



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

TÍTULO DE LA TESIS

“Ensayos de bioestimulación con diferentes donadores de electrones de muestras contaminadas por Cr(VI) aisladas de San Francisco del Rincón Gto y caracterización molecular de la microbiota nativa por 16s rDNA”

Tesis que para obtener el título de
BIÓLOGA

PRESENTA
Bianca Guadalupe Flores Francisco

TUTORA: Dra. Katy Juárez López

Marzo de 2014



Agradecimiento

A mis padres que sin su apoyo no hubiera terminado esta primera etapa de mi vida profesional.

Agradezco el apoyo brindado y enseñanza en el laboratorio de ingeniería celular y biocatálisis del instituto de biotecnología UNAM.

Por la beca otorgada por parte de la dirección general de asuntos del personal académico (DGAPA) al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) .

A mi tutora de tesis que confió en mí arduamente para la realización de la tesis, por guiarme en cada paso del proyecto por sus regaños, por prepararme para la presentación del examen y sus consejos que me hicieron crecer como persona y por todo el apoyo que me brindo.

A Paloma Lara estudiante de doctorado que me estuvo enseñando, por sus consejos que me sirvieron de mucha ayuda para ser una buena profesionista.

A Emmanuel y Beto de estancia posdoctoral que me estuvieron dando consejos y cada uno de los integrantes del grupo de la Dra.

A mi querida escuela que durante estos años me forjó como estudiante. A mis amigos (Lucero, Lili, Ana María, Karen, Lorena, Uriel, Ale, Gaby y a todos los demás) que hicieron más amena la estancia en la universidad.

A Italia que me acompañó los fines de semana y a Emmanuel por los aventones que me daba a mi casa.

Dedicatoria

Quiero dedicar esta tesis especialmente a mis padres Reyna Francisco Lucas y Deonicio Flores Maldonado; por su amor, comprensión por tanto tiempo de aguantarme, soportar mis malos ratos que sin su apoyo no hubiera podido culminar una etapa más de mi vida académica, a mis hermanos Alberto y Lucero por su apoyo pero sobre todo porque los amo y saben que daría la vida si fuera necesario. A mis queridos abuelitos Juanita y Jacinto por su perseverancia.

Índice

Resumen	6
Introducción	7
1.1 Contaminación del suelo	7
1.2 Metales pesados	7
1.3 Cromo como elemento químico.....	8
1.4 Ciclo del cromo	9
1.5 Usos.....	11
1.6 Riesgos	12
1.7 Toxicidad para la salud	13
1.8 Bioestimulación	17
1.9 Donadores de electrones.....	18
1.10 Antecedentes.....	19
2. Justificación.....	23
3. Hipótesis.....	24
4. Objetivo general	25
4.1 Objetivos particulares	25
5. Material y métodos	26
5.1 Método.....	27
5.1.1 Tamizado de las muestras	28
5.1.2 Determinación del pH	28
5.1.3 Determinación de la concentración de Cr(VI).....	28
5.1.4 Bioestimulación con diferentes donadores de electrones, muestras de 46 y 35 cm de profundidad correspondiente al tercer muestreo 1/11/2012	29
5.1.5 Tercer experimento con melazas 30-40 cm de profundidad, cuarto muestreo 16/08/2013.	31
5.1.6 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	32
5.1.7 Extracción de DNA.....	32
5.1.8 Amplificación del Gen 16s rRNA	32
5.1.9 Clonación con TOPO TA	33
5.1.10 Análisis de secuenciación	35
6. Resultados y Discusión	36
6.1 Caracterización físico-química de las muestras empleadas.....	37
6.2 Bioestimulación con diferentes donadores de electrones.....	37
6.3 Bioestimulación con melaza.....	38
6.2 Efecto del pH en los estudios de bioestimulación	42

6.3 Determinación de azúcares de la melaza y como producto de su metabolismo por Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	42
6.4 Identificación de microorganismos presentes en los ensayos de bioestimulación por medio de la extracción de DNA.....	48
6.5 Amplificación del Gen 16S rRNA	49
6.6 Clonación del fragmento de PCR amplificado del 16s rDNA y secuenciación del inserto	50
7. Conclusiones	53
8. Perspectivas.....	54
Literatura citada.....	55
Anexos	62

Resumen

El cromo es altamente peligroso si se encuentra en estado de oxidación (VI) en comparación con el Cr(III) que es el más estable ya que es inmóvil e insoluble. El Cr(VI) ha sido catalogado como uno de los 17 productos químicos que presentan mayor amenaza para los seres humanos por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA). Para reducir el Cr(VI) a Cr(III) se realizaron ensayos de bioestimulación para estimular a los microorganismos nativos y mejorar así la biodegradación del contaminante en condiciones anaeróbicas se utilizaron diferentes donadores de electrones entre los que se encuentran son: acetato, lactato, melazas y mezcla entre estos donadores acetato-lactato y melaza estéril-lactato. En la reducción de Cr(VI) el donador de electrón que mostró más eficiencia fue la melaza estéril-lactato seguido de melaza pasteurizada; utilizando una concentración de lactato al 2 M y de melaza al 2%, la reducción se mostró a los 2 días con melaza estéril-lactato y a los 6 con melaza pasteurizada. Por caracterización molecular de la microbiota nativa se encontraron 3 géneros diferentes: *Paenibacillus borealis*, *Bacillus korensis* y *Desulfosporosinus lacus*. Son Gram positivas, formadoras de esporas y del Phylum de las *Firmicutes*; estas bacterias fueron resistentes a los altos contenidos de Cr(VI) y reductoras. Melaza resulta favorable para utilizarlo en la biorremediación, por su bajo costo y solubilidad en el suelo.

Palabras clave

Cr(VI), Cr(III), donadores de electrones, bioestimulación, melaza, toxicidad y reducción.

Introducción

1.1 Contaminación del suelo

La contaminación del suelo consiste en una degradación química que provoca la pérdida parcial o total de la productividad del suelo como consecuencia de la acumulación de sustancias tóxicas en unas concentraciones que superan el poder de amortiguación natural del suelo y que modifican negativamente sus propiedades. Esta acumulación se realiza generalmente como consecuencia de actividades humanas exógenas, aunque también se puede producir de forma natural o endógena cuando los procesos de edificación liberan elementos químicos contenidos en las rocas y los concentran en el suelo alcanzando niveles tóxicos. Un ejemplo de esto último lo tenemos en suelos muy cambiantes formados sobre rocas serpentinizadas con altos contenidos en metales pesados como el Cr, Ni, Cu y Mn, entre otros, que se concentran en los suelos a medida que la intensa edafogénesis produce el lavado de otros constituyentes esenciales como el Ca, Mg e incluso el Si. Conforme se desarrolla esta concentración residual metálica, estos elementos que inicialmente eran constituyentes no asimilables de los minerales primarios pasan a formas más activas, solubles y biodisponibles que influyen negativamente sobre la actividad biológica (Macías, 1993).

