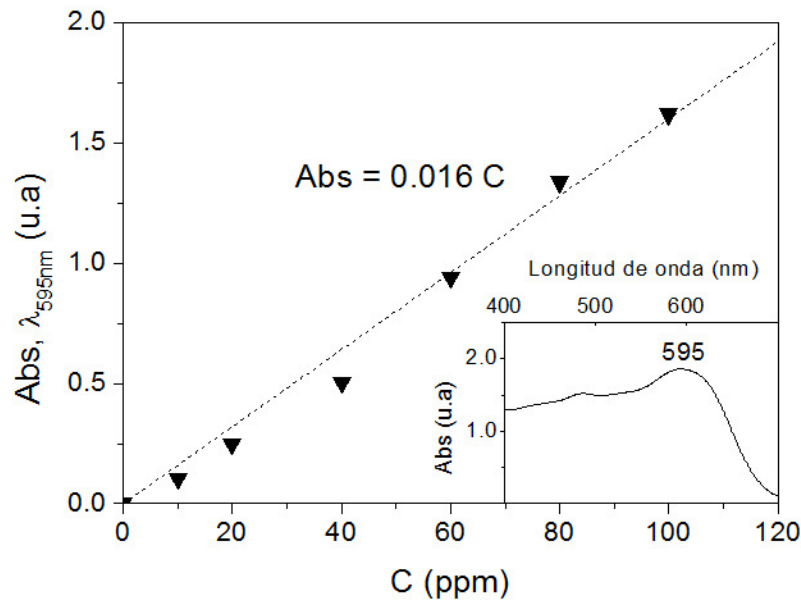


Fig. 4.6. Curva de calibración correspondiente al Marino Remazol C. Recuadro: espectro de absorbanza del mismo colorante industrial.

4.1.3 Crecimiento en diferentes pH, temperaturas y concentraciones de NaCl

En este ensayos se probaron 13 colonias bacterianas candidatas para ser inoculadas el biorreactor, por mostrar eficiencias altas de remoción de colorantes con diferentes fuentes de carbono y en ambas condiciones de respiración (aerobia y reductora).

En los experimentos se utilizó el agar nutritivo con la siguiente composición en (g/l) de (8) peptona de carne, (3) extracto de levadura; en tubos de ensaye con rosca, en condiciones aerobias, incubando por 48 horas. La variable estudiada fue:

- El pH en 8, 8.5, 9, 9.5 y 10.
- La temperatura de 37°C, 40°C y 45°C.
- La concentración de NaCl en 3%, 4%, 5%, 6% y 7%.

Para el caso del pH y la concentración de NaCl se incubó a una temperatura de 37°C. Mientras que para las pruebas con temperatura y NaCl se utilizó un pH de 6.8-7.0.

Biodegradación de compuestos azo en condiciones reductoras por bacterias aisladas de lixiviados, aguas residuales y lodos activados

4.1.4 Crecimiento con posibles sustancias xenobióticas (metales, antibióticos, detergentes y metabolitos de degradación de contaminantes).

Las pruebas de resistencia a metales, detergentes así como de metabolitos se llevaron a cabo en el medio TSA (Trypticase Soy Agar) preparándolo de acuerdo a las indicaciones del fabricante en placas de petri y sembrándose por punto.

Las concentraciones de los metales fueron Cu, Zn, Co, Ni, V, Pb y Mn al 100 y 200 ppm; Hg al 25 y 50 ppm; las triadas de (Cu, Zn, Co), (Cu, Ni, Co), (Cu, Ni, V), (Cu, Zn, V), (Cu, Zn, Ni) al 50 ppm. Los compuestos usados para la disponibilidad de los metales fueron: ZnSO₄, MnCl₂, HgCl₂, Pb, NiCl₃, CoSO₄, CuCl₂ y Na₃VO₄.

Para los detergentes se utilizó Tween 80 (polisorbato 80 N.F.) 4 ml/l, Tritón X-100 1ml/l, SDS (sodio dodecilsulfato) 3g/l y cetrimida 0.3 g/l. Los resultados del crecimiento se leyeron a las 48 horas.

Las sustancias que se probaron como posibles metabolitos o intermediario de compuestos xenobióticos fueron: *p*-nitrofenol a 30 ppm, catecol a 50 ppm, benzoato de sodio a 100 ppm, salicilato a 100 ppm, ac. sulfosalicílico a 100 ppm y 2,2'-dipiridilo a 100 ppm. La resistencia a antibióticos se determinó mediante el sistema estandarizado de Multidiscos gramnegativos marca Bio Rad, y que se fundamenta en colocar un disco impregnado con una cantidad determinada de antimicrobiano sobre un medio sólido inoculado con la bacteria a experimentar, el antimicrobiano se difundirá formándose un gradiente de concentración el cuál inhibe o permite el crecimiento de la bacteria. Las pruebas se hicieron siguiendo las instrucciones del fabricante (BioRad®).

En el análisis de la resistencia a 12 antibióticos se desarrolló con la finalidad de asegurar que las bacterias usadas en los tratamientos, no se trataran de microorganismos multiresistentes que fueran peligrosos trabajar con ellos y sobre todo proponerlas como una solución para la degradación de compuestos azo ya que podrían generar un problema ambiental mayor.

4.1.5 Pruebas de antagonismo.

Para la selección de bacterias productoras de sustancias inhibidoras del crecimiento se utilizó la técnica de doble capa, que consistió en preparar de acuerdo a las

Biodegradación de compuestos azo en condiciones reductoras por bacterias aisladas de lixiviados, aguas residuales y lodos activados

especificaciones del fabricante el medio Muller Hinton® en placa, sembrando por goteo 50 µl con las bacterias posible productoras de inhibidores (24 colonias) en un recuento de 1×10^8 , posteriormente fueron incubadas a 37°C por 24 horas. Después de la incubación las placas con los cultivos fueron sometidas a vapores de cloroformo por 30 minutos, con la ayuda de un portaobjetos estéril se retiró el crecimiento e inmediatamente después se agregó una segunda capa del mismo agar previamente inoculada con la bacteria indicadora de prueba (40_{BUAP}, 12NmAg_{BUAP}, 5RGLDh_{BUAP}, 5(a)RGLDh_{BUAP}, 15RCAG_{BUAP}, 15(a)RCAG_{BUAP}, 1MRGB_{BUAP}, 3RiLDh_{BUAP}) en una concentración de 1×10^8 , volviendo a incubar a 37°C por 24 horas. La presencia de un halo de inhibición del crecimiento definido alrededor de la colonia fue considerada actividad antibacteriana.

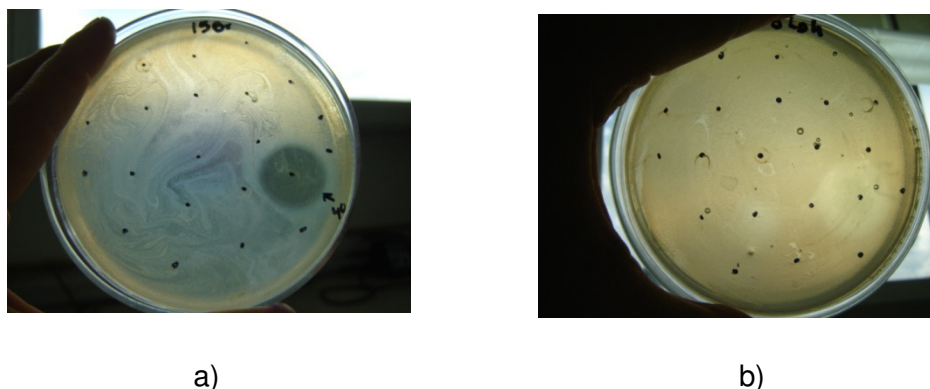


Fig. 4.7. Fotografías de las pruebas de antagonismo usando la técnica de doble capa, a las 48 horas de incubación, a) presencia de halo de inhibición y b) sin actividad antibacteriana.

4.1.6 Cinética de degradación de 5RGLDh_{BUAP} y AO_{BUAP}.

Con previo crecimiento de 24 horas de las bacterias en el medio agar Nutritivo, cuya composición (g/l) es (5) peptona de carne, (2.5) extracto de levadura, (5) NaCl, (0.1) ZnSO₄, (0.1); agua (1 l), pH 6.8 - 7.0; utilizando solución salina para diluir a 10^{-1} se inocularon tubos de ensaye con rosca del mismo medio pero adicionado con el colorante Azul de Levafix CA (100 ppm) e incubando a 37°C por 24 horas tanto en condiciones aerobias y reductoras utilizando una jarra de anaerobiosis. Estos ensayos se hicieron por triplicado.

Se calculó el valor promedio de la absorbancia cada hora, la cuantificación de remoción del colorante se realizó siguiendo la evolución de la banda de absorción durante 24 horas, con la longitud máxima de 592 nm empleando espectroscopía UV-VIS (Perkin

Biodegradación de compuestos azo en condiciones reductoras por bacterias aisladas de lixiviados, aguas residuales y lodos activados

Elmer Lambda 20 UV/VIS), aplicando la Ley de Beer Lambert y la formula de porcentaje de remoción detallada en el apartado 4.1.2.

4.1.7 Análisis toxicológico del tratamiento para la degradación del Azul de Levafix CA usando las colonias 5RGLDh_{BUAP} y AO_{BUAP}.

El medio y las condiciones de crecimiento (ambiente aerobia y anaerobia) utilizado para este ensayo fueron las mismas que para la cinética de degradación antes descrita. Este análisis fue realizado con el apoyo del grupo de trabajo del Dr. Ernesto Mangas Ramírez en el laboratorio de Limnología de la escuela de Biología del BUAP.

Este estudio toxicológico se denomina concentración letal media y se define como la cantidad de sustancia (toxicante) necesaria para matar al 50 % de una población de una especie determinada en un tiempo determinado. El tiempo de la prueba fue de 24 horas por lo que se definió como CL₅₀ (24h). La especie utilizada fue *Daphnia magna*, que es la especie recomendada por la Norma Oficial Mexicana NOM-CCA-001-ECOL.

Para establecer las concentraciones de prueba se realizaron dos bio-búsquedas (experimentos con amplios rangos de concentración para determinar aproximadamente donde se encontraba la concentración letal media y establecer las concentraciones definitivas). Las concentraciones finales utilizadas para las muestras aerobias (AO_{BUAP} aerobio y 5RGLDh_{BUAP} aerobio) se establecieron entre diluciones de 1.2 % y 20 % (es decir 1.2 partes de toxico por 98.8 partes de diluyente y 20 partes de tóxico por 80 partes del diluyente respectivamente). En las muestras anaerobias se probaron seis concentraciones entre 1 y 10 % debido a que estas muestras mostraron una mayor toxicidad por lo que se tuvo que adecuar el rango de las concentraciones de prueba para determinar la CL₅₀ (24h).

4.2 Diseño y funcionamiento de un biorreactor de lecho fijo para la biodegradación de colorantes azo.

Se diseñó un sistema de biorreactor de lecho fijo de acrílico con capacidad de 6.5 l, empacado con tezontle, de flujo descendente. El cuerpo del reactor es de 10 cm de diámetro, 3 mm de espesor y 80 cm de alto. Cuenta con dos tapas (12.7 cm de

diámetro), la inferior lleva fijada seis barras de acrílico para soportar el peso del material de empaque el cual se recarga en un plato de acrílico. El sistema utilizó una bomba IEA-42 para la recirculación, una bomba Elite 800 para la inyección de aire la cual se conectó a un difusor. Posee un termostato que regula la temperatura de 15 a 32 °C. La instalación de la tubería se hizo con manguera de grado alimenticio de poliuretano, rígido y flexible para la instalación del aire. La toma de muestra se encuentra en el fondo del reactor mediante una válvula. El escape de gases que se encuentra en la parte superior conectado a una manguera que va a dar a una campana de extracción. El costo total del reactor piloto fue de \$2,327.40 pesos M.N.

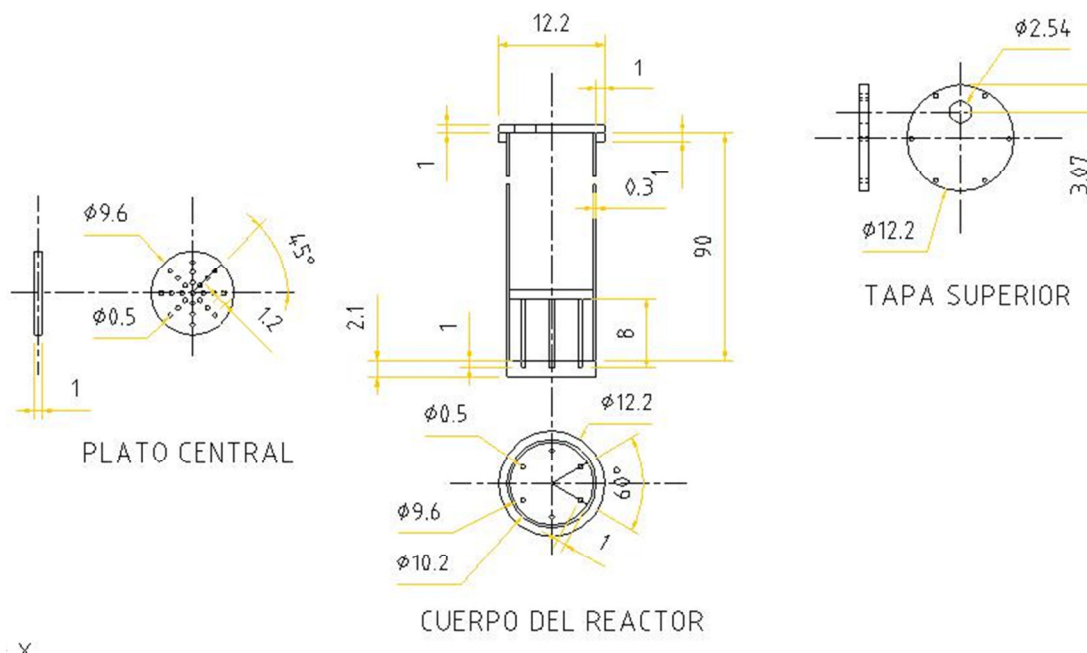


Fig. 4.8. Plano del biorreactor (medidas en cm).

4.2.1 Preparación del material de soporte

El material de soporte fue el tezontle, el cual previamente fue tamizado en una malla metálica FIIC, S.A. de C.V., No. 10 mm 17300, pulg. 00680, para tener un diámetro de 2 mm, fue lavado con agua de grifo, agua destilada y con peróxido de hidrógeno para la remoción de la materia orgánica presente y esterilizado a 180°C por 5 horas. El peso total del tezontle usado es de 5 kg y al vaciarlo en el reactor tuvo una altura de 50 cm para tener un volumen de agua a tratar de 2.5 l.

4.2.2 Inoculación del biorreactor.

La selección de las colonias para inocular el biorreactor se realizó después de dos experimentos y 5 repeticiones (en dos ambientes: aeróbico y reductor) utilizando matraces de 250 ml, con 75 ml de agua residual artificial conteniendo 100 ppm de Azul de Levafix CA con cultivos individuales y mixtos. Se escogieron las bacterias más aptas para la degradación: 12NmAg_{BUAP}, 15RCAg_{BUAP}, 15(a)RCAg_{BUAP}, 5RGLDh_{BUAP}, 5(a)RGLDh_{BUAP}. Estas 5 *Shewanella putrefaciens* se crecieron previamente en el medio nutritivo modificado (g/l), (5) peptona de carne, (2.5) extracto de levadura, (5) K₂HPO₄, (5) NaCl, (0.1) ZnSO₄, (2) Lactato de Fe, agua destilada (1 l), a un pH 6.8 - 7.0.

Para cada colonia se preparó 30 ml del medio antes descrito y se inoculó con un precultivo de 36 horas (se ajustó la densidad óptica del inoculo a 0.7 McFarland), se dejó crecer por 48 horas en matraz Erlenmeyer de 100 ml en condiciones aerobias. Al pasar el tiempo se inoculó al reactor con los 30 ml de cada colonia (en total 180 ml) y se aforo el volumen total del biorreactor a 2500 ml, se utilizó 2320 ml de agua destilada estéril al 0.85% de NaCl.

Se prosiguió a homogenizar el flujo y las concentraciones por 10 minutos a 28°C, con recirculación y aireación. Al cabo de ese tiempo se tomó una muestra para hacer el conteo de población por la técnica de NMP (número más probable) y se dejó de airear y de recircular para generar condiciones estacionarias por 5 días, con la finalidad de promover la formación del biofilms, al paso de los 5 días se hizo nuevamente un conteo de población.

4.2.3 Aclimatación del biofilms.

Esta etapa se realizó con el medio cuya composición (g/l) es (5) K₂HPO₄, (5) NaCl, (0.1) ZnSO₄, (2) de Lactato de Fe, (0.1) de Azul de Levafix CA, agua (1l) a un pH de 6.8-7.0. Se vació el reactor y se llenó nuevamente con el medio mencionado con un volumen de 2500 ml.

Se homogenizó el medio por 10 minutos sin aireación y se dejó en estado estacionario por 3 días y 2 días con aireación a 28°C. Al 4to día se le adicionaron 2g/l de Lactato de hierro.

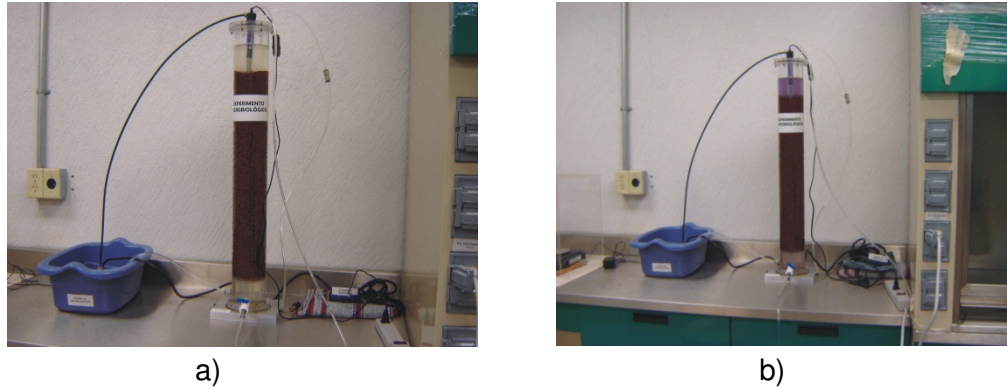


Fig. 4.9. Fotografías de la vista frontal del biorreactor de lecho fijo empacado con tezontle, a) después del periodo de incubación y b) después de 3 días de tratamiento con Azul de Levafix CA.

El seguimiento de la decoloración se hizo con un espectrofotómetro UV-VIS (Perkin Elmer Lambda 20 UV/VIS), además de monitorearse el pH, la temperatura y TDS (sólidos disueltos totales).

4.3 Resultados de la biodegradación de colorantes

La habilidad de algunas bacterias para degradar los colorantes azo puede depender de la estructura del propio colorante pero también de la temperatura, pH del tratamiento, la presencia de intermediarios, aceptor final de electrones, etc.

4.3.1. Diferentes fuentes de carbono.

A simple vista en los gráficos 4.10 y 4.11 se observa que un mayor número de bacterias fueron capaces de decolorar el Azul de Levafix CA que el Rojo Congo. Mientras que utilizando como fuente de carbono metanol en el Rojo Congo fueron capaces de decolorar igual o mayor al 50% solo 9 colonias, mientras que para el Azul de Levafix CA 15; con etanol en el Rojo Congo solo 9 colonias mientras que para el Azul de Levafix CA 13; con acetato de sodio 9 bacterias fueron capaz de decolorar el rojo y 13 el azul y sin fuente de carbono solo 8 colonias para el rojo y 15 para el azul.

En el caso de *Proteus vulgaris* (3RiLDh_{BUAP}) mostró una ligera preferencia por el etanol, seguida por metanol y al final del acetato de sodio para el Rojo Congo, mientras que para el Azul de Levafix CA los mejores resultados de decoloración se observaron con

Biodegradación de compuestos azo en condiciones reductoras por bacterias aisladas de lixiviados, aguas residuales y lodos activados

el metanol. Con el colorante azul tanto para *Morganella morganii* (3CAg_{BUAP}) como para *Escherichia coli* (14RCAg_{BUAP}) tuvieron mejores resultados de decoloración utilizando al colorante como fuente de carbono, seguida por acetato de sodio; en el caso de *Kluyvera sp* (11NmLFr_{BUAP}), *Citrobacter sp.* (G_{BUAP}) y *Escherichia coli* (8GKTSAg_{BUAP}) igualmente prefirieron el colorante como fuente de carbono pero seguido de metanol.

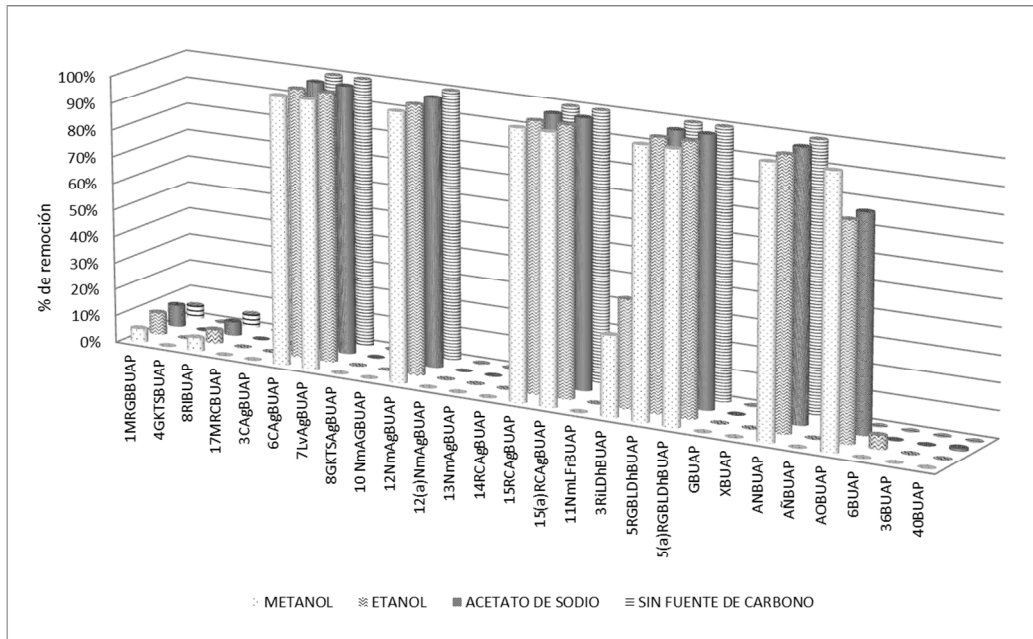


Fig. 4.10. Porcentajes de remoción del Rojo Congo (100 ppm) con diferentes fuentes de carbono después de 5 días de incubación.

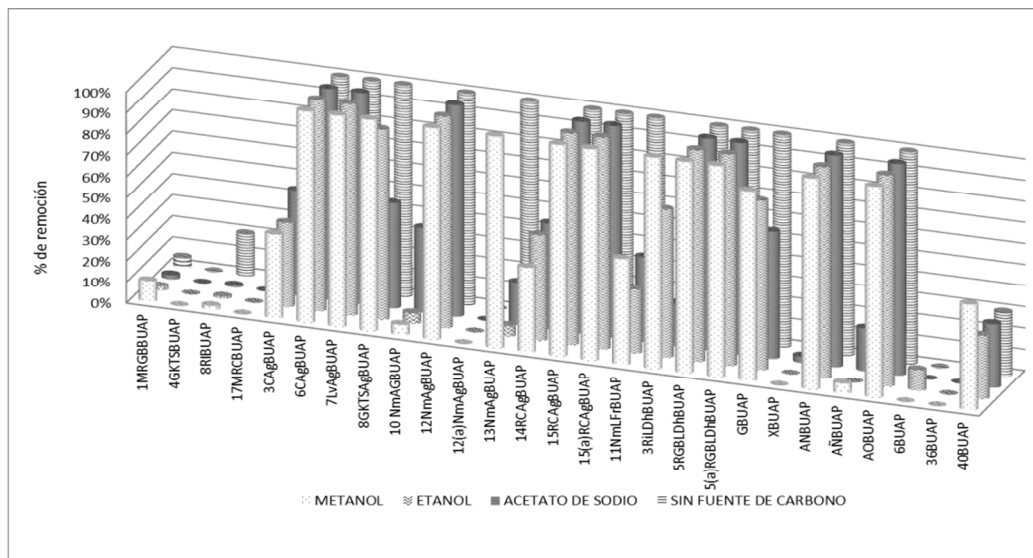


Fig. 4.11. Porcentajes de remoción del Azul de Levafix CA (100 ppm) con diferentes fuentes de carbono después de 5 días de incubación.

Biodegradación de compuestos azo en condiciones reductoras por bacterias aisladas de lixiviados, aguas residuales y lodos activados

Las colonias *Aeromonas hydrophila/caviae* (6CAg_{BUAP}), *Stenotrophomonas acidaminiphila* (7LvAg_{BUAP}, 12NmAg_{BUAP}), *Shewanella putrefaciens* (15RCAg_{BUAP}, 15(a)RCAg_{BUAP}, 5RGLDh_{BUAP}, 5(a)RGLDh_{BUAP}, AN_{BUAP}) y *Citrobacter freundii* (AO_{BUAP}) mostraron ser eficientes para decolorar tanto el Rojo Congo como el Azul de Levafix en un 100% con cualquiera de las fuentes de carbonos utilizadas para este ensayo, como se puede observar en las tablas D y E del Anexo.

4.3.2. Diferentes condiciones de respiración.

Para evaluar si las bacterias eran capaces degradar los colorantes azo en condiciones aerobias y de anaerobiosis se probaron solo en aquellas que habían presentado mayor eficiencia de decoloración con alguna de las fuentes de carbono utilizadas, por lo que de 27 colonias solo se utilizó para este ensayo 16, de las cuales 7 son del género *Shewanella*, 2 *Pseudomonas*, 4 pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, una *Aeromonas sp.*, una *Stenotrophomonas sp.* y un *Agrobacterium sp.*

Revisando los porcentajes de remoción (tabla IV.1) en condiciones aerobias se observó que con el colorante Rojo Congo todas las bacterias *Shewanella putrefaciens* tuvieron remociones mayores al 90% siendo las más adecuadas para la decoloración, mientras que para *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* y *Citrobacter sp.*, no se determinaron los porcentajes de remoción debido a que no mostraron crecimiento en el medio de cultivo utilizado. Para el Azul de Levafix CA el mayor porcentaje de remoción fue presentado por *Aeromonas hydrophila*, seguido de *Stenotrophomonas acidaminiphila* y en tercer lugar *Sh. putrefaciens*. Con Marino Remazol RGB, Rojo Intenso RGB y Marino Remazol C ésta misma cepa fue la que mostro los porcentajes de remoción más altos.

Para las condiciones anaerobias (tabla IV.2) utilizando el Rojo Congo 9 colonias muestran porcentajes de remoción mayores al 90%, al igual que para el Azul de Levafix CA. *Aeromonas hydrophila*, *Stenotrophomonas acidaminiphila*, *Citrobacter freundii* y *Shewanella putrefaciens* (12NmAg_{BUAP}, 15RCAg_{BUAP}, 15(a)RCAg_{BUAP}, 5RGLDh_{BUAP}) presentan porcentajes de remoción mayores al 90% en todos los colorantes probados. En el colorante Rojo Congo y Marino Remazol RGB *Citrobacter freundii* presenta el mayor porcentaje de remoción 97% y 95% respectivamente; para el Azul de Levafix CA y el Rojo Intenso RGB este lugar lo ocupa *Stenotrophomonas acidaminiphila* (97% y 95%), *Aeromonas hydrophila/caviae* también presenta un porcentaje de remoción del 95 con

Biodegradación de compuestos azo en condiciones reductoras por bacterias aisladas de lixiviados, aguas residuales y lodos activados

Rojo Intenso RGB y para el caso del Marino Remazol C *Shewanella putrefaciens* tiene el porcentaje más alto con un 97%.

Tabla IV.1. Porcentajes de remoción de cinco colorantes Azo por diferentes bacterias seleccionadas en condiciones aerobias.

COLONIA	IDENTIFICACIÓN	TRATAMIENTO AEROBIO				
		Rojo Congo	Azul de Levafix CA	Marino Remazol RGB	Rojo Intenso RGB	Marino Remazol C
		% remoción	% remoción	% remoción	% remoción	% remoción
1MRGB _{BUAP}	<i>Shewanella oneidensis</i>	76.8	63.4	35.8	43.2	58.3
6CAg _{BUAP}	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	91.7	98.0	89.6	90.4	90.3
7LvAg _{BUAP}	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>	70.2	97.2	96.6	97.6	91.5
12NmAg _{BUAP}	<i>Shewanella putrefaciens</i>	97.7	91.4	89.7	94.4	92.5
12(a)NmAg _{BUAP}	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	97.4	92.6	90.1	93.0	96.6
14RCAg _{BUAP}	<i>Escherichia coli</i>	no se determinó	56.5	52.7	44.4	67.4
15RCAg _{BUAP}	<i>Shewanella putrefaciens</i>	91.2	no se determinó	88.7	91.8	83.4
15(a)RCAg _{BUAP}	<i>Shewanella putrefaciens</i>	96.2	no se determinó	92.0	94.7	95.5
3RILDh _{BUAP}	<i>Proteus vulgaris</i>	no se determinó	66.6	66.2	45.5	72.3
5RGLDh _{BUAP}	<i>Shewanella putrefaciens</i>	96.2	no se determinó	96.7	94.2	96.3
5(a)RGLDh _{BUAP}	<i>Shewanella putrefaciens</i>	96.7	96.3	93.0	93.0	97.1
G _{BUAP}	<i>Citrobacter sp.</i>	no se determinó	57.7	87.3	44.3	68.7
AN _{BUAP}	<i>Shewanella putrefaciens</i>	96.6	94.6	94.1	92.8	92.0
AO _{BUAP}	<i>Citrobacter freundii</i>	45.8	no se determinó	56.7	50.3	69.7
36 _{BUAP}	<i>Pseudomonas putida</i>	49.3	no se determinó	22.3	45.2	43.7
40 _{BUAP}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38.3	no se determinó	31.2	47.7	48.8

Tabla IV.2. Porcentajes de remoción de cinco colorantes Azo por diferentes colonias seleccionadas en condiciones reductoras.

COLONIA	IDENTIFICACIÓN	TRATAMIENTO ANAEROBIO				
		Rojo Congo	Azul de Levafix CA	Marino Remazol RGB	Rojo Intenso RGB	Marino Remazol C
		% remoción	% remoción	% remoción	% remoción	% remoción
1MRGB _{BUAP}	<i>Shewanella oneidensis</i>	64.6	96.0	60.5	44.8	73.8
6CAg _{BUAP}	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	94.5	92.5	92.8	94.7	95.1
7LvAg _{BUAP}	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>	95.7	97.1	92.9	94.7	96.0
12NmAg _{BUAP}	<i>Shewanella putrefaciens</i>	94.4	94.5	91.4	93.9	96.1
12(a)NmAg _{BUAP}	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	94.4	93.7	89.2	94.1	96.3
14RCAg _{BUAP}	<i>Escherichia coli</i>	no se determinó	55.9	57.4	54.8	68.0
15RCAg _{BUAP}	<i>Shewanella putrefaciens</i>	92.0	91.3	91.9	93.7	94.0
15(a)RCAg _{BUAP}	<i>Shewanella putrefaciens</i>	93.1	92.9	92.4	94.1	96.6
3RILDh _{BUAP}	<i>Proteus vulgaris</i>	no se determinó	66.0	60.2	50.6	73.9
5RGLDh _{BUAP}	<i>Shewanella putrefaciens</i>	94.6	95.0	92.6	93.9	95.8
5(a)RGLDh _{BUAP}	<i>Shewanella putrefaciens</i>	93.0	80.7	26.3	42.0	93.3
G _{BUAP}	<i>Citrobacter sp.</i>	no se determinó	57.5	58.6	91.8	74.4
AN _{BUAP}	<i>Shewanella putrefaciens</i>	70.5	89.5	88.4	92.2	96.4
AO _{BUAP}	<i>Citrobacter freundii</i>	96.8	96.7	95.2	94.0	96.3
36 _{BUAP}	<i>Pseudomonas putida</i>	83.5	68.4	32.0	39.6	80.3
40 _{BUAP}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	no se determinó	72.1	61.9	63.3	86.7

Biodegradación de compuestos azo en condiciones reductoras por bacterias aisladas de lixiviados, aguas residuales y lodos activados

En condiciones aerobias solo 6 colonias tuvieron valores de remoción arriba del 90% con Marino Remazol RGB, 9 colonias con el Rojo Intenso RGB y 8 para el Marino Remazol C, mientras que en condiciones anaerobias 7 con Marino Remazol RGB, 10 con el Rojo Intenso RGB y 10 para el Marino Remazol C.

4.3.3. Crecimiento en diferentes pH, temperaturas y concentraciones de NaCl.

Se puede observar en tabla IV.3 que con un pH de 8 el 100% de las colonias probadas creció en el medio de cultivo, mientras que con un pH de 10 solo el 38% mostro crecimiento. Para el caso de la temperatura cuando esta se aumenta, incubando a las bacterias a 45°C solo una de 13 bacterias creció (*Shewanella oneidensis*), mientras que a 37°C el 100% de las bacterias mostro crecimiento en el medio de cultivo.

Cuando se analizó la concentración de NaCl la óptima para el crecimiento fue del 3%, y con una concentración del 7% solo crecieron 4 bacterias como se muestra en la tabla IV.3.

Tabla IV.3. Resultados del crecimiento microbiológico en diferentes condiciones.