1.2 Metales pesados

Se llama metal pesado a aquel elemento que presenta una densidad superior a 5 g/cm^3 , aunque a efectos prácticos en estudios medioambientales se amplía esta definición a todos aquellos elementos metálicos o metaloides, de mayor o menor densidad, que aparecen comúnmente asociados a problemas de contaminación. Algunos de ellos son esenciales para los organismos en pequeñas cantidades, como el Fe, Mn, Cr, Zn, B, Co, As, V, Cu, Ni o Mo, se vuelven nocivos cuando se presentan en concentraciones elevadas, mientras que otros no desem-

peñan ninguna función biológica y resultan altamente tóxicos, como el Cd, Hg o el Pb.

Al hablar de contaminación por metales hay que tener en cuenta que más importante que el contenido total de un elemento en el suelo es la forma o especie química bajo la que se encuentra, es decir, su especiación (Mulligan, 2001).

En cualquier caso, es importante resaltar que los metales tóxicos en los suelos no pueden ser destruidos sino sólo neutralizados y que pequeñas variaciones en las condiciones del medio edáfico pueden liberar los metales anteriormente insolubilizados.

1.3 Cromo como elemento químico

El cromo es un elemento químico que se encuentra en el grupo 6, de la tabla periódica su símbolo es el Cr y su número atómico es el 24. Es un elemento común y ocupa el puesto 21 en abundancia entre los elementos de corteza terrestre; es muy resistente a la corrosión, tiene el nivel más alto de VI, aunque estos compuestos son muy oxidantes. Los estados de oxidación IV y V son poco frecuentes, mientras que los estados más estables son II y III. Su masa atómica es 51,996; su punto de fusión es de 1.857 °C, punto de ebullición es de 2.672 °C y su densidad 7,2 g/cm³. Este elemento fue descubierto por Louis Nicolás Vauquelin quien fue capaz de producir óxido de cromo mezclando crocoita con ácido clorhídrico (HCl). En 1798 descubrió que calentando el óxido de cromo (Cr₂O₃) en un horno de carbón podría aislar el cromo metálico y también se destacaron los rubíes y esmeraldas. Fue denominado “cromo” del griego chroma (color) por sus múltiples colores de sus compuestos (Devlin, 2004).

El Cr(VI) finalmente forma cromato (CrO₄²⁻), bicromato (HCrO₄⁻) y dicromato (Cr₂O₇²⁻) compuestos que son solubles en un amplio intervalo de pH. A la inversa, Cr(III) forma fácilmente óxidos e hidróxidos (tales como Cr(OH)₃) que son muy insolubles por encima de pH 5,5 (Rai *et al.*, 1987).

1.4 Ciclo del cromo

Lo más importante del ciclo de cromo en los suelos y en las aguas naturales son el Cr(III) y Cr(VI). Entre los enlaces más grandes son los vínculos que involucran procesos de movilización y oxidación de Cr(III) y la reducción de Cr(VI). Las diferencias son principalmente en la comprensión de los factores que controlan estos procesos. Si Cr(III) soluble se añade a un "promedio" del suelo, una parte de ella será inmediatamente oxidado por óxidos de manganeso a Cr(VI). El resto del Cr(III) puede quedar reducido durante largos períodos de tiempo, incluso en la presencia de aceptores de electrones óxidos de manganeso. Sin embargo, este Cr(III) está menos disponible y puede ser movilizado por bajos complejos orgánicos de peso molecular y luego se oxida en condiciones redox. Por lo general, cualquier Cr(VI) añadido a un suelo o sedimento se reduce instantáneamente, especialmente bajo condiciones ácidas. Por otra parte, las altas concentraciones de contaminantes de Cr(VI) puede agotarse rápidamente la potencia disponible de la reducción del material de matriz y el exceso de Cr(VI), la forma termodinámicamente estable en el aire, pueden persistir durante años en los suelos. La limpieza de la contaminación de cromo debe implicar tanto de Cr(III) y Cr(VI) con excesos de sustancias reductoras lentamente disponibles y sellar de forma permanente a partir de las entradas de oxígeno atmosférico (Bartlett, 1991; Dhal *et al.*, 2013).

Tanto la reducción como la adsorción pueden ocurrir simultáneamente en muchos suelos, no siempre es posible colocar la causa de la desaparición de Cr(VI) como de un lugar a otro. En comparación con la cinética de oxidación de (Amacher y Baker, 1982) encontró la cinética de Cr(VI) "reducción a ser sencillo y simple", pero más lenta que la oxidación. El cromo que queda de forma oxidada en un suelo y no es extraíble por 10 mM $(\text{KH})_{1.5} \text{PO}_4^{-3}$ a pH 7,2 se puede considerar inmovilizado, ya sea porque se ha precipitado o bien unido firmemente por adsorción. (Stollenwerk y Grove, 1985) explicó que la adsorción de Cr(VI) debe ser conducido por las cargas positivas en recubrimientos minerales de óxidos de hie-

rro, y (Aoki y Munemori, 1982) tal adsorción debe ser acompañado por la liberación de grupos OH^- .

Añadido cromato en el suelo y debido a que ya no existe en la forma oxidada, es decir, que puede haber sido reducida por donadores de electrones en el suelo o agua y después de ser adsorbido o precipitado formando Cr(III) . El Cr(III) es probable que sea un complejo con los grupos funcionales orgánicos que están implicados en su reducción (Bartlett y James, 1988). Los agentes oxidantes son mucho menos eficaces en soluciones neutras que en soluciones ácidas, donde ambos tienen una tendencia a persistir en lugar de reducirse.