COLONIA	IDENTIFICACIÓN	pH					TEMP (°C)			CONC. NaCl (%)				
		8	8.5	9	9.5	10	37	40	45	3	4	5	6	7
1MRGB _{BUAP}	<i>Shewanella oneidensis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6CA _{BUAP}	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+/-	-
7LVAg _{BUAP}	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+/-
12NmAg _{BUAP}	<i>Shewanella putrefaciens</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
12(a)NmAg _{BUAP}	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
15RCA _{BUAP}	<i>Shewanella putrefaciens</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
15(a)RCA _{BUAP}	<i>Shewanella putrefaciens</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
3RILD _{BUAP}	<i>Proteus vulgaris</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
5RGLD _{BUAP}	<i>Shewanella putrefaciens</i>	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+/-	+/-	-
5(a)RGLD _{BUAP}	<i>Shewanella putrefaciens</i>	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+/-	+/-	-
G _{BUAP}	<i>Citrobacter sp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
AN _{BUAP}	<i>Shewanella putrefaciens</i>	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
AO _{BUAP}	<i>Citrobacter freundii</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+

4.3.4. Crecimiento con posibles sustancias xenobióticas (metales, antibióticos, detergentes y metabolitos de degradación de contaminantes).

En los ensayos de crecimiento con diferentes metales y en diferentes concentraciones se obtuvo que todas las colonias probadas crecieron en Zn, Co, Ni, V y Pb tanto en 100 como en 200 ppm, como se puede observar en la tabla F del anexo. Para el Cu y Mn solo una bacteria no logró crecer en alguna de las concentraciones probadas, correspondiendo a *Citrobacter freundii* (AOB_{UAP}) para Cu y *Morganella morganii*

Biodegradación de compuestos azo en condiciones reductoras por bacterias aisladas de lixiviados, aguas residuales y lodos activados

(3CAg_{BUAP}) para Mn. En el caso del Hg se observó que fue quien inhibió más el crecimiento de las bacterias, en la concentración de 25 ppm no logro crecer 1MRGB_{BUAP} (*Shewanella oneidensis*), 4GKTS_{BUAP} (*Pseudomonas stutzeri*) y 36_{BUAP} (*Pseudomonas putida*); y en 50 ppm solo logro crecer 6 de 23 colonias probadas estas fueron 3CAg_{BUAP} (*Morganella morganii*), 6CAg_{BUAP} (*Aeromonas hydrophila*), 7LvAg_{BUAP} (*Stenotrophomonas acidaminiphila*), 12NmAg_{BUAP}, AN_{BUAP} (*Shewanella putrefaciens*), 12(a)NmAg_{BUAP} (*Agrobacterium radiobacter*).

Para el caso de las diferentes triadas de metales probadas (Cu, Zn, Co; Cu, Ni, Co; Cu, Ni, V; Cu, Zn, V; Cu, Zn, Ni) solamente *Citrobacter freundii* fue la que no mostró crecimiento en ninguno de los casos. En el caso de la combinación de Cu, Zn y V tampoco se observó crecimiento por parte de *Shewanella oneidensis*.

Con los diferentes sustancias jabonosas analizadas se identificó que con una concentración del 3% de Cetrimida es suficiente para inhibir el crecimiento, mientras que para SDS (sodio dodecilsulfato) al 3% de 13 colonias probadas solo logro crecer 3 de ellas siendo 1MRGB_{BUAP}, 15RCAG_{BUAP} (*Shewanella putrefaciens*) y G_{BUAP} (*Citrobacter sp.*). Con Tween 80 no hubo problema de crecimiento por parte de las colonias y para Tritón X-100 no logro crecer 12NmAg_{BUAP}, 12(a)NmAg_{BUAP} y AO_{BUAP}.

Tabla IV.4. Resultados del crecimiento en diversos detergentes.

COLONIA	Tween 80 (4ml/l)	Cetrimida (0.3%)	Tritón X100 (1ml/l)	SDS (0.3%)
	48 hrs			
1MRGB _{BUAP}	+	-	+	+
6CAg _{BUAP}	+	-	+	-
7LvAg _{BUAP}	+	-	+	+/-
12NmAg _{BUAP}	+	-	-	-
12(a)NmAg _{BUAP}	+	-	-	-
15RCAG _{BUAP}	+	-	+	+
15(a)RCAG _{BUAP}	+	-	+	-
3RiLDh _{BUAP}	+	-	+	-
5RGLDh _{BUAP}	+	-	+	-
5(a)RGLDh _{BUAP}	+	-	+	-
G _{BUAP}	+	-	+	+
AN _{BUAP}	+	-	+	-
AO _{BUAP}	+	-	-	-

De las sustancias que se probaron como posibles metabolitos como se puede observar en la tabla IV.5 para el caso del 2,2'-dipiridilo, resultado ser la más toxica tal y

Biodegradación de compuestos azo en condiciones reductoras por bacterias aisladas de lixiviados, aguas residuales y lodos activados

como ha sido reportado por varios autores al usarse en la síntesis de herbicidas como el Paracuat donde su toxicidad por vía oral es alta (Menéndez, 2009; Autor, 1977; González, et al. 2007). En el ensayo con 2,2'-dipiridilo solo lograron crecer 2 de 24 colonias, AO_{BUAP} (*Citrobacter freundii*) y 40_{BUAP} (*Pseudomonas aeruginosa*) y débilmente 13NmAg_{BUAP}, 14RCaG_{BUAP} (*Escherichia coli*) y G_{BUAP} (*Citrobacter sp.*). Con catecol a 50 ppm se inhibió el crecimiento solo de 4 de 24 bacterias probadas como se puede ver en la siguiente tabla IV.5 mientras que para el *p*-nitrofenol solo 3. Tanto para el benzoato de sodio, el salicilato y ac. Sulfosalicílico en 100 ppm solo inhibió el crecimiento de 8RI_{BUAP}.

Las colonias de *Shewanella putrefaciens* (12NmAg_{BUAP}, 15RCaG_{BUAP}, 15(a)RCaG_{BUAP}, 5RGLDh_{BUAP}, 5(a)RGLDh_{BUAP} y AN_{BUAP}) probadas en los ensayos de metabolitos revelaron que este género tiene una buena resistencia a estos compuestos, creciendo en 30 ppm de *p*-nitrofenol, 50 ppm de catecol, 100 ppm de benzoato de sodio, salicilato y ácido sulfosalicílico; pero ninguna de estas creció con 100 ppm de 2,2'-dipiridilo.

Tabla IV.5. Resultados del crecimiento con diversas sustancias.

COLONIA	CRECIMIENTO (24 HRS.) EN:					
	p-nitrofenol (30ppm)	Catecol (50ppm)	Benzoato (100ppm)	Salicilato (100ppm)	Sulfosalicilico (100ppm)	Dipiridilo (100ppm)
1MRGB _{BUAP}	+	+	+	+	+	-
4GKTS _{BUAP}	-	-	+	+/-	+	-
8RI _{BUAP}	-	-	-	-	-	-
17MRC _{BUAP}	+	-	+	+	+	-
3CA _{BUAP}	+	+	+	+	+	-
6CA _{BUAP}	+	-	+	+	+	-
7LvAg _{BUAP}	+	+	+	+	+	-
8GKTSaG _{BUAP}	+	+	+	+	+	-
10 NmAg _{BUAP}	+	+	+	+	+	-
12NmAg _{BUAP}	+	+	+	+	+	-
12(a)NmAg _{BUAP}	+	+	+	+/-	+	-
13NmAg _{BUAP}	+	+	+	+	+	+/-
14RCa _{BUAP}	+	+	+	+	+	+/-
15RCa _{BUAP}	+	+	+	+	+	-
15(a)RCa _{BUAP}	+	+	+	+	+	-
11NmLFr _{BUAP}	+	+	+	+	+	-
3RiLDh _{BUAP}	+	+	+	+	+	-
5RGLDh _{BUAP}	-	+	+	+	+	-
5(a)RGLDh _{BUAP}	+	+	+	+	+	-
G _{BUAP}	+	+	+	+	+	+/-
AN _{BUAP}	+	+	+	+	+	-
AO _{BUAP}	+	+	+	+	+	+
3O _{BUAP}	+	+	+	+	+	-
40 _{BUAP}	+	+	+	+	+	+

En el análisis de la resistencia a 12 antibióticos se encontró que *Aeromonas hydrophila* es resistente a cefalotina e intermedio a pefloxacina y carbenicilina. *Agrobacterium radiobacter* fue la única que fue sensible a los 12 antibióticos probados.

Para el caso de las colonias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae encontramos que todas fueron resistentes a la ampicilina. *Proteus vulgaris* (3RiLDh_{BUAP}), *Citrobacter sp.* (G_{BUAP}) y *C. freundii* (AO_{BUAP}) resultaron ser moderadamente sensible a cefotaxima, sensible a netilmicina e intermedio a pefloxacina, mientras que *E. coli* (14RCAG_{BUAP}) resulto ser resistente, intermedio y resistente respectivamente. Con cefalotina solo *C. freundii* resulto ser sensible. Para el caso de las dos *Citrobacter* resultaron ser moderadamente sensible a ceftriaxona y resistente a amikacina. *Proteus vulgaris* también resulto ser resistente a ceftriaxona, trimetoprim-sulfametoxazol, nitrofurantoína y carbenicilina. Para el caso de *E. coli* también resulto resistente a ceftriaxona, y carbenicilina. Con la gentamicina solo resulto resistente *Citrobacter sp.*; y con cloranfenicol ninguna resulto resistente solo intermedio para *Citrobacter sp* y *Proteus Vulgaris*.

De las 6 bacterias estudiadas del género *Shewanella* 5 de ellas mostraron resistencia a ampicilina, dos a trimetoprim-sulfametoxazol, una a gentamicina y una a cefalotina. 5RGLDh_{BUAP} y AN_{BUAP}, resultaron ser intermedio a cefalotina, trimetoprim-sulfametoxazol y pefloxacina. Para el resto de los antibióticos resultaron ser sensible o moderadamente sensibles según se muestra en la tabla G de los anexos.

4.3.5. Pruebas de antagonismo.

En las pruebas de antagonismo se encontró que *Pseudomonas aeruginosa* etiquetada como 40_{BUAP}, es antagonista para *Shewanella putrefaciens* (12NmAg_{BUAP}, 5RGLDh_{BUAP}, 5(a)RGLDh_{BUAP}, 15RCAG_{BUAP}, 15(a)RCAG_{BUAP}); *Escherichia coli* (14RCAG_{BUAP}); *Stenotrophomonas acidaminiphila* (7LvAg_{BUAP}); *Pseudomonas putida* (36_{BUAP}), y *Proteus vulgaris* (3RiLDh_{BUAP}). El resto de las cepas probados no mostro antagonismo.

4.3.6. Cinética de degradación de 5RGLDh_{BUAP} y AO_{BUAP}.

Tanto *Sh. putrefaciens* como *C. freundii* fueron incubadas en agar Nutritivo con Azul de Levafix CA en 100 ppm bajo condiciones aerobias como anaerobias y monitoreado su comportamiento por 24 horas. Para *Sh. putrefaciens* después de 8 horas de incubación,

más del 80% del color fue removido bajo condiciones aerobias mientras que en condiciones anaerobias sucede después de 10 horas. Como se puede ver en el gráfico 4.8 en condiciones anaerobia, a las 10 horas de incubación se tenía un porcentaje de remoción de 43% y a las 11 horas sube a un 87%. El máximo porcentaje de remoción se obtiene en condiciones aerobias con un 94% a las 19 horas; un máximo de 91% de remoción del colorante fue observado en condiciones anaerobias.

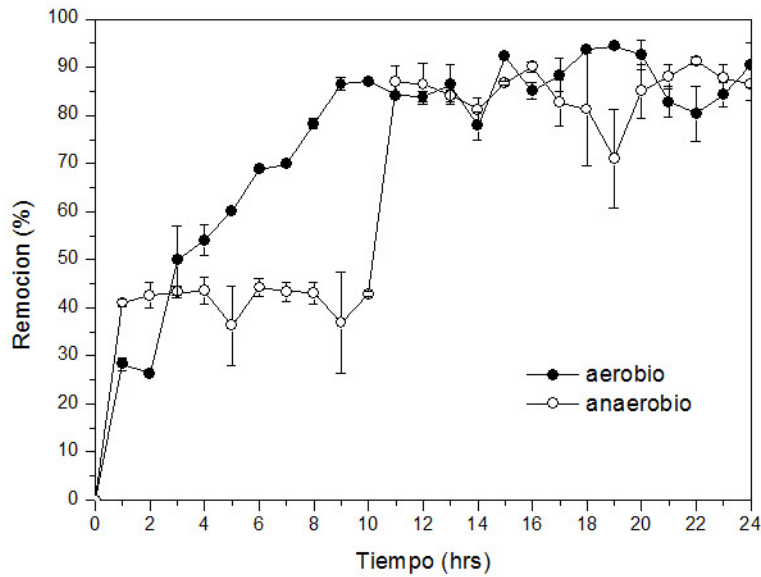


Fig. 4.12. Cinética de degradación de *Shewanella putrefaciens* (5RGLDh_{BUAP}) en condiciones aerobias y anaerobias, con barras de error.

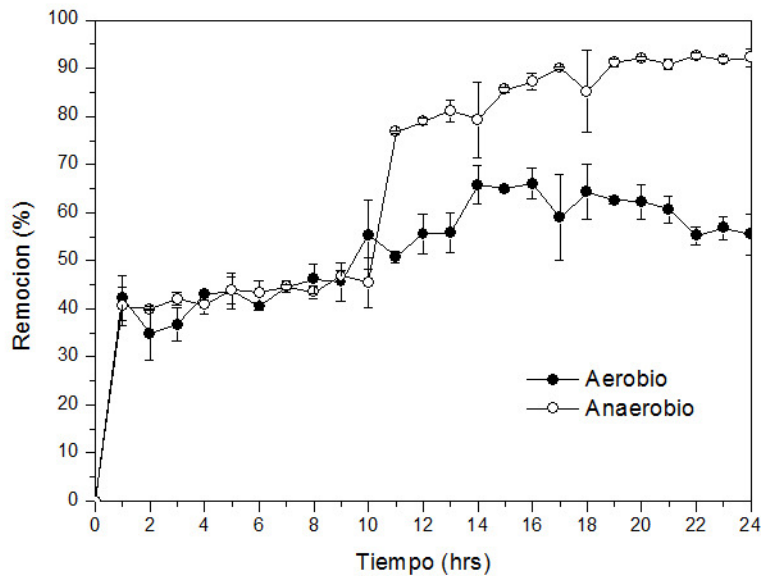


Fig. 4.13. Cinética de degradación de *Citrobacter freundii* (AO_{BUAP}) en condiciones aerobias y anaerobias, con barras de error.

Biodegradación de compuestos azo en condiciones reductoras por bacterias aisladas de lixiviados, aguas residuales y lodos activados

Para *C. freundii* el máximo porcentaje de remoción es de 66% y se obtiene a las 16 horas de incubación en condiciones aerobias, mientras que para las condiciones de anaerobiosis sucede a las 22 horas en un porcentaje de 93%. También para esta bacteria ocurre que en condiciones anaerobias se da un salto abrupto en los porcentajes de remoción del colorante al pasar de 45% a las 10 horas a 77% a las 11 horas.

4.3.7. Análisis toxicológico del tratamiento para la degradación del Azul de Levafix CA usando 5RGLDh_{BUAP} y AO_{BUAP}.

Los resultados del análisis toxicológico con *Daphnia magna* fueron:

Tabla IV.6. Resultados del análisis toxicológico.

COLONIA	TRATAMIENTO	TOXICO	ELUYENTE	ERROR ESTÁNDAR	GRUPO
AO _{BUAP}	aerobio	13.45	86.55	0.40	(a)
AO _{BUAP}	anaerobio	5.17	94.83	0.36	(b)
5RGLDh _{BUAP}	aerobio	7.52	92.48	0.42	(c)
5RGLDh _{BUAP}	anaerobio	4.69	95.31	0.40	(d)

Los resultados indican que las muestras anaerobias son más tóxicas dado que se requiere una menor cantidad del tóxico para provocar la muerte de la mitad de la población en 24 horas. Las diferencias son significativas (se indican con letra entre paréntesis, letras diferentes = diferencia entre grupos) de acuerdo a prueba de ANOVA con alfa menor a 0.05 y prueba de Tukey).

4.3.8. Biodegradación de colorantes azo en el biorreactor de lecho fijo.

Los resultados del conteo de población por la técnica de NMP al inocular el biorreactor fueron de 1.1×10^8 ufc/ml al inicio y 1.1×10^9 ufc/ml al cabo de los 5 días. Se puede ver que la población al paso de los 5 días aumentó 10 veces dándose las condiciones adecuadas para la replicación de las colonias. Durante este tiempo no se observó ningún sobrenadante, solo se volvía el medio más turbio o había salida de gas con olor fétido.

Posterior a la aclimatación del biofilms, pasando 24 horas de iniciada la operación del biorreactor se determinó el porcentaje de remoción del Azul de Levafix CA con los resultados del espectro UV-Vis a la longitud máxima de 592nm (grafico 4.14), estos fueron de un 87.10%, a las 24 horas, se determinó de un 91.12% a las 48 horas manteniéndose esta tasa por los siguientes tres días como se puede ver en el grafico 4.15.

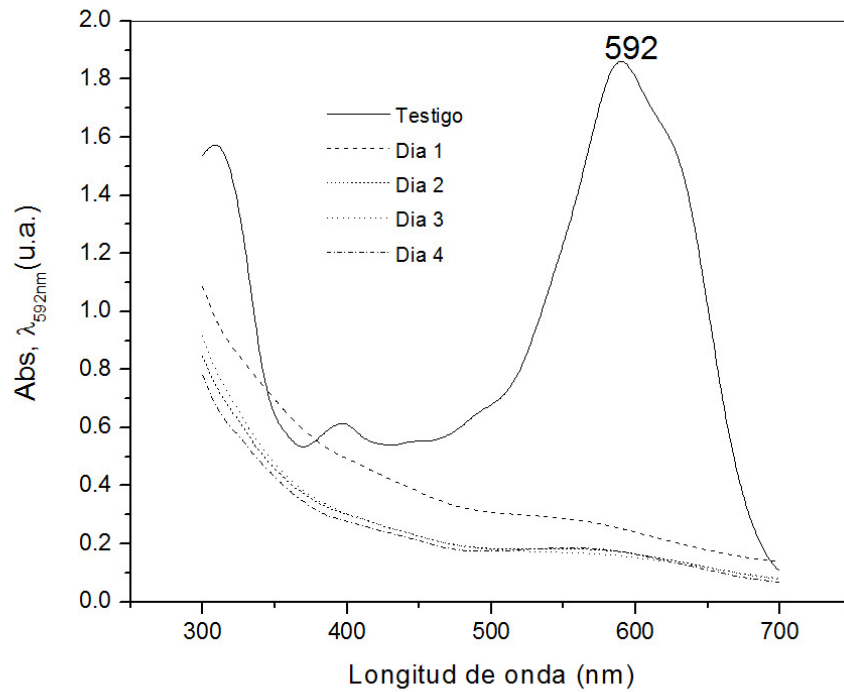


Fig. 4.14. Espectro UV-Vis, que refleja la decoloración a las 24 horas del Azul de Levafix CA.

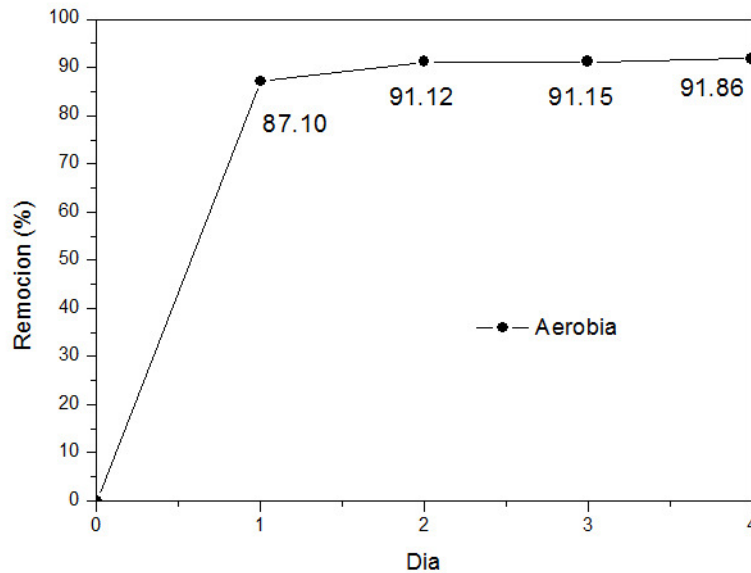


Fig. 4.15. Porcentajes de remoción del Azul de Levafix CA en 4 días en el biorreactor.

Los parámetros monitoreados fueron:

Tabla IV.7. Resultados de los parámetros monitoreados en el biorreactor.

Día	0	3	4	5
pH	6.85	6.77	6.7	7.1
TDS (g/l)	10.19	10.19	10.07	9.69
OD (mg/l)	6.6	2.1	1.9	4.2
Temp (°C)	26	27	26	27

Cabe hacer mención que durante el tratamiento la parte inferior del reactor se observaba con menor color que en la superficie, esto debido a las condiciones reductoras que se generaron en el fondo ya que no se inyectó aire algún día, dándose un gradiente de concentración del oxígeno.

Capítulo V

Discusión

Se conocen varias tecnologías para el tratamiento de aguas residuales con colorantes; mientras que los métodos fisicoquímicos resultan ser costosos, de una versatilidad limitada y baja eficiencia, los métodos biológicos son de bajo impacto para el ambiente, de bajo costo, alta eficiencia y con el potencial de mineralizar los contaminantes orgánicos a dióxido de carbono, agua e iones inorgánicos (Ali, 2010).

Varios autores han reportado la capacidad de degradación de colorantes por bacterias aisladas de lodos activados de una planta de tratamiento de la industria textil o de una planta de aguas residuales municipal, como es el caso de Xu, Guo y Sun (2007) que reportaron remociones superiores al 90% del colorante azo Rojo Ácido GR empleando *Shewanella decolorationis* S12, o el de Chang y Lin (2000) quienes trabajaron con *Pseudomonas luteola* que degradó al colorante Rojo Reactivo 22 mediante un reactor por lotes. Tales casos son comparables con los resultados obtenidos en los tratamientos preliminares de degradación, más en el presente estudio fue posible observar una decoloración de un 100% en 5 días de tratamiento para concentraciones de 100 ppm de colorante. Por lo que se puede confirmar el potencial de las bacterias aisladas de sistemas de tratamiento de aguas residuales para atacar compuestos sintéticos como los colorantes, o de sitios contaminados con éstos, como el caso del río Zahuapan; organismos que al someterse a ambientes estresantes, como los altamente contaminados, generan o revelan estrategias que les permite persistir.

Las Enterobacteriaceae aisladas mostraron capacidad de metabolizar los colorantes azo probados para este estudio se identificaron como *Morganella morganii*, *Escherichia coli*, *Kluyvera spp*, *Proteus vulgaris*, y *Citrobacter freundii*.

Es prudente mencionar que en ocasiones la identificación por el gen 16s DNA presenta una baja capacidad de discriminación para alguno géneros y especies como *Bacillus* (*B. cereus* y *B. thuringiensis*; *B. globisporus* y *B. psychrophilus*), en *Brucella*, *Achromobacter*, *Strenotrophomonas* y *Actinomyces*, en el complejo *Acinetobacter baumannii*-*A. calcoaceticus*, en las micobacterias de crecimiento rápido, y en la familia *Enterobacteriaceae* (especialmente en *Enterobacter* y *Pantoea*); por lo que para tener la certeza en el género y especie de la bacteria a identificar es necesario complementar con el análisis de otros genes como el gen *gyrB*, que permite la discriminación e identificación de especies fuertemente relacionadas pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Vibrio*, y también enterobacterias, micobacterias y bacterias ácido lácticas (Bou, et al. 2011).

Todas las *E. coli* aisladas provinieron del influente de la planta de tratamiento municipal “Alseseca Sur”. Varios investigadores han estudiado la degradación de colorantes por esta especie bajo condiciones aeróbicas, anaeróbicas y microaerófilas, (Isik y Sponza 2003). En el caso de las bacterias identificadas como *Kluyvera spp* y *Proteus vulgaris*, fueron aisladas del efluente del reactor anaerobio de la planta de tratamiento “Alseseca Sur”, y la *Morganella morganii* del influente de la planta de tratamiento municipal “Alseseca Sur”. Las dos colonias de *Citrobacter* se aislaron de los lixiviados del relleno sanitario de la ciudad de Puebla “Chiltepeque”. Estas bacterias se hallan frecuentemente en el tracto intestinal de animales y humanos, aunque muchas especies también se pueden encontrar en el agua, suelo y alimentos; es por ello que no es sorprendente su presencia en las fuentes muestreadas.

Varias especies de la familia de Enterobacteriaceae han sido reconocidas como agentes etiológicos de distintos procesos infecciosos, tales como infección urinaria, quirúrgica, de piel y tejido celular subcutáneo, bacteriemia y septicemia, meningitis y abscesos cerebrales (Manganello, et al., 2001). De algunas de ellas se tiene reportado que son resistentes a algunos antibióticos como la ampicilina, como se comprobó mediante las pruebas de resistencia a antibióticos que se realizaron. En este estudio *E. coli* y de *P. vulgaris* mostrando ser resistentes a 6 de 12 antibióticos estudiados por lo que

estos dos microorganismos están descartados para utilizarse en los tratamientos microbiológicos de aguas residuales coloreadas ya que representan un riesgo de salud debido a su multiresistencia. Por el contrario *Shewanella putrefaciens* mostro solo tener resistencia a 2 de los 12 antibióticos examinados siendo candidata para usarse en los tratamientos.

En estudios realizados por Wang, et al. (2009) determinaron que al incrementar la concentración de sulfacloropiridazina un antibiótico de la familia de las sulfonamidas, la tasa de decoloración del naranja II por parte de *S. decolorationis* decrece y además tiene efecto inhibitor en el crecimiento de la cepa.

De la familia de bacilos Gram-negativos Pseudomonadaceae, que generalmente se encuentran en el suelo y agua, se aislaron: *Pseudomonas stutzeri* y *P. aeruginosa* del efluente de descarga del sistema de tratamiento de la industria textil "Spintex S.A. de C.V.", *Pseudomonas putida* y una *P. aeruginosa* de la muestra del río Zahuapan. Las *pseudomonas* se han estudiado ampliamente en la degradación de agentes xenobióticos del ambiente.

Por otra parte se logró aislar *Aeromonas hydrophila/caviae*, *Agrobacterium radiobacter* y *Stenotrophomonas acidaminiphila* de la muestra del influente de la planta de tratamiento municipal "Alseseca Sur". *Aeromonas spp* tiene como hábitat ambientes acuáticos, incluyendo agua dulce, sea contaminada o clorada. En lo que respecta a *Agrobacterium radiobacter*, ésta habita en el suelo y plantas. *Stenotrophomonas spp.* está ampliamente distribuida en la naturaleza (agua, sedimentos y plantas), así como en ambientes artificiales como superficies de metal corroídas, agua de biofiltros, tanques de acuicultura, yacimientos de petróleo y agua residual de reactores anaerobios (Assih, et al. 2002).

Así mismo el género *Shewanella* (patógeno emergente) está ampliamente distribuido en la naturaleza, especialmente en ambientes acuáticos. Así, de las distintas muestras recolectadas en este estudio se lograron aislar varias colonias de este género. Mientras que cinco cepas de la especie *Shewanella putrefaciens* provienen de las muestras recolectadas de la planta de tratamiento "Alseseca Sur", una de los lixiviados del relleno sanitario "Chiltepeque". También se aisló *Shewanella oneidensis* de la muestra de la industria textil "Spintex S.A. de C.V."

La diversidad metabólica y capacidades fisiológicas de *Shewanellas* hacen que sean buenos organismos para la biorremediación (Hong y Gu, 2010). En este sentido, varias cepas han sido reportadas por usar una variedad amplia de compuestos en su metabolismo, incluyendo fumarato, nitrato, nitrito, sulfito, tiosulfato y colorantes textiles (Xu, et al. 2007). Además se ha demostrado que algunas especies de este género, como *Shewanella* J18 143 y *Shewanella decolorationis* S12, son eficientes en la decoloración de colorantes azo (Pearce, et al. 2006; Xu, et al. 2005) y pueden utilizar H₂, formato, lactato y piruvato como única fuente de donador de electrones para la reducción de colorantes azo en un medio definido. También se ha reportado que son capaces de formar biofilms bajo condiciones específicas (McLean, et al. 2008).

Debido a que otras cepas como *Citrobacter*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas* también pueden reducir compuestos azo con H₂ o algún ácido graso de cadena corta como donador de electrones, se sugiere que el acoplamiento de la oxidación de donadores de electrones para la reducción de compuestos azo puede ser un proceso bioquímico de naturaleza universal (Hong y Gu, 2010).

Por otra parte Cai, et al (2012) al investigar el proceso de decoloración del anaranjado de metilo (un colorante azo típico) encuentran que *Shewanella oneidensis* es capaz de utilizar diferentes fuentes orgánicas e inorgánicas como aceptor final de electrones. Al realizar el análisis químico de los subproductos producidos durante la decoloración encuentran un proceso reductor que produce el rompimiento del grupo Azo, posteriormente concluyen que una proteína tipo citocromo C es la responsable de dicha actividad.

En adición a estos hallazgos se sabe por el trabajo de Gao, et al. (2010) que *S. oneidensis* posee al menos 41 diferentes tipos de citocromos tipo C, lo que explica su diversidad de aceptores finales de electrones y su comportamiento versátil tanto en aerobiosis como en anaerobiosis.

Chen et al. (2010) encuentran 2 vías de transferencia de electrones involucradas en la azorreducción de los colorantes por la cepa *S. decolorationis* S12, una que involucra a citocromos C “maduros” que son mediadores de electrones esenciales para la azorreducción extracelular de células intactas, mientras que en la otra vía, que no involucra a este tipo de citocromos, la transferencia electrónica requiere de una oxidorreductasa dependiente de NADH y que actúa sobre colorantes azo sulfonados

ligeramente polares, dentro de las células o bien sobre los azo sulfonados que son muy polares en el ambiente extracelular.

En el desarrollo de tratamientos microbiológicos de aguas residuales de los efluentes textiles es importante poder identificar para el crecimiento de los cultivos el suministro de nutrientes, la fuente de carbono, la presencia de un cofactor enzimático, pH, concentración de sales y temperatura, ya que la composición de las aguas a tratar no sólo llevan consigo colorantes, sino una serie de sustancias utilizadas en los procesos industriales, como son ácidos, bases, sales, oxidantes, reductores, humectantes, espesantes, adhesivos, tensoactivos, ligantes, antisépticos, etc., y son generalmente de pH alcalino. Por lo tanto probando como fuentes de carbono metanol, etanol, acetato de sodio y el colorante para la biodegradación del Rojo Congo y Azul de Levafix CA, en el caso de *Shewanella putrefaciens*, *Citrobacter freundii*, *Aeromonas hydrophila/caviae* y *Stenotrophomonas acidaminiphila*, éstas mostraron ser eficientes degradando ambos colorantes, indistintamente de la fuente de carbono utilizada. Lo anterior podría deberse a que estas bacterias son capaces de usarlas como donadores de electrones para la reducción del colorante. Para la remoción del colorante Azul de Levafix la fuente de carbono que más bacterias utilizaron fue el metanol y el propio colorante con porcentajes de remoción por arriba del 50%, en el caso del Rojo Congo la preferencia fue por el metanol, etanol y acetato de sodio, en ese orden.

El colorante que más bacterias degradaron fue el Azul de Levafix CA, esto puede deberse a su estructura química, así como el tipo de co-sustrato empleado que influye directamente en la tasa del proceso de azorreducción.

Igualmente importante se han observado mediadores redox que facilitan el transporte de electrones como antraquinona-2-sulfonato y 2-hidroxi-1,4-naftoquinona, y que además pueden incrementar la habilidad de los lodos activados para reducir los colorantes azo (Rau, Knackmuss y Stolz, 2002). Aparte de estas quinonas el Fe (III) puede estimular la reducción del colorante azo, sugiriendo también que puede estar involucrado en el proceso de transferencia de electrones extracelular (Hong y Gu, 2010). De la misma forma varios productos resultado de la biodegradación del colorante pueden actuar como mediadores redox mejorando el proceso de azorreducción, algunas de las bacterias de los géneros aislados (*Pseudomonas*, *Shewanella* y *Sphingomonas*) son

Biodegradación de compuestos azo en condiciones reductoras por bacterias aisladas de lixiviados, aguas residuales y lodos activados

capaces de llevar a cabo procesos de azorreducción a través de mediadores redox que transportan electrones hacia los colorantes Azo. (Van der Zee, 2002, Tan, 2001).

Recientes investigaciones mencionan que la reducción azo de ciertas bacterias está relacionada con la cadena de transporte de electrones en la membrana celular y que este tipo de reacción bioquímica no es catalizado por una simple enzima sino por un complicado sistema de transporte de electrones en vivo (Van der Zee, 2002).

Por otro lado en los ensayos de pH, de concentración de NaCl y temperatura que se desarrollaron se observó que al ir aumentando el pH en el medio de crecimiento se reduce el número de bacterias que son capaces de crecer, este mismo comportamiento se observa para las otras dos variables estudiadas. Algunas de las *Shewanellas putrefaciens* probadas con pH alcalinos mostraron un crecimiento en 9.5, pero no lograron crecer a temperaturas mayores a 37°C, ni en concentraciones mayores al 4% de NaCl.

De la misma manera la mayoría de las colonias aisladas mostraron tolerar el Zn, Co, Ni, V, Pb, Cu y así como las triadas de Cu, Zn, Co; Cu, Ni, Co; Cu, Ni, V; Cu, Zn, V; Cu, Zn, Ni Mn en 100 y 200 ppm; mientras que el Hg en 50 ppm fue quien inhibió el crecimiento de la mayoría; estas manifestaciones posiblemente responde a que existe una relación con el lugar de donde fueron aislados estos microorganismos, ya que en los efluentes industriales se han reportado la presencia de metales pesados derivado de sus procesos.

La biodegradación de los colorantes azo Rojo Congo, Azul de Levafix CA, Marino Remazol RGB, Rojo Intenso RGB y Marino Remazol C tanto en condiciones de respiración aerobia como de anaerobiosis se llevó a cabo por *Shewanella putrefaciens*, presentando porcentajes de remoción altos lo que refleja su gran actividad azoreductasa. Otras de las bacterias que también tuvieron porcentajes de remoción altos en ambas condiciones fueron *Aeromonas hydrophila* y *Stenotrophomonas acidaminiphila*. Mientras que para *Citrobacter freundii* los mayores porcentajes de remoción se dieron en condiciones anaerobias.