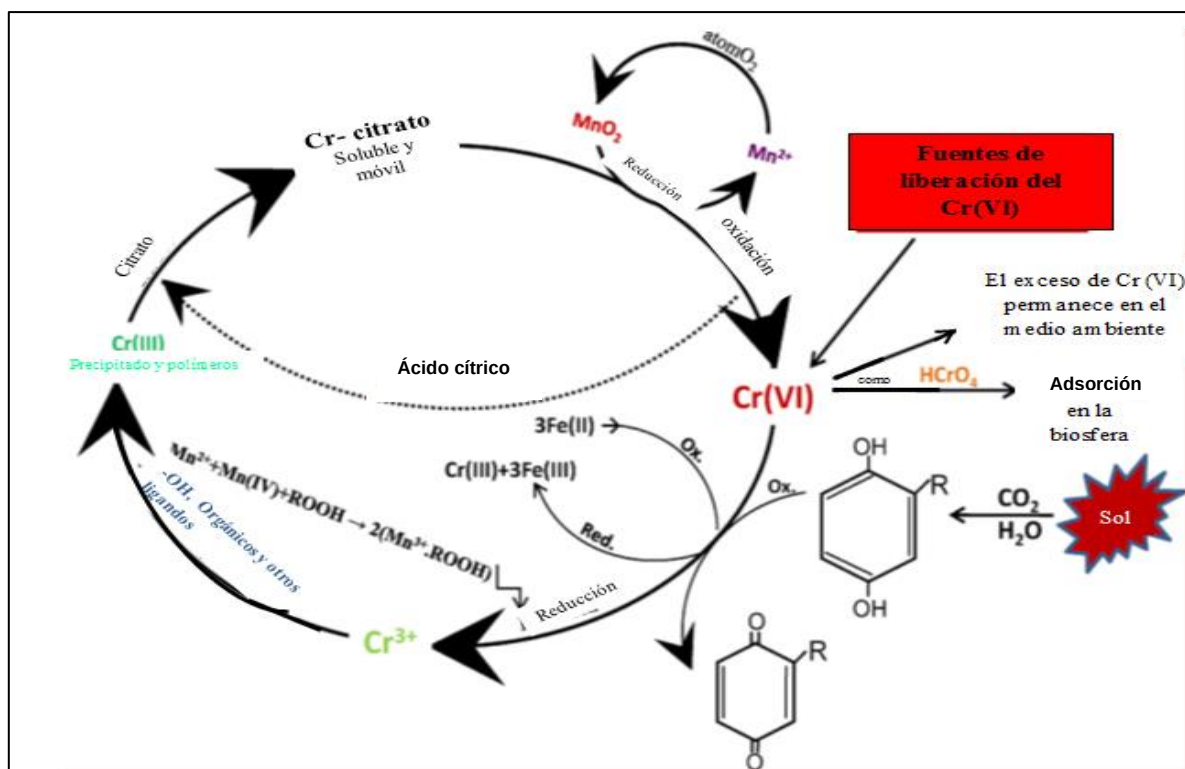


Fig. 1. Ciclo natural del cromo en el ambiente.
Modificado y tomado por (Dhal et al., 2013)

1.5 Usos

Los compuestos que contienen Cr(VI) se utilizan en muchos procesos industriales, entre los que cabe destacar: la fabricación de importantes pigmentos inorgánicos como los cromatos de plomo (también utilizados para preparar verdes de cromo), los naranjas de molibdato, el cromato de zinc y el verde de óxido crómico; la conservación de la madera; la fabricación de anticorrosivos y la fabricación de vidrios y esmaltes de color.

Los sulfatos crómicos básicos se utilizan ampliamente en los procesos de curtido.

Otros usos conocidos de los compuestos químicos de cromo son la estampación de telas, la preparación de numerosos catalizadores importantes que contienen óxido crómico y la producción de coloides dicromados sensibles a la luz para litografías.

El ácido crómico se utiliza no sólo para el cromado “decorativo”, sino también para el “duro”, con capas mucho más gruesas para obtener una superficie sumamente resistente con un bajo coeficiente de fricción.

De la potente acción oxidante de los cromatos en solución acidulada se derivan muchas aplicaciones industriales, especialmente con materiales orgánicos, como la oxidación del trinitrotolueno (TNT) para producir fluoroglucinol y la oxidación de la picolina para obtener ácido nicotínico.

El óxido de cromo se utiliza también para producir cromo metálico puro adecuado para su incorporación en aleaciones de alta temperatura resistentes al arrastre y como óxido refractario. Puede formar parte de numerosas mezclas refractarias, como las de magnesita y magnesita-cromita.

1.6 Riesgos

El cromo es esencial para la vida en cantidades traza, pero es altamente tóxico para la mayoría de los organismos a altas concentraciones (McLean *et al.*, 2000). Debido a una creciente variedad de usos comerciales y aguas residuales que son materiales derivados de la actividad industrial y de los residuos domésticos, los cuales por razones de salud pública no pueden ser vertidos a los cursos de aguas corrientes o lagos (Agarwal *et al.*, 2008). La concentración de Cr(VI) varía en los efluentes desde docenas a cientos de gramos o miligramos, la cantidad de aguas contaminadas con cromo que se vierten al ambiente varía de docenas a cientos de metros cúbicos por hora. Aún cuando internacionalmente las Concentraciones Máximas permitidas (MAC) en el ambiente son 0,1 mg/L de Cr (VI) y 0,5 mg/L de Cr (III) (Otiniano *et al.*, 2007).

La EPA ha establecido un límite de 100 µg/L en Cr (III) y de 50 µg/L de Cr (VI) en agua soluble. La Administración de Seguridad y Salud Ocupacional (OSHA) ha establecido los límites de 500 µg en agua soluble para el Cr(III) por m³ en aire (500 µg L⁻¹) y de 52 µg L⁻¹ de Cr(VI) de agua potable (Das y Singh, 2011).

Existe una NORMA Oficial Mexicana NOM-147-Semarnat/SSA1-2004, que establece los criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico (As), bario (Ba), berilio (Be), cadmio (Cd), cromo hexavalente (Cr(VI)), mercurio (Hg), níquel (Ni), plata (Ag), plomo (Pb), selenio (Se), talio (Tl) y/o vanadio (V). Ver tabla 1. De las concentraciones de referencias totales de Cr(VI).

Tabla.1. Concentración de metales pesados en uso industrial. Tomado de la NORMA Oficial Mexicana NOM-147-Semarnat/SSA1-2004

TABLA 1 Concentraciones de referencia totales (CR_T) por tipo de uso de suelo.		
Contaminante	Uso agrícola/residencial /comercial (mg/kg)	Uso industrial (mg/kg)
Arsénico	22	260
Bario	5 400	67 000
Berilio	150	1900
Cadmio	37	450
Cromo Hexavalente	280	510
Mercurio	23	310
Níquel	1 600	20 000
Plata	390	5 100
Plomo	400	800
Selenio	390	5 100
Talio	5,2	67
Vanadio	78	1000
NOTA: a. En caso de que se presenten diversos usos del suelo en un sitio, debe considerarse el uso que predomine. b. Cuando en los programas de ordenamiento ecológico y de desarrollo urbano no estén establecidos los usos del suelo, se usará el valor residencial.		