Comparando la degradación del colorante Azul de Levafix CA en condiciones aerobias y anaerobias por parte de *Shewanella putrefaciens* resultó ser más rápida en condiciones aerobias logrando una remoción mayor al 80% en 9 horas mientras que en anaerobiosis se logró a las 11 horas. Es importante mencionar que en condiciones

reductoras (anaerobia) a las 10 horas se tenía un porcentaje de remoción del 43% y a las 11 horas paso a un 87%, mientras que para condiciones aerobias los porcentajes de remoción mantuvieron un aumento gradual, este mismo comportamiento se dio con *Citrobacter freundii*. Por otro lado el mayor porcentaje de remoción del colorante se dio bajo condiciones aerobias para *S. putrefaciens* mientras que para *C. freundii* fue en anaerobiosis. Por otra parte ambas bacterias mostraron porcentajes de remoción por arriba del 90% en condiciones anaerobias.

Hong y Gu (2010) concluyen que *Shewanella sp* posee un tipo de azorreducción disimilatoria, que es un proceso de respiración anaeróbica y que puede llamarse azorrespiración, este fenómeno expande el potencial de aceptores de electrones potenciales para la conservación de la energía bacteriana.

Basado en este concepto la azorreducción anaeróbica por *Shewanella sp* es un proceso bioquímico que acopla la oxidación de donadores de electrones. Esto le concedería una gran ventaja ecológica a las cepas de *Shewanella sp* puesto que al ser versátiles ya que pueden crecer tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas y al no ser patógenas para humanos u otros organismos, pueden utilizarse para trabajos de biorremediación, (Hong y Gu, 2010),

Asimismo resultó que los metabolitos producidos después de la degradación del colorante fueron más tóxicos en condiciones anaerobias que en aerobias, esto posiblemente por la presencia de las aminas aromáticas consecuencia de la ruptura del enlace azo, estos mismos resultados fueron encontrados por Isik y Sponza (2004) al monitorear la toxicidad de los metabolitos producidos por la degradación del colorante azo Negro Directo 38 mediante un reactor secuencial anaerobio-aerobio y que posterior al tratamiento aerobio esta toxicidad fue eliminada ya que las aminas aromáticas formadas fueron mineralizadas bajo estas condiciones. Debido a esta alta toxicidad que presentan los metabolitos resultados de la biodegradación anaerobia sería necesario acoplar un post-tratamiento en condiciones aerobias para poder utilizarse como una alternativa en el tratamiento de aguas residuales contaminadas con colorantes azo.

Los aislamientos identificados como *Shewanella putrefaciens* probaron tener una buena resistencia a posibles metabolitos de sustancias contaminantes, creciendo en 30 ppm de *p*-nitrofenol, 50 ppm de catecol, 100 ppm de benzoato de sodio, salicilato y ácido sulfosalicílico; pero su crecimiento se vio inhibido por 2,2'-dipiridilo en 100 ppm. Debido a

todas las cualidades observadas de esta bacteria se propuso para la incorporación dentro del biorreactor experimental.

El biorreactor en operación mantuvo una eficiencia óptima de remoción del colorante Azul de Levafix CA en un 91%, esto mismo sucedió cuando fue probada la biodegradación con cultivos puros de *Shewanella putrefaciens*. Así, en el material de soporte del biorreactor se formó el biofilms generando condiciones microaerofílicas que permitirían una degradación completa del colorante azo.

El tezontle usado como material de soporte en el biorreactor permitió un buen crecimiento de las bacterias como lo mostró el conteo bacteriano; la colonización y estratificación en el biofilms sobre el tezontle puede ser organizado por el gradiente de oxígeno, creciendo en la parte superior del biofilms colonias aerobias y al interior facultativas (Yañez, et al. 2009). También debido a la ausencia de aire durante los días de operación del reactor en el fondo pudo darse una disminución del oxígeno disuelto debido al consumo de las bacterias presentes y material orgánico incorporado, contribuyendo a una rápida reducción del colorante en el fondo, debido a que en condiciones de ausencia de oxígeno es más rápida la ruptura del grupo azo. Además que no se descarta que en el biofilms se hallan dado condiciones microaerofílicas que permitan que se dé una completa mineralización de los compuestos azo (McMullan, et al. 2001).

El Lactato de Fe adicionado al medio de crecimiento en el reactor se usó para tener las condiciones necesarias de aceptor de electrones para los microorganismos. Al mismo tiempo el medio de crecimiento nutritivo utilizado para los diversos tratamientos de colorantes permitió un buen crecimiento y azoreducción de los colorantes, así como lo demuestran las investigaciones de Chen, et al. (2002) donde encontraron una excelente correlación entre la velocidad de decoloración del rojo ácido 14 y la concentración del nutriente, a la par de que ayuda a la biodegradación de los colorantes recalcitrantes.

Conclusión

Se pudo comprobar en este trabajo de la amplia variedad de microorganismos que se pueden aislar de las aguas residuales municipales, lodos activados y lixiviados del relleno sanitario que tienen capacidades para ser utilizadas para la degradación de aguas residuales con colorantes, logrando desarrollar tratamientos microbiológicos de cultivos puros y utilizando un biorreactor de lecho fijo capaces de remover el 91% de compuestos azo presentes en agua residual artificial.

La degradación anaeróbica de colorantes sintéticos probó ser más efectiva que la realizada bajo condiciones aerobias sin embargo más tóxica. Para que se dé una completa mineralización de los contaminantes es necesario que se cuente con una fase aerobia secuencial, donde se mineralicen las aminas aromáticas formadas y disminuir la toxicidad de los metabolitos producidos.

Para el tratamiento microbiológico de las aguas de efluentes coloreados es necesaria una previa aclimatación para contar con las condiciones en donde los microorganismos tratantes puedan prosperar y llevar a cabo la función deseada. Es importante contar con un medio enriquecido y una fuente de carbono, el propio colorante puede actuar como fuente de carbono y aceptor de electrones en los tratamientos, dando porcentajes de remoción del color altos.

Los factores fisicoquímicos que pueden afectar el crecimiento y por ende la degradación de los compuestos azo son el pH alcalino, las temperaturas superiores a 45°C y la concentración de NaCl mayores al 7%.

El uso de *Shewanella putrefaciens* para el tratamiento de aguas residuales artificiales coloreadas empleando un biorreactor de lecho fijo empacado con tezontle resulta ser eficiente para la remoción de colorantes, además que esta cepa cuenta con una diversidad metabólica y capacidades fisiológicas que hacen que pueda tolerar la presencia de sustancias xenobioticas como los metabolitos de los colorantes.

Anexo

Tabla A. Resultados de pruebas complementarias para el perfil de los sistemas estandarizados API 20E y API 20NE.

COLONIA	CATALASA	OXIDASA	OXIDA	FERMENTA	MOVILIDAD	PRUEBA	PRUEBA CONCLUYENTE
			GLUCOSA	GLUCOSA			
1MRGB _{BUAP}	+	-	-	-	No	API 20NE	No
4GKTS _{BUAP}	+	-	+	-	No	API 20NE	Si
8RI _{BUAP}	+	-	-	-	No	API 20NE	No
17MRC _{BUAP}	+	+	+	-	No	API 20NE	No
3CAg _{BUAP}	+	-	+	+	Si	API 20E	SI
6CAg _{BUAP}	+	+	+	-	No	API 20NE	SI
7LvAg _{BUAP}	+	+	-	-	No	API 20NE	No
8GKTSAg _{BUAP}	+	-	+	+	Si	API 20E	SI
10 NmAg _{BUAP}	+	-	+	+	Si	API 20E	SI
12NmAg _{BUAP}	+	+	-	-	Si	API 20NE	SI
12(a)NmAg _{BUAP}	+	+	+	-	Si	API 20NE	SI
13NmAg _{BUAP}	+	-	+	+	Si	API 20E	SI
14RCAg _{BUAP}	+	-	+	+	Si	API 20E	SI
15RCAg _{BUAP}	-	+	-	-	No	API 20NE	SI
15(a)RCAg _{BUAP}		+				API 20NE	SI
11NmLFr _{BUAP}	-	-	+	+	No	API 20E	SI
3RiLDh _{BUAP}	+	-	+	+	Si	API 20E	SI
5RGLDh _{BUAP}	+	+	-	-	No	API 20NE	SI
5(a)RGLDh _{BUAP}	+	+	-	-	No	API 20NE	SI
G _{BUAP}	+	-	+	+	Si	API 20E	No
X _{BUAP}	+	-	+	+	No	API 20E	No
AN _{BUAP}	+	+	-	-	No	API 20NE	Si
AÑ _{BUAP}	+	-	+	+	No	API 20NE	No
AO _{BUAP}	-	-	+	+	No	API 20NE	No
6 _{BUAP}	+	+	+	-	No	API 20NE	SI
36 _{BUAP}	+	+	+	-	No	API 20NE	SI
40 _{BUAP}	+	+	+	-	No	API 20NE	SI

Tabla B. Resultados de pruebas complementarias que se realizaron a 7 colonias para su identificación.

1MRGB _{BUAP}		G _{BUAP}		AO _{BUAP}	
Crecimiento en glucosa	no oxida ni fermenta la glucosa, no móvil	Sembrar en sulfito de bismuto	circular/lisa/convexa/crema/café marrón/0.1cm	Crecimiento en TCBS	circular, lisa, convexa, brillante, pequeña, color amarillo
Reducción de NO ₃	sin cambios en O y F, no móvil	Crecimiento en Mac Conkey	irregular/ondulada/elevada/cremosa/púrpura, con swarming, Lac(+)	Crecimiento a pH 3.0	-
Crecimiento en TCBS	-	Crecimiento con glicerol	viro el medio a amarillo en O, viro el medio a amarillo en F, móvil	Crecimiento a pH 3.5	-
Crecimiento a pH 3.0	-	Crecimiento en TCBS	-	Crecimiento a pH 4.0	-
Crecimiento a pH 3.5	-	Crecimiento a pH 3.0	-	Crecimiento a pH 4.5	-
Crecimiento a pH 4.0	-	Crecimiento a pH 3.5	-	Crecimiento a pH 5.0	-
Crecimiento a pH 4.5	-	Crecimiento a pH 4.0	-	Crecimiento a pH 8.0	+
Crecimiento a pH 5.0	-	Crecimiento a pH 4.5	+	Crecimiento a pH 8.5	+
Crecimiento a pH 8.0	+	Crecimiento a pH 5.0	+	Crecimiento a pH 9.0	+
Crecimiento a pH 8.5	-	Crecimiento a pH 8.0	+	Crecimiento a pH 9.5	+
Crecimiento a pH 9.0	-	Crecimiento a pH 8.5	+	Crecimiento a pH 10	+
Crecimiento a pH 9.5	-	Crecimiento a pH 9.0	+	Tween 80	+
Crecimiento a pH 10	-	Crecimiento a pH 9.5	+	Cetrimida	-
Tween 80	+	Crecimiento a pH 10	+	Tritón X-100	+
Cetrimida	-	Tween 80	+	SDS	-
Tritón X-100	+	Cetrimida	+	Crecimiento NaCl al 1%	+
SDS	-	Tritón X-100	+	Crecimiento NaCl al 1.5%	+
Crecimiento NaCl al 1%	+	SDS	+	Crecimiento NaCl al 2%	+
Crecimiento NaCl al 1.5%	+	Crecimiento NaCl al 1%	+	Crecimiento NaCl al 3%	+
Crecimiento NaCl al 2%	+	Crecimiento NaCl al 1.5%	+	Crecimiento NaCl al 4%	+
Crecimiento NaCl al 3%	+	Crecimiento NaCl al 2%	+	Crecimiento en sacarosa al 3.5%	+
Crecimiento NaCl al 4%	+	Crecimiento NaCl al 3%	+	Crecimiento en sacarosa al 7%	+
Crecimiento en sacarosa al 3.5%	+	Crecimiento NaCl al 4%	+	Crecimiento en sacarosa al 10%	+
Crecimiento en sacarosa al 7%	+	Crecimiento en sacarosa al 3.5%	+		
Crecimiento en sacarosa al 10%	+	Crecimiento en sacarosa al 7%	+		
		Crecimiento en sacarosa al 10%	+		

Biodegradación de compuestos azo en condiciones reductoras por bacterias aisladas de lixiviados, aguas residuales y lodos activados

Continuación Tabla B.

17MRC _{BUAP}		8RI _{BUAP}		AÑ _{BUAP}		X _{BUAP}	
Crecimiento con lecitinas	circular, lisa, convexa	Crecimiento en Mac Conkey	Lac(-)	Crecimiento en glucosa	oxida y fermenta la glucosa, no móvil	Crecimiento en TCBS	-
Reducción de NO ₃	oxidativo: no viro el medio; fermentativo: viro el medio a amarillo	Tween 80	circular, lisa, translúcida, plana, blanca, muy pequeña	Reducción de NO ₃	oxidativo: viro el medio a amarillo, fermentativo: viro el medio a amarillo, no móvil		
Crecimiento a 42°C	+	Crecimiento en TCBS	-	Crecimiento en TCBS	-		
Crecimiento en TCBS	-						

Tabla C. Resultados de pruebas confirmatorias que se realizaron a 8 colonias para su completa identificación.

Colonia	Agar Pseudomonas	Crecimiento en Maltosa	Crecimiento al 4% NaCl	Crecimiento al 6.5% NaCl	Crecimiento a 4°C	Crecimiento a 35°C	Crecimiento a 42°C	Crecimiento con Inositol	Crecimiento con Lactato-Ferrico	Crecimiento con pseudomona + glicerol
12NmAg _{BUAP}	rosa/irregular/lisa/plana/translúcida	oxida y fermenta la maltosa	-	-	-	+	-	no se probó la cepa	irregular/lisa/plana/rugosa/translúcida	no se probó la cepa
15RCAG _{BUAP}	rosa/circular/lisa/convexa/brillante/rosa	crecio en O sin viro y viro el medio a amarillo en F	-	-	-	+	-	no se probó la cepa	circular/lisa/convexa/brillante/blanca	no se probó la cepa
15(a)RCAg _{BUAP}	no se probó la cepa	no se probó la cepa	no se probó la cepa	no se probó la cepa	no se probó la cepa	no se probó la cepa	no se probó la cepa	no se probó la cepa	+/-	no se probó la cepa
11NmLFr _{BUAP}	no se probó la cepa	no se probó la cepa	no se probó la cepa	no se probó la cepa	no se probó la cepa	no se probó la cepa	no se probó la cepa	no se probó la cepa	no se probó la cepa	no se probó la cepa
5RGLDh _{BUAP}	rosa/circular/lisa/convexa/translúcida/rosa	crecio en O sin viro y viro el medio a azul en F	+	-	-	+	-	no se probó la cepa	irregular/lisa/plana/mate/blanca	no se probó la cepa
5(a)RGLDh _{BUAP}	+/-	crecio en O sin viro y viro el medio a azul en F	+	-	-	+	-	no se probó la cepa	circular/lisa/plana/mate/blanca	no se probó la cepa
AN _{BUAP}	-	viro a amarillo en la parte superior del tubo O y viro el medio a azul en F	-	-	-	+	-	no se probó la cepa	circular/lisa/plana/mate/blanca	no se probó la cepa
40 _{BUAP}	no se probó la cepa	no se probó la cepa	no se probó la cepa	no se probó la cepa	no se probó la cepa	no se probó la cepa	no se probó la cepa	irregular/liso/plana/translúcida/rugosa	no se probó la cepa	irregular/plana/rugosa/translúcida, viro el color del medio de blanco a azul

Biodegradación de compuestos azo en condiciones reductoras por bacterias aisladas de lixiviados, aguas residuales y lodos activados

Tabla D. Porcentajes aproximados de remoción del Rojo Congo (100ppm) con diferentes fuentes de carbono, 5 días de incubación.

COLONIA	METANOL	ETANOL	ACETATO DE SODIO	SIN FUENTE DE CARBONO
1MRGB _{BUAP}	5%	8%	8%	5%
4GKTS _{BUAP}	0%	0%	0%	0%
8RI _{BUAP}	5%	5%	5%	5%
17MRC _{BUAP}	0%	0%	0%	0%
3CAg _{BUAP}	0%	0%	0%	0%
6CAg _{BUAP}	100%	100%	100%	100%
7LvAg _{BUAP}	100%	100%	100%	100%
8GKTSAg _{BUAP}	0%	0%	0%	0%
10 NmAg _{BUAP}	0%	0%	0%	0%
12NmAg _{BUAP}	100%	100%	100%	100%
12(a)NmAg _{BUAP}	-	-	-	-
13NmAg _{BUAP}	0%	0%	0%	0%
14RCAg _{BUAP}	0%	0%	0%	0%
15RCAg _{BUAP}	100%	100%	100%	100%
15(a)RCAg _{BUAP}	100%	100%	100%	100%
11NmLFr _{BUAP}	0%	0%	0%	0%
3RiLDh _{BUAP}	30%	40%	20%	20%
5RGLDh _{BUAP}	100%	100%	100%	100%
5(a)RGLDh _{BUAP}	100%	100%	100%	100%
G _{BUAP}	0%	0%	0%	0%
X _{BUAP}	0%	0%	0%	0%
AN _{BUAP}	100%	100%	100%	100%
AÑ _{BUAP}	0%	0%	0%	0%
AO _{BUAP}	100%	80%	80%	-
6 _{BUAP}	0%	5%	0%	0%
36 _{BUAP}	0%	0%	0%	0%
40 _{BUAP}	0%	0%	1%	0%

Biodegradación de compuestos azo en condiciones reductoras por bacterias aisladas de lixiviados, aguas residuales y lodos activados

Tabla E. Porcentajes aproximados de remoción del Azul de Levafix CA (100ppm) con diferentes fuentes de carbono, 5 días de incubación.

COLONIA	METANOL	ETANOL	ACETATO DE SODIO	SIN FUENTE DE CARBONO
1MRGB _{BUAP}	10%	2%	2%	5%
4GKTS _{BUAP}	0%	0%	0%	0%
8RI _{BUAP}	2%	1%	1%	20%
17MRC _{BUAP}	0%	0%	0%	0%
3CAg _{BUAP}	40%	40%	50%	80%
6CAg _{BUAP}	100%	100%	100%	100%
7LvAg _{BUAP}	100%	100%	100%	100%
8GKTSAg _{BUAP}	100%	90%	50%	100%
10 NmAg _{BUAP}	5%	5%	40%	25%
12NmAg _{BUAP}	100%	100%	100%	100%
12(a)NmAg _{BUAP}	-	-	-	-
13NmAg _{BUAP}	100%	5%	20%	100%
14RCAg _{BUAP}	40%	50%	50%	80%
15RCAg _{BUAP}	100%	100%	100%	100%
15(a)RCAg _{BUAP}	100%	100%	100%	100%
11NmLFr _{BUAP}	50%	30%	40%	100%
3RiLDh _{BUAP}	100%	70%	20%	30%
5RGLDh _{BUAP}	100%	100%	100%	100%
5(a)RGLDh _{BUAP}	100%	100%	100%	100%
G _{BUAP}	90%	80%	60%	100%
X _{BUAP}	0%	0%	3%	20%
AN _{BUAP}	100%	100%	100%	100%
AÑ _{BUAP}	5%	0%	20%	20%
AO _{BUAP}	100%	100%	100%	100%
6 _{BUAP}	0%	10%	0%	0%
36 _{BUAP}	0%	0%	0%	0%
40 _{BUAP}	50%	30%	30%	30%

Biodegradación de compuestos azo en condiciones reductoras por bacterias aisladas de lixiviados, aguas residuales y lodos activados

Tabla F. Matriz de identidad de la secuencias del gen 16S rDNA de 3 aislamientos y otras cepas obtenidas de la base de datos del NCBI, obtenida por el programa BioEdit Sequence Alignment.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	AB	AC	AD	AE	AF	AG	AH	AI	AJ	AK
A	ID	0.937	0.962	0.958	0.914	0.510	0.960	0.931	0.958	0.960	0.501	0.948	0.956	0.954	0.958	0.956	0.305	0.796	0.810	0.796	0.760	0.791	0.783	0.773	0.801	0.734	0.869	0.835	0.834	0.855	0.829	0.841	0.843	0.857	0.828	0.822	0.219
B	0.94	ID	0.907	0.920	0.958	0.500	0.928	0.906	0.903	0.905	0.513	0.919	0.919	0.901	0.903	0.909	0.306	0.775	0.765	0.798	0.794	0.762	0.755	0.782	0.773	0.718	0.825	0.855	0.858	0.825	0.851	0.850	0.860	0.810	0.849	0.818	0.215
C	0.96	0.907	ID	0.937	0.894	0.498	0.939	0.914	0.953	0.955	0.491	0.942	0.946	0.959	0.958	0.950	0.299	0.781	0.794	0.810	0.746	0.803	0.791	0.761	0.799	0.747	0.852	0.815	0.815	0.835	0.814	0.822	0.826	0.861	0.808	0.802	0.213
D	0.96	0.920	0.937	ID	0.936	0.523	0.958	0.942	0.963	0.967	0.519	0.967	0.977	0.966	0.968	0.967	0.308	0.799	0.810	0.794	0.762	0.790	0.782	0.781	0.803	0.723	0.872	0.836	0.840	0.864	0.838	0.845	0.849	0.853	0.833	0.827	0.220
E	0.91	0.958	0.894	0.936	ID	0.512	0.933	0.918	0.916	0.920	0.526	0.937	0.936	0.919	0.921	0.921	0.312	0.780	0.770	0.755	0.794	0.768	0.762	0.789	0.779	0.711	0.830	0.851	0.865	0.832	0.856	0.850	0.863	0.811	0.849	0.822	0.220
F	0.51	0.500	0.498	0.523	0.512	ID	0.528	0.518	0.516	0.517	0.948	0.512	0.517	0.517	0.518	0.513	0.580	0.421	0.419	0.410	0.422	0.408	0.400	0.414	0.416	0.363	0.459	0.466	0.450	0.460	0.464	0.473	0.445	0.441	0.460	0.435	0.413
G	0.96	0.928	0.939	0.958	0.933	0.528	ID	0.949	0.950	0.952	0.520	0.949	0.950	0.951	0.954	0.945	0.314	0.805	0.805	0.789	0.772	0.781	0.773	0.784	0.791	0.720	0.858	0.838	0.840	0.853	0.837	0.846	0.852	0.845	0.839	0.827	0.222
H	0.93	0.906	0.914	0.942	0.918	0.518	0.949	ID	0.932	0.936	0.508	0.930	0.933	0.931	0.934	0.928	0.304	0.776	0.773	0.759	0.749	0.755	0.749	0.768	0.768	0.692	0.837	0.827	0.829	0.836	0.825	0.832	0.839	0.818	0.824	0.805	0.217
I	0.96	0.903	0.953	0.963	0.916	0.516	0.950	0.932	ID	0.993	0.507	0.966	0.971	0.987	0.990	0.984	0.302	0.783	0.797	0.798	0.746	0.793	0.785	0.762	0.797	0.732	0.857	0.819	0.826	0.848	0.818	0.826	0.832	0.857	0.816	0.810	0.216
J	0.96	0.905	0.955	0.967	0.920	0.517	0.952	0.936	0.993	ID	0.507	0.969	0.975	0.992	0.995	0.986	0.302	0.785	0.798	0.800	0.748	0.797	0.787	0.765	0.799	0.734	0.858	0.822	0.825	0.848	0.822	0.829	0.836	0.861	0.819	0.811	0.217
K	0.5	0.513	0.491	0.519	0.526	0.948	0.520	0.508	0.507	0.507	ID	0.521	0.518	0.509	0.510	0.507	0.586	0.424	0.419	0.410	0.438	0.418	0.414	0.429	0.426	0.375	0.457	0.478	0.464	0.461	0.476	0.477	0.460	0.438	0.471	0.447	0.418
L	0.95	0.919	0.942	0.967	0.937	0.512	0.949	0.930	0.966	0.969	0.521	ID	0.983	0.969	0.971	0.969	0.310	0.794	0.801	0.793	0.767	0.808	0.800	0.786	0.821	0.743	0.862	0.840	0.844	0.856	0.842	0.839	0.856	0.853	0.838	0.832	0.221
M	0.96	0.919	0.946	0.977	0.936	0.517	0.950	0.933	0.971	0.975	0.518	0.983	ID	0.974	0.976	0.977	0.308	0.797	0.803	0.796	0.762	0.803	0.794	0.781	0.815	0.738	0.864	0.835	0.839	0.859	0.838	0.843	0.849	0.857	0.832	0.825	0.220
N	0.95	0.901	0.959	0.966	0.919	0.517	0.951	0.931	0.987	0.992	0.509	0.969	0.974	ID	0.994	0.982	0.302	0.784	0.797	0.801	0.747	0.796	0.785	0.765	0.800	0.736	0.857	0.819	0.823	0.846	0.821	0.827	0.832	0.857	0.816	0.809	0.215
O	0.96	0.903	0.958	0.968	0.921	0.518	0.954	0.934	0.990	0.995	0.510	0.971	0.976	0.994	ID	0.985	0.303	0.786	0.799	0.801	0.749	0.797	0.788	0.767	0.802	0.734	0.860	0.819	0.825	0.848	0.823	0.830	0.834	0.860	0.818	0.811	0.216
P	0.96	0.909	0.950	0.967	0.921	0.513	0.945	0.928	0.984	0.986	0.507	0.969	0.977	0.982	0.985	ID	0.303	0.789	0.800	0.799	0.753	0.798	0.790	0.769	0.804	0.733	0.860	0.824	0.829	0.850	0.826	0.832	0.839	0.860	0.820	0.814	0.215
Q	0.31	0.306	0.299	0.308	0.312	0.580	0.314	0.304	0.302	0.302	0.586	0.310	0.308	0.302	0.303	0.303	ID	0.399	0.393	0.385	0.409	0.381	0.382	0.382	0.380	0.273	0.324	0.340	0.332	0.328	0.338	0.338	0.326	0.319	0.341	0.318	0.505
R	0.8	0.775	0.781	0.799	0.780	0.421	0.805	0.776	0.783	0.785	0.424	0.794	0.797	0.784	0.786	0.789	0.399	ID	0.978	0.958	0.943	0.943	0.938	0.935	0.941	0.742	0.824	0.811	0.815	0.832	0.810	0.817	0.815	0.809	0.810	0.792	0.214
S	0.81	0.765	0.794	0.810	0.770	0.419	0.805	0.773	0.797	0.798	0.419	0.801	0.803	0.797	0.799	0.800	0.393	0.978	ID	0.979	0.933	0.951	0.946	0.925	0.949	0.750	0.841	0.802	0.806	0.830	0.801	0.808	0.805	0.824	0.800	0.785	0.211
T	0.8	0.750	0.810	0.794	0.755	0.410	0.789	0.759	0.798	0.800	0.410	0.793	0.796	0.801	0.801	0.799	0.385	0.958	0.979	ID	0.914	0.964	0.955	0.906	0.945	0.765	0.824	0.786	0.790	0.813	0.785	0.792	0.789	0.834	0.784	0.769	0.207
U	0.76	0.794	0.746	0.762	0.794	0.422	0.772	0.749	0.746	0.748	0.438	0.767	0.762	0.747	0.749	0.753	0.409	0.943	0.933	0.914	ID	0.915	0.913	0.929	0.910	0.727	0.786	0.824	0.824	0.792	0.824	0.826	0.816	0.773	0.826	0.777	0.217
V	0.79	0.762	0.803	0.790	0.768	0.408	0.781	0.755	0.793	0.797	0.418	0.808	0.803	0.796	0.797	0.798	0.381	0.943	0.951	0.964	0.915	ID	0.975	0.920	0.963	0.727	0.808	0.791	0.798	0.806	0.790	0.787	0.796	0.822	0.791	0.775	0.210
W	0.78	0.755	0.791	0.782	0.762	0.400	0.773	0.749	0.785	0.787	0.414	0.800	0.794	0.785	0.788	0.790	0.382	0.938	0.946	0.955	0.913	0.975	ID	0.916	0.955	0.762	0.805	0.791	0.796	0.802	0.791	0.788	0.794	0.812	0.786	0.771	0.209
X	0.77	0.782	0.761	0.781	0.789	0.414	0.784	0.768	0.762	0.765	0.429	0.786	0.781	0.765	0.767	0.769	0.382	0.935	0.925	0.906	0.929	0.920	0.916	ID	0.952	0.731	0.801	0.813	0.826	0.810	0.814	0.808	0.821	0.782	0.813	0.781	0.213
Y	0.8	0.773	0.799	0.803	0.779	0.416	0.791	0.768	0.797	0.799	0.426	0.821	0.815	0.800	0.802	0.804	0.380	0.941	0.949	0.945	0.910	0.963	0.955	0.952	ID	0.766	0.820	0.802	0.811	0.821	0.804	0.799	0.809	0.818	0.802	0.785	0.214
Z	0.73	0.718	0.747	0.723	0.711	0.363	0.720	0.692	0.732	0.734	0.375	0.743	0.738	0.736	0.734	0.733	0.273	0.742	0.750	0.765	0.727	0.772	0.762	0.731	0.766	ID	0.728	0.714	0.721	0.723	0.712	0.718	0.718	0.749	0.711	0.710	0.175
AA	0.87	0.825	0.852	0.872	0.830	0.459	0.858	0.837	0.857	0.858	0.457	0.862	0.864	0.857	0.860	0.860	0.324	0.824	0.841	0.824	0.786	0.808	0.805	0.801	0.820	0.728	ID	0.935	0.922	0.948	0.919	0.913	0.898	0.916	0.886	0.869	0.233
AB	0.84	0.855	0.815	0.836	0.851	0.466	0.838	0.827	0.819	0.822	0.478	0.840	0.835	0.819	0.821	0.824	0.340	0.811	0.802	0.786	0.824	0.791	0.791	0.813	0.802	0.714	0.935	ID	0.941	0.917	0.951	0.941	0.913	0.881	0.933	0.874	0.246
AC	0.83	0.858	0.815	0.840	0.865	0.450	0.840	0.829	0.826	0.825	0.464	0.844	0.839	0.823	0.825	0.829	0.332	0.815	0.806	0.790	0.824	0.798	0.796	0.816	0.826	0.811	0.921	0.922	ID	0.950	0.926	0.922	0.935	0.885	0.920	0.890	0.240
AD	0.86	0.825	0.835	0.864	0.832	0.460	0.853	0.836	0.848	0.848	0.461	0.856	0.859	0.846	0.848	0.850	0.328	0.832	0.830	0.813	0.792	0.806	0.802	0.810	0.821	0.723	0.948	0.917	0.950	ID	0.904	0.911	0.903	0.904	0.895	0.878	0.238
AE	0.83	0.851	0.814	0.838	0.856	0.464	0.837	0.825	0.818	0.822	0.476	0.842	0.838	0.821	0.823	0.826	0.338	0.810	0.801	0.785	0.824	0.790	0.791	0.814	0.804	0.712	0.919	0.951	0.926	0.904	ID	0.964	0.900	0.868	0.923	0.868	0.242
AF	0.84	0.850	0.822	0.845	0.850	0.473	0.846	0.832	0.826	0.829	0.477	0.839	0.843	0.827	0.830	0.832	0.338	0.817	0.808	0.792	0.826	0.788	0.808	0.799	0.712	0.913	0.941	0.922	0.911	0.964	ID	0.902	0.879	0.920	0.868	0.245	

Tabla G. Resultado del crecimiento en diferentes concentraciones de metales.

COLONIA	CRECIMIENTO (24 HRS.) EN:																				
	Cu (ppm)		Zn (ppm)		Co (ppm)		Ni (ppm)		V (ppm)		Pb (ppm)		Hg (ppm)		Mn (ppm)		Cu, Zn, Co	Cu, Ni, Co	Cu, Ni, V	Cu, Zn, V	Cu, Zn, Ni
	100	200	100	200	100	200	100	200	100	200	100	200	25	50	100	200	50 ppm				
1MRGB _{BUAP}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+
4GKTS _{BUAP}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
17MRC _{BUAP}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3CAG _{BUAP}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
6CAG _{BUAP}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7LVAG _{BUAP}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8GKTSAG _{BUAP}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
10NmAg _{BUAP}	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
12NmAg _{BUAP}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12(a)NmAg _{BUAP}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13NmAg _{BUAP}	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
14RCAG _{BUAP}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
15RCAG _{BUAP}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
15(a)RCAG _{BUAP}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
3RiLDh _{BUAP}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
5RGLDh _{BUAP}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
5(a)RGLDh _{BUAP}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
G _{BUAP}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
AN _{BUAP}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AO _{BUAP}	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
6 _{BUAP}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
36 _{BUAP}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
40 _{BUAP}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

Tabla H. Resultado de la interpretación de los halos de inhibición de las bacterias por varios antibióticos, usando la técnica de multidiscos Bio-Rad.

ANTIMICROBIANO	12NmAg _{BUAP}	12(a)NmAg _{BUAP}	14RCA _{BUAP}	15RCA _{BUAP}	15(a)RCA _{BUAP}	3RiLDh _{BUAP}	5RGLDh _{BUAP}	5(a)RGLDh _{BUAP}	G _{BUAP}	AN _{BUAP}
	<i>Sh. putrefaciens</i>	<i>A. radiobacter</i>	<i>E. coli</i>	<i>Sh. putrefaciens</i>	<i>Sh. putrefaciens</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>Sh. putrefaciens</i>	<i>Sh. putrefaciens</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Sh. putrefaciens</i>
CF (CEFALOTINA)	R	S	R	S	S	R	I	S	R	I
CRO (CEFTRIAXONA)	S	S	R	S	S	R	S	S	MS	MS
AM (AMPICILINA)	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R
SXT (TRIMETOPRIM-SULFAMETOXAZOL)	S	S	I	R	R	R	I	S	S	I
CTX (CEFOTAXIMA)	S	S	R	S	S	MS	S	S	MS	S
NET (NETILMICINA)	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S
PEF (PEFLOXACINA)	S	S	R	S	S	I	I	S	I	I
NF (NITROFURANTOÍNA)	S	S	S	S	S	R	S	S	I	S
CL (CLORANFENICOL)	S	S	S	S	S	I	S	S	I	S
AK (AMIKACINA)	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S
GE (GENTAMICINA)	S	S	I	S	S	S	S	S	R	R
CB (CARBENICILINA)	S	S	R	S	S	R	S	S	I	S

Apéndice A: Medio CPS ID 3

El medio CPS ID 3 (CPS3) permite identificar los grupos bacterianos siguientes:

- *Escherichia coli*,
- *Enterococcus*,
- *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* (KESC),
- *Proteus*, *Providencia*, *Morganella* (*Proteeae*).