1.7 Toxicidad para la salud

Cr(VI) y Cr(III) difieren completamente en sus propiedades fisicoquímicas y la toxicidad (Ishibashi *et al.*, 1990). Cr(VI) es altamente mutagénico y carcinogénico (Costa, 1997; Nishioka, 1975; Wang *et al.*, 1990) ha sido catalogado como uno de los 17 productos químicos que presentan mayor amenaza para los seres humanos por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) (McCu-lough *et al.*, 1999). In-vivo, Cr(VI) debido a los resultados de la actividad de oxidación en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que a su vez provoca el daño oxidativo al DNA, proteínas y lípidos (Snow, 1992). En contraste, Cr(III) es escasamente soluble, más estable y por lo tanto menos tóxico en comparación con el Cr(VI) (Dinakarbandian *et al.*, 2004).

Genotoxicidad. Cr (VI) que contienen compuestos son genotóxicas y pueden inducir mutaciones genéticas, intercambios de cromatinas humanas y aberraciones cromosómicas.

Cr en su estado hexavalente Cr(VI), exhibe muy poca actividad biológica (es decir, la interacción con macromoléculas celulares) a concentraciones toxicológicamente relevantes. En condiciones fisiológicas, el Cr(VI) existe como un oxianión cromato y atraviesa la membrana celular a través de fosfato no específico y transportadores aniónicos de sulfato (Arslan *et al.*, 1987; Buttner y Beyersmann, 1985). Dentro de la célula, Cr(VI) se somete a la reducción metabólica rápida por el ácido ascórbico (Asc) y tioles de bajo peso molecular (Snow, 1992; O'Brien *et al.*, 2001; Quievryn *et al.*, 2001), incluyendo glutatión reducido (GSH) y cisteína (Cys). Otros reductores de Cr(VI) potenciales intracelulares incluyen la reductasa de citocromo P450 (Mikalsen *et al.*, 1991). Durante la reducción de Cr(VI), se genera una amplia gama de lesiones genéticas incluyendo monoaductos Cr-DNA, aductos ternario Cr-DNA, entrecruzamientos de DNA de la proteína (DPCs), aductos bifuncionales (enlaces cruzados de DNA (ICLs)), rompen solo una hebra (SSB) y las bases oxidadas. Algunas formas de causar daño el Cr, tales como el ICLs, que presentan barreras físicas a la replicación del DNA y transcripción, por lo tanto probablemente promueve el destino de la célula terminal como apoptosis o detención del crecimiento terminal. Otras lesiones, tales como aductos ternarios de DNA, son potencialmente pre-mutagénico. La exposición de Cr(VI) provoca una respuesta de daño en el DNA dentro de las células que incluyen la activación de la vía de señalización de p53 y la detención del ciclo celular o apoptosis Fig.2. Ciertos sistemas enzimáticos también pueden estar implicadas en el metabolismo intracelular de Cr(VI) (Shi *et al.*, 1999).

Dermatitis. Los compuestos de Cr(VI) ocasionan tanto irritación cutánea primaria como sensibilización. En la industria de producción de cromatos, algunos trabajadores pueden presentar irritación cutánea especialmente en el cuello y las muñecas, poco después de comenzar a trabajar con cromatos. Se ha demostrado que el Cr(VI) penetra en la piel a través de las glándulas sudoríparas, reduciéndose a Cr(III) en el corion. Se ha demostrado que este Cr(III) reacciona con las proteínas, formando complejos antígeno-anticuerpo. Esto explica la localización de las lesiones alrededor de las glándulas sudoríparas y por qué cantidades muy pequeñas de dicromato pueden producir sensibilización. El carácter crónico de la dermatitis puede deberse al hecho de que el complejo antígeno-anticuerpo se elimina más lentamente que si la reacción tuviera lugar en la epidermis.

Efectos respiratorios agudos. La inhalación de polvo o nieblas que contengan Cr(VI) produce irritación de las mucosas. A concentraciones elevadas, la aparición de estornudos, rinorrea, lesiones del tabique nasal y enrojecimiento de la garganta son efectos bien documentados. También se ha descrito sensibilización, que ha dado origen a crisis asmáticas típicas, que pueden repetirse en las siguientes exposiciones.

Ulceración del tabique nasal. Hace algunos años, cuando los niveles de exposición a los compuestos de Cr(VI) podía ser elevada, se observaban con frecuencia ulceraciones del tabique nasal en los trabajadores expuestos. Este efecto nocivo era resultado del depósito de partículas con Cr(VI) o pequeñas gotas de niebla en el tabique nasal, que producían úlceras en la parte cartilaginosa, seguidas en muchos casos de la perforación en el lugar de la úlcera. En estos casos, la costumbre de hurgarse la nariz puede favorecer la perforación. La mucosa que recubre la parte antero-inferior del tabique, también denominada área de Kiesselbach o de Little, es relativamente no vascularizada y está fuertemente adherida al cartílago subyacente. Se forman costras que contienen restos necróticos del cartílago del tabique y en una o dos semanas, se perfora éste. La periferia permanece en un estado de ulceración activa durante varios meses, en los que puede aumen-

tar el tamaño de la perforación. La curación se produce por la formación de tejido de cicatrización vascular. El sentido del olfato casi nunca se altera. Durante la fase activa, los síntomas más molestos suelen ser la rinorrea y la epistaxis. Si se cura correctamente, no suele dejar síntomas residuales y la perforación del tabique puede pasar desapercibida en muchos casos (Nordberg, 2013).

1.8 Bioestimulación

La bioestimulación implica la circulación de soluciones acuosas (que contengan nutrientes) a través del suelo contaminado, para estimular la actividad de los microorganismos autóctonos y mejorar así la biodegradación de contaminantes orgánicos o bien, la inmovilización de contaminantes inorgánicos *in situ* (Deuren *et al.*, 1997).

Aplicaciones. Se ha usado con éxito para remediar suelos contaminados por ejemplo en Hanford.

Limitaciones. Esta tecnología no es recomendable para suelos arcillosos, altamente estratificados o demasiado heterogéneos ya que pueden provocar limitaciones en la transferencia de O_2 otros factores que pueden limitar su aplicación, incluyen:

1. Que el tipo del suelo no favorezca el crecimiento microbiano.
2. Incremento en la movilidad de los contaminantes.
3. Obstrucción de los pozos de inyección provocada por el crecimiento microbiano.

Además, también puede incorporarse al suelo para estimular la biorremediación:

- Otros aceptores de electrones diferentes al O_2 ,
- Ácidos o bases para ajuste del pH,
- cometabolitos para activar ciertas enzimas,

→ etc.

Costos y tiempo de remediación. La limpieza de una pluma de contaminación, puede tomar varios años (Deuren *et al.*, 1997).

Los procesos biológicos se consideran amigables con el ambiente y son menos costosos (Losi *et al.*, 1994; Saleh *et al.*, 1989; Shannon y Unterman 1993).

1.9 Donadores de electrones

En la biosfera actual, los donadores de electrones más comunes son las moléculas orgánicas. Los organismos que usan moléculas orgánicas como fuente de energía son conocidos como organotrofos. Sin embargo, existen procariotas que son capaces de utilizar fuentes inorgánicas como fuente de energía y se les conoce por ello con el nombre de litotrofos. Estos donadores inorgánicos incluyen al hidrógeno (H_2), al monóxido de carbono (CO), el amonio (NH_4^+), el nitrito (NO_2^-) y el ion ferroso (Fe^{+2}). Los litotrofos se han observado creciendo en formaciones de rocas a centenas de metros bajo la superficie de la Tierra. El uso de donadores de electrones inorgánicos como fuente de energía es de particular interés en el estudio de la evolución. Este tipo de metabolismo tuvo que ser el predecesor de los actuales modelos de organotrofos (Nelson y Cox, 2005).

Para entender el mecanismo molecular por el cual se sintetiza el ATP, es necesario revisar el concepto de oxidación y reducción. Cuando se transfieren los electrones de un compuesto a otro, se dice que tiene lugar una reacción de óxido-reducción. En una reacción de este tipo hay que tener en cuenta lo siguiente:

- a) Se dice que se oxida el compuesto que pierde o dona electrones.
- b) Se dice que se reduce el compuesto que gana o acepta electrones.
- c) El compuesto que cede electrones es entonces reductor.

- d) El compuesto que recibe o acepta los electrones es entonces un agente oxidante.

En cualquier reacción de este tipo, el donador de electrones o reductor tiene una presión de electrones definida y el aceptor de electrones u oxidantes posee también determinada afinidad por los electrones. Tal capacidad para ceder electrones y la afinidad o capacidad para aceptarlos pueden medirse en términos de una fuerza electromotriz o potencial. Cada donador de electrones, bajo condiciones establecidas, tiene un potencial redox. Los donadores de electrones se pueden ordenar según su capacidad para ceder o recibir electrones. (Peña *et al.*, 1988).

1.10 Antecedentes

Se han realizado varios estudios para la reducción de Cr(VI) a menos tóxica Cr(III).

Romanenko y Koren'kov (1977); Saleh *et al.* (1989); McLean *et al.* (2000); Puzon *et al.* (2002); Díaz *et al.* (2008); Han enfocado sus estudios en la biotransformación microbiana de Cr(VI) a menos tóxico Cr(III) a través de la reacción enzimática directa o indirectamente de metabolitos. La reacción enzimática de cromato se produce tanto en condiciones anaeróbica, así como condiciones aeróbicas y funcionan generalmente bajo condiciones de pH.

Myers *et al.* (2000); Shen y Wang (1993); Wang *et al.* (1990). Para la reducción de Cr(VI) se han cultivadas bajo condiciones anaeróbicas *Escherichia coli*, *Shewanella putrefaciens* y *Enterobacter cloacae*.

Garbisu *et al.* (1998); Ishibashi *et al.* (1990); Puzon *et al.* (2002); Clark (1994); González *et al.* (2003), (2005); Kwak *et al.* (2003); Mazoch *et al.* (2004); Suzuki *et al.* (1992). Se ha realizaron estudios en donde determinan que las Oxi-dorreductasas cataliza la reducción del Cr(VI) por medio de bacterias. Ejemplos

de tales enzimas incluyen, reductasas quinona, reductasas *CSCR-3* de hierro, nitró-reductasas, reductasas flavina y varios NADH/NADPH-dependientes y reductasas de función desconocida.

González *et al.* (2005). La mayoría de los estudios se ha centrado en el aislamiento, caracterización y aplicación de bacterias para la reducción de Cr(VI).

Rehman *et al.* (2008). Informaron que *Bacillus sp.* fue encontrado para reducir el 91% de 100 mg de Cr(VI)/L después de 96 h en medio de crecimiento.

He *et al.* (2009). Aislaron *Ochrobactrum sp.*, que se encontró que reducía 100 mg de Cr(VI)/L. Desde la estrategia de la biorremediación de Cr (VI) implica su reducción a Cr(III), sería apto para emplear mediadores redox para acelerar el proceso de electrones y transferir a Cr(VI).

Recientemente, Zee y Cervantes, (2009); Fredrickson *et al.* (2006). han examinado el impacto de la quinona y varios compuestos viológeno (conocido por actuar como mediadores redox) en la biotransformación redox de contaminantes. Los mediadores redox han demostrado que acelera la velocidad de degradación reductiva de electrones para retirar recalcitrantes mientras que en ciertos casos tales como el Fe(III), U(VI), Tc(VII) han sido necesario como requisito previo para la iniciación de su biodegradación.

Tapia *et al.* (2002) propuso una metodología para disminuir la concentración de Cr(VI) presente en efluentes de curtiembre sin tratamiento previo. La propuesta se basa en un proceso fotocatalítico donde se irradia el efluente por un determinado tiempo con luz ultravioleta en presencia de óxido de titanio como catalizador, empleando como agente reductor formaldehído. Se utilizó sistemas modelo de soluciones de Cr(VI) de 100 mg/L a distintos pH con diferentes cantidades de catalizador y tiempos de irradiación.

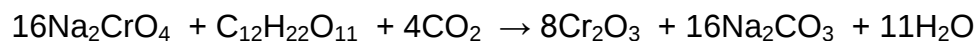
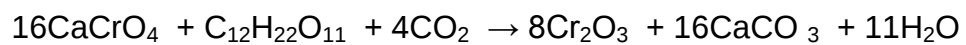
Amacher y Baker (1982). Demostró que la reducción de Cr(VI) por materia orgánica natural en el suelo fue una reacción de primer orden con una vida media de varias semanas. Reducción del cromo por sustancias húmicas del suelo y el agua consume hidrógeno y en consecuencia se ve favorecida por las adiciones de ácido. En los suelos naturales, la reducción puede ser extremadamente lenta, que requieren años (Bartlett,1987).

Datos experimentales indican Suzuki y Fukuda (1990); Standeven y Wetterhahn (1991); Standeven y Wetterhahn (1992); O'Brien *et al.* (2001); Quievryn *et al.* (2001, 2002). Fuertemente que el ascorbato es el agente más importante para la reducción de Cr(VI) en los tejidos diana.

Jeyasingh y Ligy (2005). La biorremediación de Cr(VI) se estudió en condiciones anaeróbicas con una concentración inicial de 50 mg/l a 400 mg/l. Se adicionó 10 ml de Medio mineral que contenían 10, 15, 20, 30, 40 mg/l de melaza. La reducción óptima de melazas fue con 34 mg/g de suelo. Terminando de reducir a los 20 días en condiciones anaeróbico.