Este medio está constituido por una base nutritiva rica asociada a diferentes peptonas y a 2 substratos cromogénicos que permiten revelar la actividad enzimática correspondiente. La identificación directa de las bacterias se basa sobre el siguiente principio:

- *E. coli*: espontáneo (de rosa a tinto) de las cepas productoras de β -glucuronidasa (β -GUR).
- *Enterococcus*: color espontáneo turquesa de las cepas que expresan una β -glucosidasa (β -GLU).
- KESC: color espontáneo de verde a marrón verdoso de las cepas que expresan una β -glucosidasa (β -GLU).
- *Proteus*: color espontáneo marrón de las cepas que expresa una desaminasa.

Apéndice B: API 20 E (REF 20 100/20 160)

Sistema de identificación de *Enterobacteriaceae* y otros bacilo gramnegativos no exigentes. Incluye 21 pruebas bioquímicas miniaturizados, así como una base de datos (Brooks, Jens y Sodeman, 1974; Shayegani, Maupin, y McGlynn, 1977; Smith, et al., 1972).

Principio

La galería del sistema se compone de 20 microtubos que contiene los substratos deshidratados. Los microtubos se inoculan con una suspensión bacteria que reconstituye las pruebas. Las reacciones producidas durante el periodo de incubación se traducen en cambios de color espontáneo o revelado mediante la adición de reactivos.

La lectura de estas reacciones se lleva a cabo utilizando la Tabla de Lectura, y la identificación se obtiene con la ayuda del catálogo Analítico o del software de identificación (BioMérieux, 2005).

Composición de la galería

La composición de la galería puede observarse en la siguiente Tabla de Lectura:

PRUEBAS	COMPONENTES ACTIVOS	QTE (mg/cup)	REACCIONES/ENZIMAS	RESULTADO	
				NEGATIVO	POSITIVO
ONGP	2-nitro-fenil-βD-galactopiranosida	0.223	β-galactosidasa (orto-nitrofenil-βD-galactopiranosidasa)	incolore	amarillo (1)
<u>ADH</u>	L-arginina	1.9	Arginina-dihidrolasa	amarillo	rojo/anaranjado (2)
<u>LDC</u>	L-lisina	1.9	Lisina Decarboxilasa	amarillo	rojo/anaranjado (2)
<u>ODC</u>	L-ornitina	1.9	Ornitina Decarboxilasa	amarillo	rojo/anaranjado (2)
<u>CIT</u>	Citrato trisódico	0.756	Utilización de CITrato	verde pálido/amarillo	azul-verde/azul (3)
<u>H₂S</u>	Tiosulfato sódico	0.075	Producción H ₂ S	incolore/grisáceo	depósito negro/fin liserado
<u>URE</u>	Urea	0.76	UREasa	amarillo	rojo/anaranjado (2)
TDA	L-triptófano	0.38	Triptofano DesAminasa	TDA/inmediato: amarillo	TDA/inmediato: marrón-rojizo
IND	L-triptófano	0.19	Producción ÍNDole	JAMES/inmediato: Incolore verde pálido/ amarillo	JAMES/inmediato: rosa
<u>VP</u>	Piruvato sódico	1.9	Producción de acetoina (Voges Proskauer)	VP 1+ VP2/10 min incolore	VP 1+ VP2/10 min rosa/rojo (5)

Biodegradación de compuestos azo en condiciones reductoras por bacterias aisladas de lixiviados, aguas residuales y lodos activados

GEL	Gelatina (origen bovino)	0.6	Gelatinasa (GELatina)	no difusión	Difusión pigmento negro
GLU	D-glucosa	1.9	Fermentación/oxidación (GLUcosa) (4)	azul/azul verdoso	amarillo/amarillo grisáceo
MAN	D-manitol	1.9	Fermentación/oxidación (MANitol) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
INO	Inositol	1.9	Fermentación/oxidación (INOsitol) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
SOR	D-sorbitol	1.9	Fermentación/oxidación (SORbitol) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
RHA	L-ramnosa	1.9	Fermentación/oxidación (RHAmnosa) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
SAC	D-sacarosa	1.9	Fermentación/oxidación (SACarosa) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
MEL	D-melibiosa	1.9	Fermentación/oxidación (MELibiosa) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
AMY	Amigdalina	0.57	Fermentación/oxidación (AMYgdalina) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
ARA	L-arabinosa	1.9	Fermentación/oxidación (ARABinosa) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
OX	-	-	Citocromo-OXidasa	De acuerdo a la ficha técnica de oxidasa	

- (1) Un color amarillo muy ligero también implica resultado positivo.
- (2) La aparición de un color naranja tras 36-48 hrs de incubación debe considerarse negativa.
- (3) Lectura de la cúpula (zona aerobia).
- (4) La fermentación comienza en la parte inferior de los tubos, mientras que la oxidación empieza en la cúpula.
- (5) Una ligera coloración rosa, que aparece tras 10 minutos, debe ser leída como negativa.

Tabla C.1. Tabla de lectura del API 20 E.

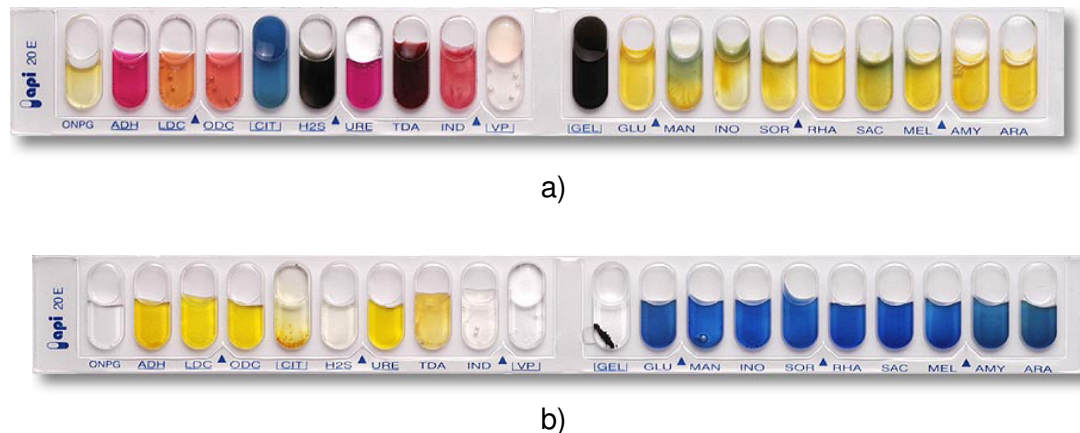


Fig. C.1. a) resultado positivo de la prueba API 20E y b) Resultado negativo.

Procedimiento

Las galerías API 20 E no deben ser utilizadas directamente a partir de muestras de origen clínico o de otro tipo. Los microorganismos a identificar deben aislarse en una primera fase sobre un medio de cultivo adecuado según las técnicas usuales de bacteriología.

Preparación de la galería:

- Reunir fondo y tapa de una cámara de incubación y repartir aproximadamente 5 ml de agua destilada en los alvéolos para crear la atmósfera húmeda.
- Inscribir la referencia de la cepa en la lengüeta lateral de la cámara.
- Sacar la galería de su envase.
- Colocar la galería en la cámara de incubación.

Preparación del inóculo:

- Abrir una ampolleta de API NaCl 0.85% medium (5 ml) o un tubo de ensaye que contenga 5 ml de agua fisiológica o de agua destilada estéril, sin aditivos.
- Con una pipeta extraer una sola colonia bien aislada sobre medio agar. Utilizar preferentemente cultivos jóvenes (18-24 horas).
- Realizar una suspensión bacteriana homogeneizando cuidadosamente las bacterias en el medio. Esta suspensión debe ser utilizada inmediatamente después de su preparación.

Inoculación de la galería:

- Llenar los tubos y las cúpulas de los ensayos CIT, VP, GEL con la suspensión bacteriana, utilizando la pipeta que se ha usado para la toma de muestras.
- Llenar únicamente los tubos (y no las cúpulas) de los otros ensayos.
- Crear una anaerobiosis en los ensayos ADH, LDC ODC, H₂S, URE, llenando su cúpula con aceite de parafina.
- Cerrar la cámara de incubación.
- Incubar a 36°C ± 2°C durante 18-24 horas.

Lectura e interpretación

Lectura de la galería

- Después de la incubación, la lectura de la galería debe hacerse remitiéndose a la Tabla de Lectura.
- En caso de que 3 o más ensayos (prueba GLU + o -) resultasen positivo, anotar en la hoja de resultados todas las reacciones espontáneas y después revelar los ensayos que necesitan a adición de aditivos.

Biodegradación de compuestos azo en condiciones reductoras por bacterias aisladas de lixiviados, aguas residuales y lodos activados

- Prueba TDA: agregar una gota del reactivo TDA (FeCl_3 al 10%). Un color marrón-rojizo indica una prueba positiva que se anotará en la hoja de resultados.
- Prueba IND: agregar una gota de los reactivos JAMES (reactivo de Kovacs). Un color rosado que se difumina en toda la cúpula indica una reacción positiva, que se debe anotar en la hoja de resultados.
- Prueba VP: agregar una gota de los reactivos VP 1 (KOH al 40%) y VIP 2 ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$). Esperar un mínimo de 10 minutos. Un color rosa o rojo indica una reacción positiva que se anotará en la hoja de resultados. Una débil coloración rosa que aparece después de 10 minutos debe ser considerada como negativa.

NOTA: La prueba de investigación sobre la producción de indól debe ser realizada en último lugar, pues esta reacción libera gases que pueden alterar la interpretación de las otras pruebas de la galería.

- Si el número de pruebas positivas antes de añadir los reactivos (incluyendo el ensayo GLU) es inferior a 3:
 - Reincubar la galería 24 horas (± 2 horas) suplementarias sin volver a añadir los reactivos.
 - Revelar los ensayos que precisan adición de reactivos.
 - Para complementar la identificación, puede ser útil realizar ensayos complementarios.

Interpretación

La identificación se obtiene a partir del perfil numérico:

- Determinación del perfil numérico:

En la hoja de resultados, las pruebas están separadas en grupos de tres y se indica para cada uno un valor de 1, 2 ó 4. Como la galería API 20 E comporta 20 ensayos, sumando al interior de cada grupo los valores que corresponden a reacciones positivas, se obtiene un perfil numérico de 7 cifras (a la reacción de la oxidasa, constituye la prueba no. 21 se le asigna el valor 4, cuando resulte positiva).
- Identificación:

Se realiza a partir de la base de datos (V4.0).

 - Con la ayuda del Catálogo Analítico:
 - Localizar el perfil numérico en la lista de los perfiles.
 - Con la ayuda del Software de identificación:
 - Introducir manualmente mediante el teclado el perfil numérico de 7 cifras.

Como además, en ciertos casos, el perfil de 7 cifras resulta insuficientemente discriminante, es necesario realizar los siguientes ensayos complementarios:

Apéndice C: API 20 NE (REF 20 050).

Sistema estandarizado para la identificación de no entérico gramnegativos no exigentes (por ejemplo *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc). Incluye 8 pruebas bioquímicas convencionales, 12 pruebas de asimilación, así como una base de datos (Bilkey, et al., 1988; Dance, et al., 1989; Lampe y Van Der Reijden, 1984).

Principio

La galería del sistema se compone de 20 microtubos que contiene los substratos deshidratados. Los microtubos se inoculan con una suspensión bacteria salina que reconstituye las pruebas. Las reacciones producidas durante el periodo de incubación se traducen en cambios de color espontáneo o revelado mediante la adición de reactivos.

Los ensayos de asimilación se inoculan con un medio con la bacteria crecida si son capaces de utilizar el sustrato correspondiente.

La lectura de estas reacciones se lleva a cabo utilizando la Tabla de Lectura, y la identificación se obtiene con la ayuda del catálogo Analítico o del software de identificación (BioMérieux, 2005).

Composición de la galería

La composición de la galería puede observarse en la siguiente Tabla de Lectura:

PRUEBAS	COMPONENTES ACTIVOS	QTE (mg/cup)	REACCIONES/ENZIMAS	RESULTADO	
				NEGATIVO	POSITIVO
NO ₃	Nitrato de potasio	0.136	Reducción de nitratos en nitritos	NIT 1 +NIT 2 2/5 minutos Incoloro	NIT 1 +NIT 2 2/5 minutos rosa-rojo
			Reducción de nitratos en nitrógeno	Zn / 5 minutos rosa	Zn / 5 minutos incoloro
TRD	L-triptófano	0.2	Producción de Indol (triptófano)	JAMES/inmediato Incoloro verde pálido/amarillo	JAMES/inmediato o rosa
<u>GLU</u>	D-glucosa	1.92	Fermentación (GLUcosa)	azul a verde	Amarillo
<u>ADH</u>	L-arginina	1.92	Arginina-DiHidrolasa	amarillo	rojo/anaranjado/ rosa
<u>URE</u>	Urea	0.76	UREasa	amarillo	rojo/anaranjado/ rosa
ESC	Esculina citrato férrico	0.56 0.072	Hidrólisis (β-glucosidasa) (ESCulina)	amarillo	gris/café/negro
GEL	Gelatina (origen bovino)	0.6	Hidrólisis (proteasa) (GELatina)	no difusión sin pigmento	difusión pigmento negro
PNPG	4-nitrofenil-βD-galactopiranosid	0.22	β-galactosidasa (Para-Nitrofenil-βD-	incoloro	amarillo

Biodegradación de compuestos azo en condiciones reductoras por bacterias aisladas de lixiviados, aguas residuales y lodos activados

	e		Galactopiranosidase)		
<u>GLU</u>	D-glucosa	1.56	Asimilación (GLUcosa)	transparente	opaco
<u>ARA</u>	L-arabinosa	1.4	Asimilación (ARABinosa)	transparente	opaco
<u>MNE</u>	D-manosa	1.4	Asimilación (ManNosa)	transparente	opaco
<u>MAN</u>	D-manitol	1.36	Asimilación (MANitol)	transparente	opaco
<u>NAG</u>	N-acetil-glucosamina	1.28	Asimilación (N-Acetil-Glucosamina)	transparente	opaco
<u>MAL</u>	D-maltosa	1.4	Asimilación (MALtosa)	transparente	opaco
<u>GNT</u>	Gluconato de potasio	1.84	Asimilación (GlucoNnato de potasio)	transparente	opaco
<u>CAP</u>	Ácido cáprico	0.78	Asimilación (ácido CAPrico)	transparente	opaco
<u>ADI</u>	Ácido adípico	1.12	Asimilación (ácido ADIpico)	transparente	opaco
<u>MLT</u>	Ácido málico	1.56	Asimilación (MaLaTo)	transparente	opaco
<u>CIT</u>	Citrato trisódico	2.28	Asimilación (CITrato trisódico)	transparente	opaco
<u>PAC</u>	Ácido fenilacético	0.8	Asimilación (ácido fenilACético)	transparente	opaco
OX	-	-	Citocromo-OXidasa	De acuerdo a la ficha técnica de oxidasa	



a)

Fig. D.1. a) resultado del uso de la prueba API 20 NE

Procedimiento

Las galerías API 20 E no deben ser utilizadas directamente a partir de muestras de origen clínico o de otro tipo. Los microorganismos a identificar deben aislarse en una primera fase sobre un medio de cultivo adecuado según las técnicas usuales de bacteriología.

Preparación de la galería:

- Reunir fondo y tapa de una cámara de incubación y repartir aproximadamente 5 ml de agua destilada en los alvéolos para crear la atmósfera húmeda.
- Inscribir la referencia de la cepa en la lengüeta lateral de la cámara.
- Sacar la galería de su envase.
- Colocar la galería en la cámara de incubación.

Preparación del inóculo:

Biodegradación de compuestos azo en condiciones reductoras por bacterias aisladas de lixiviados, aguas residuales y lodos activados

- Abrir una ampolleta de API NaCl 0.85% medium (5 ml) o un tubo de ensaye que contenga 5 ml de agua fisiológica o de agua destilada estéril, sin aditivos.
- Con una pipeta extraer de 1 a 4 colonias bien aislada sobre un medio agar. Utilizar preferentemente cultivos jóvenes (18-24 horas).
- Realizar una suspensión con una turbidez equivalente a 0.5 McFarland, para ello utilizar McFarland Standard punto 0.5. Esta suspensión debe ser utilizada inmediatamente después de su preparación.

NOTA: Es muy importante que la densidad del inóculo se ajuste a 0,5 McFarland de lo contrario no funcionará correctamente. En particular un inóculo más débil puede dar lugar a resultados falsos negativos. No toque las cúpulas mientras se trabaja y no deje las galerías expuesta al aire durante un largo período de tiempo después de la inoculación.