Krishna y Ligy Philip (2005). Emplearon un sistema de biorreactor-biosorción para evaluar la remediación. Los estudios de reducción de Cr(VI) se llevaron a cabo bajo condiciones anaeróbicas. El efecto de diversos donadores de electrones en la reducción de Cr(VI); peptona y melaza mostraron la máxima reducción. Se observó más de 80% de reducción de Cr(VI) con una concentración de 50 mg/L en 8 h. El efecto del pH fue significativo para la reducción del Cr(VI) con un rango de 4 a 10.

Wang *et al.* (2007) estudiaron el efecto de la temperatura, se investigaron las dosis de agentes reductores y el tiempo sobre la reducción de Cr (VI). Por encima de 500 °C Cr(VI) puede ser completamente reducido a Cr(III) en 12 minutos. En donde la reducción de Cr(VI) por sacarosa está representada por las siguientes ecuaciones:



De acuerdo a estas ecuaciones 1 mol de sacarosa reduciría 16 moles de Cr(VI), es decir, 1g de Cr(VI) necesita 0,41 g de sacarosa. En realidad, el mecanismo de reacción puede variar con el aumento de la temperatura y tiempo de reacción.

2. Justificación

La contaminación del suelo consiste en una degradación química que provoca la pérdida parcial o total de la productividad del suelo como consecuencia de la acumulación de sustancias tóxicas, tal es el caso de metales pesados como lo es el Cr que es un elemento altamente tóxico si se encuentra en estado de oxidación Cr(VI). Por tal motivo es importante realizar un estudio de bioestimulación que nos permita reducir el Cr(VI) transformándolo a Cr(III) que es el más estable a través de bacterias reductoras o resistentes entre los microorganismos que se encuentran son: *Pseudomonas synxantha*, *Geobacter sp*, *P. fluoresceens*, *Streptococcus lactis*, *Enterobacter cloacae*. Con este ensayo se podrá aumentar la eficiencia de reducción que nos permita emplearlo en la biorremediación de suelos contaminados.

3. Hipótesis

Tomando en cuenta la gran diversidad metabólica presente en los microorganismos y su capacidad para adaptarse a condiciones extremas (altas concentraciones de metales pesados Cr(VI) específicamente), la bioestimulación con diferentes donadores de electrones, nos permitirá encontrar bacterias resistentes y/o reductoras que podamos emplear en estudios de biorremediación

4. Objetivo general

Llevar a cabo la bioestimulación y el aislamiento de microorganismos que nos permita identificar bacterias resistentes y/o reductoras de Cr(VI) para su empleo potencial en biorremediación.

4.1 Objetivos particulares

1. Evaluar la reducción del Cr(VI) con diferentes donadores de electrones en muestras de sedimentos contaminados.
2. Analizar la resistencia que tienen las bacterias para reducir el Cr(VI).
3. Realizar el aislamiento de DNA ambiental de los sitios con altas concentraciones de Cr(VI) y amplificación del gen 16S RNA obteniéndose posteriormente su secuencia nucleotídica.
4. Hacer análisis comparativos para inferir que organismos se encuentran presentes en los estudios de bioestimulación con los diversos donadores de electrones probados.

5. Material y métodos

Las muestras se obtuvieron de un sitio de deposición de residuos en San Francisco del Rincón situada en la región I, a los $101^{\circ} 51' 36''$ al oeste del meridiano de Greenwich y a los $21^{\circ} 01' 22''$ latitud norte. El área del territorio municipal comprende 422 Km^2 , equivalentes al 1.40 % de la superficie total del estado de León Guanajuato.

Tomando muestra a diferentes profundidades; 35, 46 y 30-40 cm para su análisis.



Fig. 3. Mapa de la zona de muestreo

5.1 Método

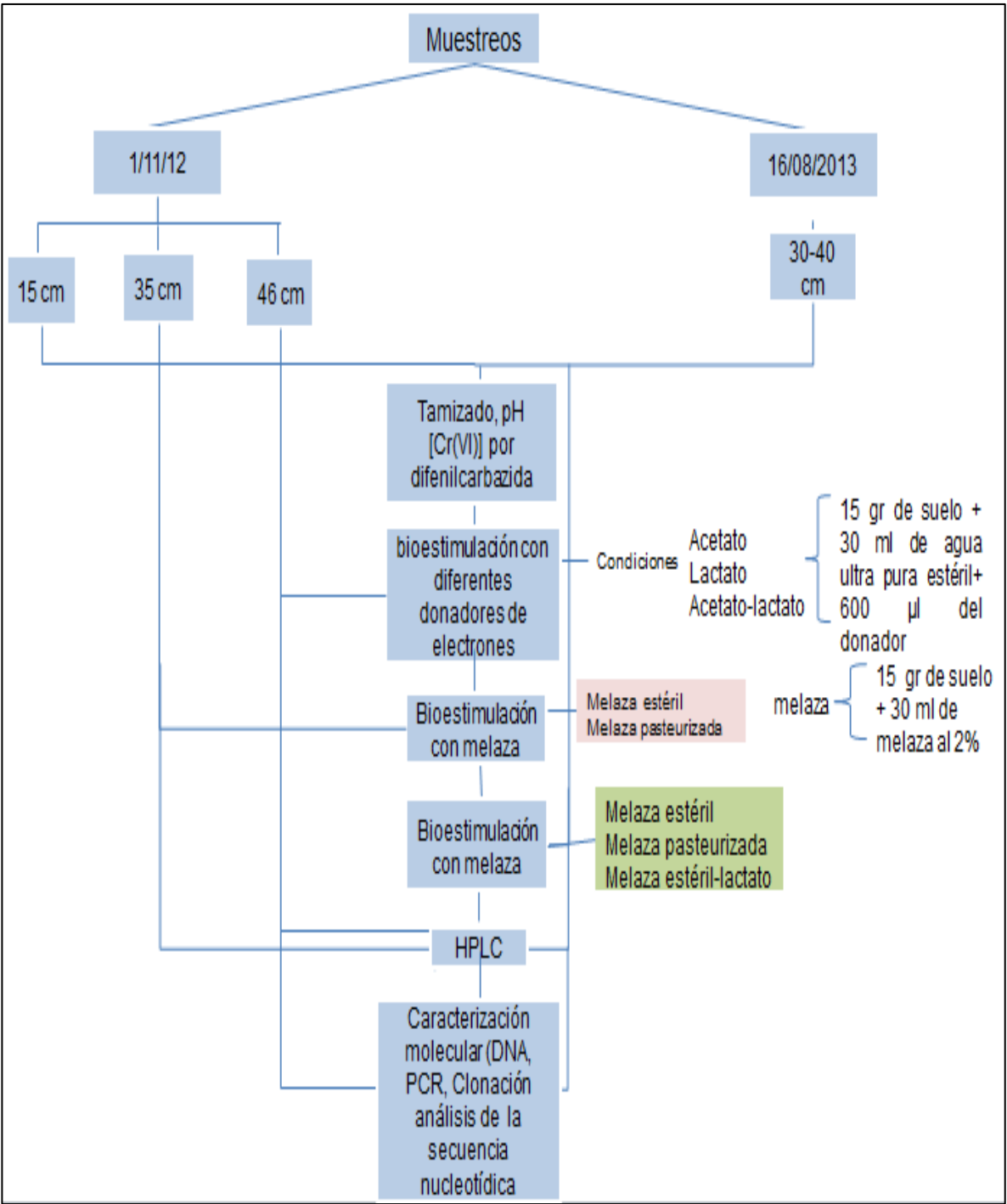


Fig. 4. Organigrama

5.1.1 Tamizado de las muestras

Se tomó una pequeña cantidad de muestra de suelo para tritararlo con el mortero una vez realizado se pasó por un tamizado (malla núm. 20) para obtener una arena fina.

5.1.2 Determinación del pH

Se peso 2g de suelo para las diferentes profundidades de (35 cm, 46 cm y 30- 40 cm); aforando con 20 ml de agua ultra-pura se eligió esta agua porque el pH es neutro que se necesita para analizar la alcalinidad o acides del suelo y no influya la presencia de electrones. Se puso en agitación por 120 rpm durante 1 hora y dejando reposar 1 hora para después tomar el pH con el potenciómetro.

5.1.3 Determinación de la concentración de Cr(VI)

Para las determinaciones de Cr(VI) presentes en las muestras, se pesó 1 gr de suelo agregando 50 ml de agua ultra-pura para las diferentes profundidades y por duplicado dejando en agitación a 120 rpm durante una noche para su posterior análisis. Se analizó por espectrofotometría empleando el método de la difenilcarbazida ($\lambda=540$ nm) (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 1992). Utilizando un espectrofotómetro marca Beckman Coulter DU 730 Life science UV/Vis spectrophotometer.

5.1.4 Bioestimulación con diferentes donadores de electrones, muestras de 46 y 35 cm de profundidad correspondiente al tercer muestreo 1/11/2012

Los experimentos se realizaron a diferentes profundidades de suelo para ver la mayor eficacia de reducción de los donadores de electrones.

Primer experimento con 46 cm de profundidad

Para la bioestimulación se esterilizaron 27 frascos con una autoclave que se utilizaron para realizar los ensayos con diferentes donadores de electrones (acetato, lactato, acetato-lactato, melazas y sin donadores de electrones). Se pesó 15 gr de suelo (46 cm de profundidad) para cada uno de los frascos por triplicado para cada donador de electrón y un grupo control con su triplicado pero con los 15 gr de suelo estéril; para asegurar que las bacterias no crezcan y triplicado sin donadores de electrones. Adicionando 30 ml de agua ultra-pura estéril excepto las 6 botellas que se utilizaron con las melazas se les adiciono los 30 ml de melaza al 2% ya preparada utilizando para la preparación agua estéril y pasteurizada.

El primer día de burbujeo se redujo el oxígeno a las muestras que llevaran (acetato, lactato y sin donadores de electrones) cabe mencionar que aún no se les inyecta los donadores de electrones hasta dejarlo en reposo y solubilización del Cr(VI) durante 48 horas; se tapó con un tapón de caucho estéril una vez tapados se les puso una cánula y un filtro de 0.22 μm para asegurarnos que el paso de CO_2/N_2 sean estériles usando una estación de gaseo con tres tipos de gases: H_2 , CO_2 y el N_2 ; dejando pasar 2 veces el hidrógeno durante 5 minutos para corroborar que no exista el paso de oxígeno después de ese tiempo se cierra el paso de hidrógeno y se abre el paso de CO_2/N_2 proporción de (80:20); dejando burbujeando 60 minutos en líquido y 20 minutos en gas (cánula fuera del líquido). Posteriormente de las 48 horas se les inyectó 600 μl de donadores a los frascos que llevaran acetato y lactato al 2 M, menos a los que son sin donadores de electrones

enseguida se empezó a tomar el tiempo (0) para medir la reducción de Cr(VI) por el método de difenilcarbazida y el pH; repitiendo este paso cada semana durante 42 días.

El siguiente día se pusieron a burbujear las muestras que llevaran acetato-lactato y melaza siguiendo el mismo método que con los demás pero sólo en las muestras de melaza se tomó el tiempo desde el primer día del burbujeo debido a su color, midiendo su reducción y pH cada 72 horas por 18 días. Enseguida con las muestras de acetato-lactato se dejó reposando 48 horas para la inyección de 300 µl de acetato y 300 µl de lactato al 2 M midiendo también su reducción y el pH. Con los donadores de acetato, lactato, acetato-lactato y sin donadores de electrones se tomaba muestra cada 7 días durante 42 días.

En todo el periodo de muestreo las botellas fueron incubadas en un incubador imperial III a una temperatura a 29-30°C.

De las muestras se tomó 1 ml depositándolo en tubos eppendorf centrifugando a 10000 rpm durante 10 minutos, para un posterior análisis. Luego se tomaron 20 µl para medir el pH efectuando diluciones a la -10 tomando 50 µl de los tubos eppendorff llevándolo a 500 µl de agua y de esta dilución se llevó a la -100. Todas las diluciones y las muestras tomadas en tiempo real se congelaron hasta realizar la reducción Cr(VI).

Las determinaciones de Cr(VI) presentes en las muestras, fueron analizadas por espectrofotometría empleando el método de la difenilcarbazida ($\lambda = 540 \text{ nm}$).

Segundo experimento 35 cm de profundidad

En el ensayo de la melaza se puso triplicado con melaza pasteurizada, melaza estéril y controles una con melaza pasteurizada y suelo estéril, otro con me-

laza estéril y suelo estéril. El muestreo se realizó cada 48 horas. Luego del tiempo cero; sólo se tomó muestra de los tubos A; para evitar que a los demás les entrara oxígeno y no se viera la reducción. Todas las muestras fueron incubadas en un incubador imperial III durante el tiempo de bioestimulación con una temperatura de 30°C. Se realizaron las mismas diluciones que en el primer ensayo sólo para los primeros tiempos de muestreo después fue variando hasta que llegó el momento de no hacer diluciones y tomar directamente de la botella 350 µl de muestra para hacer el análisis de difenilcarbazida.