Inoculación de la galería:

- Inocular los ensayos NO₃ a PNPG, llenar los tubos(y no las cúpulas) con la solución fisiológica, utilizando la pipeta que se ha usado para la toma de muestras. Para evitar la formación de burbujas en la base de los tubos, incline ligeramente hacia adelante y coloque la punta de la pipeta contra el lado de la cúpula.
- Abrir una ampolleta de API Mediuo AUX y añadir aproximadamente 200 µl de la suspensión salina restante. Homogenizar bien con la pipeta evitando la formación de burbujas.
- Llenar los tubos y las cúpulas de los ensayos GLU al PAC con la suspensión. Tenga cuidado de dejar una superficie plana o ligeramente convexa, pero no cóncava. Cúpulas excesivamente llenas o vacías puede dar resultados incorrectos.
- Crear una anaerobiosis en los 3 ensayos subrayados y en negritas (**GLU**, **ADH** y **URE**), llenando su cúpula con aceite de parafina en forma convexa.
- Cerrar la cámara de incubación.
- Incubar a 29°C ± 2°C durante 24 horas (± 2 horas).

Lectura e interpretación

Lectura de la galería

- Después de la incubación, la lectura de la galería debe hacerse remitiéndose a la Tabla de Lectura.
- Registrar todas las reacciones espontáneas (**GLU**, **ADH**, **URE**, ESC, GEL y PNPG) en la hoja de resultados.
- La lectura de las dos pruebas de NO₃ y TRP debe ser realizada protegiendo las pruebas de asimilación de la contaminación del aire. Para ello cubrir las pruebas de asimilación con la tapa de la caja de incubación durante la lectura.
 - Prueba NO₃:

Biodegradación de compuestos azo en condiciones reductoras por bacterias aisladas de lixiviados, aguas residuales y lodos activados

- Añadir una gota de los reactivos NIT 1 (0.8 ácido sulfanílico + 100 ml ácido acético 5N) y NIT 2 (0.6 g N-N-dimetil-1-naftilamina + 100 ml ácido acético 5N) a la cúpula de NO_3 .
- Esperar 5 minutos. Una coloración roja indica una reacción positiva que se registra en la hoja de resultados.
- Una reacción negativa puede deberse a la producción de nitrógeno (eventualmente señalado por la presencia de micro-burbujas); agregar de 2 a 3 mg de reactivo Zn en la cúpula NO_3 .
- Después de 5 minutos, una cúpula incolora indica una reacción positiva, que anotaremos en la hoja de resultados. Si el color de la cúpula cambia a rosa-rojo, la reacción es negativa, ya que los nitratos aún presentes en el tubo han sido reducidos a nitritos por el zinc.

La reacción usada para la identificación de la bacteria es la reducción de los nitratos. Es positivo cuando cualquiera de las reacciones anteriores (producción de NO_2 o N_2) es positivo. La producción de N_2 puede, sin embargo, ser de utilidad como una sola prueba suplementaria.

- Prueba TRP:
 - Agregar una gota de los reactivos JAMES (reactivo de Kovacs). La reacción tiene lugar inmediatamente: un color rosa que se difumina en toda la cúpula indica una reacción positiva, que se debe anotar en la hoja de resultados.
- Pruebas de asimilación
 - Observar el crecimiento bacteriano. Una cúpula opaca indica una reacción positiva. En ocasiones una cúpula puede mostrar un crecimiento débil, en este caso los resultados deben anotarse como -/+ o +/- por la comparación de la intensidad de las otras pruebas en la galería.

Una vez que las lecturas se han hecho, la identificación debería ser posible, sin embargo en los siguientes casos se deberá reincubar la galería:

- Si el perfil no se puede encontrar en el Catálogo Analítico del API 20NE.
- Si la nota siguiente está indicado para el perfil obtenido: "IDENTIFICACIÓN NO VÁLIDA ANTES DE 48 HORAS DE INCUBACIÓN".

Usando una pipeta retirar los reactivos NIT 1 y NIT 2 y JAMES y cubrir inmediatamente las pruebas de NO_3 y TRP con aceite mineral. Reincubar la galería a $29\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ durante otras 24 horas, y leer todas las pruebas de nuevo, excepto los primeros 3 (NO_3 , TRP y GLU), que deberá solamente leerse una vez a las 24 horas.

Interpretación

La identificación se obtiene a partir del perfil numérico:

- Determinación del perfil numérico:

Referencias

1. Ali, H. (2010). Biodegradation of Synthetic Dyes-A review. *Water, Air and Soil Pollution*, 213, 251-273.
2. Anjaneya, O., Shrishailnath, S. S., Guruprasad, K., Nayak, A. S., Mashetty, S. B., Karegoudar, T. B. (2013). Decolourization of Amaranth Dye by Bacterial Biofilm in Batch and Continuous Packed Bed Bioreactor. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 79, 64-72.
3. Assih, A. E., Ouattara, S. A., Thierry, S., Cayol, J. y Labat, M., Macarie, H. (2002). *Stenotrophomonas acidaminiphila* sp. nov., a Strictly Aerobic Bacterium Isolated from an Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) Reactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 559-568.
4. Autor, P. A. (Ed.). (1977). *Biochemical Mechanisms of Paraquat Toxicity*. United Kingdom: Academic Press.
5. Bilkey, M.K., Bremner, D.A., Cameron, G.L. y Garner, J.G. (1988). Comparison of Five Commercial Methods for the Identification of Non-fermentative and Oxidase Positive Fermentative Gram-Negative *Bacilli*. N.Z. *The Journal of Medical Laboratory Technology*, 8-12.
6. BioMérieux. (2005). Manual API 20 E, REF 20 100 / 20 160. Francia.
7. BioMérieux. (2005). Manual API 20 NE, REF 20 050. Francia.
8. Bou, G., Fernández, O. A., García, C., Sáez, N. J. y Valdezate, S. (2011). Métodos de Identificación Bacteriana en el Laboratorio de Microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29 (8), 601-608.
9. Brooks, K. A., Jens, M. y Sodeman, T. M. (1974). A clinical Evaluation of the API Microtube System for Identification of Enterobacteriaceae. *The American Journal of Medical Technology*, 40, 55-61.
10. Brown, M. A. y De Vito, S. C. (1993). Predicting Azo Dye Toxicity. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 23(3), 249-324.
11. Cai, P.-J., Xiao, X., He, Y.-R., Li, W.-W., Chu, J., Wu, C., He, M.-X., Zhang, Z., Sheng, G.-P., Lam, M. H.-W., Xu, F., Yu, H.-Q. (2012). Anaerobic Biodecolorization Mechanism of Methyl Orange by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 1769-1776.

12. Chang, J.-S. y Lin, Y.-T. (2000). Fed-Batch Bioreactor Strategies for Microbial Decolorization of Azo Dye Using a *Pseudomonas luteola* Strain. *Biotechnology Progress*, 16, 979-985.
13. Chen, K.-C., Huang, W.-T., Wu, J.-Y. y Houg, J.-Y. (1999). Microbial Decolorization of Azo Dyes by *Proteus mirabilis*. *Journal of industrial microbiology & Biotechnology*, 23, 686-690.
14. Chen, M., Liu, H., Wang, J. y Wang, Y. (2002). Influence of Supplemental Nutrient on Aerobic Decolorization of Acid Red 14 in Activated Sludge. *Journal Environmental Science Health*, A37 (4), 667- 678.
15. Chen, X., Xu, M., Wei, J. y Sun G. (2010). Two Different Electron Transfer Pathways May Involve in azoreduction in *Shewanella decolorationis* S12. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 86: 743-751.
16. Christie, R. M. (2001). *Colour Chemistry*. 1ra. Edición. Acribia, S.A. Zaragoza, España. 211p.
17. CONAGUA (2013). *Estadísticas del Agua en México*. México,
18. Dance, D.A.B., Wuthiekanun, V., Naigowit, P., y White, N.J. (1989). Identification of *Pseudomonas pseudomallei* in Clinical Practice: Use of Simple Screening Tests and API 20 NE. *Journal of Clinical Pathology*, 42, 645-648.
19. Dos Santos, A. B., Madrid, M. P., Stams, A. J. M., Van Lier, J. B. y Cervantes, F. J. (2005). Azo Dye Reduction by Mesophilic and Thermophilic Anaerobic Consortia. *Biotechnology Progress*, 21, 1140-1145.
20. Gao, H., Barua, S., Liang, Y., Wu, Li., Dong, Y., Reed, S., Chen, J., Culley, D., Kennedy, D., Yang, Y., He, Z., Nealson, K.-H., Fredrickson, J.-K., Tiedje, J.-M., Romine, M. y Zhou, J. (2010). Impacts of *Shewanella oneidensis* c-type Cytochromes on Aerobic and Anaerobic Respiration. *Microbial Biotechnology*, 3(4), 455-466.
21. Gilabert, E.J. (2002). *Química Textil*. Tomo I. *Materias Textiles*. Editorial U. P. V. Valencia, España. 333p.
22. González, C. U. M., Dávila, P. J., Pinedo, E. J. A. y Serrano, R. B. (2007). Degradación Fotocatalítica de Metil Paratión y Paraquat. *Revista Digital de la Universidad Autónoma de Zacatecas Nueva Época*. 3 (1), 1-16.
23. *Guía de Productos Químicos*. Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo. (2001). 3ra Edición. Pag. 73-120.
24. Hall, T. A. (1999). BioEdit: a User-friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.

25. Hong, Y., Chen, X., Guo, J., Xu, Z., Xu, M. y Sun, G. (2007). Effects of Electron Donors and Acceptors on Anaerobic Reduction of Azo Dyes by *Shewanella decolorationis* S12. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 230-238.
26. Hong, Y. G. y Gu, J. D. (2010). Physiology and Biochemistry of Reduction of Aazo Compounds by *Shewanella* strains Relevant to Electron Transport Chain *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88, 637-643.
27. Isik, M. y Sponza, D. T. (2003). Effect of Oxygen on Decolorization of Azo Dyes by *Escherichia coli* and *Pseudomonas sp.* and Fate of Aromatic Amines. *Process Biochemistry*, 38, 1183-1192.
28. Isik, M. y Sponza, D. T. (2004). Monitoring of Toxicity and Intermediates of C.I. Direct Black 38 Azo Dye through Decolorization in an Anaerobic/aerobic Sequential Reactor System. *Journal of Hazardous Materials*, 114, 29-39.
29. Jinqi, L. y Houtian, L. (1992). Degradation of azo dyes by algae. *Environmental Pollution*, 75, 273-278.
30. Lampe, A.S. y Van Der Reijden, T.J.K. (1984). Evaluation of Commercial Test Systems for the Identification of Nonfermenters. *European Journal of Clinical Microbiology*, 3, 301-305.
31. Manganello, S., Tayara, A., Perazzi, B., Neira, L., Famiglietti, A., Pugliese, L., Santini, P. y Vay, C. (2001). Caracterización y Distribución de Especies de *Citrobacter* en un Hospital Universitario. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 19, 11-14.
32. McLean, J. S., Majors, P. D., Reardon, C. L., Bilskis, C. L., Reed, S. B., Romine, M. F., Fredrickson, J. K. (2008). Investigations of Structure and Metabolism within *Shewanella oneidensis* MR-1 Biofilms. *Journal of Microbiological Methods*, 74, 47-56.
33. McMullan, G., Meehan, C., Conneely, A., Kirby, N., Robinson, T., Nigam, P., Marchant, R. y Smyth, W.-F. (2001). Microbial Decolourisation and Degradation of Textiles Dyes. *Applied Microbiology Biotechnology*, 56, 81-87.
34. Menéndez, D. F. (2009). Higiene Industrial. España. Lex Nova.
35. Normand, P., Cournoyer, B., Nazareth, S. y Simonet, P. (1992). Analysis of a Ribosomal RNA Operon in the Actinomycete *Frankia*. *Gene* 111(1), 119-124.
36. Padmavathy, S., Sandhya, S., Swaminathan, K., Subrahmanyam, Y. V., Chakrabarti, T. y Kaul, S. N. (2003). Aerobic Decolorization of Reactive Azo Dyes in Presence of Various Cosubstrates. *Chemical and Biochemical Engineering*, 17 (2), 147-151.
37. Padmavathy, S., Sandhya, S., Swaminathan, K., Subrahmanyam, Y. V. y Kaul, S. N. (2003). Comparison of Decolorization of Reactive Azo Dyes by Microorganisms Isolated from Various Sources. *Environmental Science*, 15(5), 628-632.

38. Pearce, C. I., Christie, R., Boothman, C., Von, C. H., Guthrie, J.T. y Lloyd, J. R. (2006). Reactive Azo Dye Reduction by *Shewanella* strain J18 143. *Biotechnology and Bioengineering*, 95,692-703.
39. Rau, J., Knackmuss, H.-J. y Stolz, A. (2002). Effects of Different Quinoid Redox Mediators on the Anaerobic Reduction of Azo Dyes by Bacteria. *Environmental Science and Technology*, 36, 1497-1504.
40. Razo, F. E., Luijten, M., Donlon, B. A., Lettinga, G. y Fiel, J. A. (1997). Complete Biodegradation of the Azo Dye Azodisalicylate under Anaerobic Conditions. *Environmental Science and Technology*, 31(7), 2098-2103.
41. Saratale, R.G., Saratale, G. D., Chang, J.S., y Govindwar, S. P. (2009). Decolorization and Biodegradation of Textile Dye Navy Blue HER by *Trychosporon beigellii* NCIM-3326. *Journal of Hazardous Materials*, 166, 1421-1428.
42. Sarnthima, R., Khammuang, S., y Svasti, J. (2009). Extracellular Ligninolytic Enzymes by *Lentinus polychrous* Lev. Under Solid-state Fermentation of Potential Agro-industrial Wastes and their Effectiveness in Decolorization of Synthetic Dyes. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14, 513-522.
43. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Aguas Residuales-Muestreo. Residual Waters-Sampling. NMX-AA-003-1980. México, D.F., 1980. 8 p.
44. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Cuerpos receptores: muestreo. Receiver Bodies: sampling. NMX-AA-014-1980. México, D.F., 1980. 8 p.
45. Secretaría de Salud. Procedimientos Sanitarios para el Muestreo de Agua para Uso y Consumo Humano en Sistemas de Abastecimiento de Agua Públicos y Privados. Nom-014-SSA1-1993. México, D.F., 1994. 6 p.
46. Shayegani, M., Maupin, P. S. y McGlynn, D. M. (1977). Evaluation of the API 20E System for Identification of Nonfermentative Gram-Negative Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 7(6), 539-545.
47. Sigma-aldrich Co. Llc. (2014). Recuperado el 30 de mayo 2014, de <http://www.sigmaaldrich.com/mexico.html>.
48. Smith, P. B., Tomfohrfde, K. M., Rhoden, D. L. y Balows, A. (1972). API System: a Multitube Micromethod for Identification of Enterobacteriaceae. *Applied Microbiology*, 24(3), 449-452.
49. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. y Kumar, S. (2007). MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24(8), 1596-1599.
50. Tan, N. C. G. (2001). Integrated and Sequential Anaerobic/Aerobic Biodegradation of Azo Dyes. Ph D. thesis. Wageningen. Universidad de Wageningen, Netherlands. 104p.

51. Van der Zee, F.P. (2002). Anaerobic azo dye reduction. Tesis de Doctorado. University Wageningen, Holanda. 154 pp.
52. Wallace, T. H. (2001). Biological Treatment of a Synthetic Dye Water and an Industrial Textile Wastewater Containing Azo Dyes Compounds. Tesis de Maestría. Virginia Polytechnic Institute, Virginia, Estados Unidos. 70 pp.
53. Wang, Y., Wang, L., Li, F., Liang, J., Li, Y., Dai, J., Loh, T. y Ho, Y. (2009). Effects of Oxytetracycline and Sulfachloropyridazine Residues on the Reductive Activity of *Shewanella decolorationis* S12. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5878-5883.
54. Wong, P.K. y Yuen, P.Y. (1996). Decolorization and Biodegradation of Methyl Red by *Klebsiella Pneumoniae* R S13. Pergamon. Departamento de Biología, Universidad de Hong Kong, 30(7), 1736-1744.
55. Xu, M., Guo, J., Cen, Y., Zhong, X., Cao, W. y Sun, G. (2005). *Shewanella decolorationis* sp. Nov., Decolorizing Bacterium Isolated from Activated Sludge of a Waste-water Treatment Plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 363-368.
56. Xu, M., Guo, J. y Sun, G. (2007). Biodegradation of Textile Azo Dye by *Shewanella decolorationis* S12 under Microaerophilic Conditions. *Applied Microbiology Biotechnology*, 76, 719-726.
57. Yañez, O. G., Sanchez, S. E., Jimenez, T. G. A., Penninckx, M., Ortiz, H. M. L. (2009). Removal of Two Organophosphate Pesticides by a Bacterial Consortium Immobilized in Alginate or Tezontle *Journal of Hazardous Materials*, 168, 1554-1561.
58. Yu, Z., y Wen, X. (2005). Screening and Identification of Yeasts for Decolorizing Synthetic Dyes in Industrial Wastewater. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 56, 109-114.
59. Zissi, U., Lyberatos, G. y Pavlou, S. (1997). Biodegradation of p-aminoazobencene by *Bacillus subtilis* Under Aerobic Conditions. *Industrial Microbiology Biotechnology*, 19(1), 49-55.