5.1.5 Tercer experimento con melazas 30-40 cm de profundidad, cuarto muestreo 16/08/2013.

Se realizó otro ensayo de bioestimulación con otro diferente muestreo a la de los demás ensayos y diferente profundidad. Los tiempos de reducción de oxígeno fueron los mismos que en el segundo ensayo, los controles fueron triplicados con melaza pasteurizada, melaza estéril y melaza estéril-lactato; cada uno con su control negativo es decir con el suelo estéril. El muestreo se realizó cada 48 horas por 14 días, en el tiempo cero se tomó muestra antes de hacer la reducción de oxígeno esto se realizó para evitar por completo que después del burbujeo no existiera la posibilidad de que les entrara oxígeno a las muestras. También se realizó diluciones a la -100 para el tiempo cero y para el tiempo 2; con los posteriores muestreos sólo se tomó muestra directamente de la botella, hasta llegar a los 14 días en donde se tomó 500 µl directamente para determinar por el método de difenilcarbazida. Las muestras fueron incubadas en un incubador imperial III durante el tiempo de bioestimulación con una temperatura de 30°C.

5.1.6 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

En el análisis de la cromatografía sólo se determinó con el mejor donador de electrón que permitió la reducción de Cr(VI) en menor tiempo de cada experimento a diferentes profundidades; determinando la composición y separación de las macromoléculas de cada muestras considerando el tiempo de retención que el soluto permanece en la columna midiendo desde el momento de la inyección hasta la elusión del pico máximo importante para la identificación de los solutos. Con una temperatura de 40 °C y una presión de más de 1700 libras usando H₂SO₄ 5 mM para la fase móvil; utilizando una columna BIO-RAD HPLC Organic Acid Analysis Column, 300 mm x 7.8 mm, catalog 125-0140, serial No 427836.

5.1.7 Extracción de DNA

Efectuando extracciones de DNA de los ensayos de bioestimulación usando el PowerSoil DNA Isolation Kit (Mobio, West Carlsbad, CA, EE.UU.) según las recomendaciones del fabricante. Confirmada en un gel de agarosa y teñido con bromuro de etidio. Para la extracción de DNA ambiental se realizó de varias formas utilizando protocolos caseros, usando nitrógeno líquido para la lisis celular, carbón activado para adsorber la concentración de Cr(VI).

5.1.8 Amplificación del Gen 16s rRNA

El 16s se amplificó a partir de los DNA extraído mediante el kit Power-soil MO-Bio. Empleando los oligonucleótidos universales FD1 Secuencia (5'→3'): TCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG y RD1 Secuencia (5'→3'): CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC que amplifican una única región de 1542 pb y que se ha visto que son efectivos amplificando bacterias de diversos grupos. En la tabla 2. Se muestran las condiciones del termociclador.

Tabla 2. Condiciones del termociclador.

Desnaturalización	94 °C	3 min	1 ciclo
- Desnaturalización	94 °C	1 min	5 ciclos
- Hibridación	40 °C	1:30 min	
- Elongación	72 °C	1:30 min	
- Desnaturalización	94 °C	0.45 s	25 ciclos
- Hibridación	45 °C	1:30 min	
- Elongación	72 °C	1:30	
Elongación	72 °C	10 min	1 ciclo

5.1.9 Clonación con TOPO TA

Para clonar un fragmento de DNA amplificado mediante PCR y estudiar su expresión génica bajo condiciones controladas. Básicamente, se trata de insertar el DNA amplificado mediante PCR (DNA inserto) en un plásmido apropiado (DNA vector) un proceso denominado ligación, previa linearización (digestión).

Para que esta construcción del DNA persista y se amplifique es necesario introducirla en un hospedador apropiado, como *E. coli* que previamente se ha hecho “competente” para favorecer la entrada del DNA y finalmente poder seleccionar aquellas células portadoras del DNA utilizado en el proceso.

Primero se purifico el producto del PCR cortando banda y pasando por una columna de PCR de la muestra de bioestimulación con melazas pasteurizadas después de 6 días y 18 días del tercer muestreo 46 cm de profundidad, con melaza estéril-lactato fue a los 103 días de ser reducido el metal pesado del cuarto muestreo a los 30-40 cm de profundidad. Después se volvió a correr un gel de agarosa para verificar que el producto no se haya perdido.

En la ligación se requieren como sustrato dos extremos de DNA; un extremo 5' (portador de un grupo fosfato) y un extremo 3' (grupo hidroxilo de la desoxirribosa). La reacción se produce a partir de sustratos de doble cadena (dsDNA). La ligasa puede unir tanto extremos romos como extremos cohesivos. Poniendo a ligar: 4 µl del producto de PCR ya purificado, 1µl de solución de ligación diluida al 1/10 y 0.8 µl de TOPO dejando toda la noche ligando a -20 °C.

Efectuando una transformación por electroporación: aplicando una diferencia de potencial relativamente grande (para generar los orificios) en tiempos muy cortos (para no matar las células). Poniendo en hielo las células competentes *E. coli* XL1-blue a las que se les pondrá el inserto, producto de la ligación, columnas limpias, ependorf rotulados. En campana se agregó los 5.8 de la ligación a células competentes. Agregar a la celda con cuidado para que no haya burbujas, dar unos golpecitos meter con tapa dar el pulso con el (electroporador) si en la pantalla no aparece Arquea quiere decir que el choque estuvo bien. Agregar 900 µl de SOC a la celda y con eso mismo enjuagar, pasar a tubo de ensaye con tapa estéril. Poner cultivo a 37 °C en agitación con termomix durante 1 hora; es importante no rebasar este tiempo porque las células pueden dividirse después de ese tiempo. Plaquear 100 µl y 900 µl en placas LB con Kanamicina a una concentración de (km 30 µg/ml) que las células codifican resistencia para este antibiótico, isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG 25 µg/ml) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido (X-Gal 25µg/ml); los 900 µl fue centrifugado dejando solo el sobrenadante, incubando a 37 °C toda la noche después de este tiempo se seleccionó las colonias blancas ya que son las únicas que se consideran que tienen el inserto del plásmido y se vuelve a resembrar en medio LB líquido con el antibiótico deseado en este caso es la km con una concentración final de 30 µg/ml; se deja incubando a 37 °C toda la noche con agitación; después de este proceso se vuelve a recuperar a la célula en medio LB con el antibiótico y se toma 500 µl de medio con las células para ponerlas en glicerol al 30% para su conservación. El resto del medio es utilizado para la purificación del plásmido por el método de High Pure Plasmid Isolation Kit de Roche.

Las muestras que sí tuvieron el inserto se mandaron a secuenciar en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, usando cebadores de referencia; ver tabla 3.

Tabla.3. Características de los cebadores.

Cebador			Secuencia	Suministro en pMoles
M13	Adelante	(-20)	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'	407
M13	Inverso		5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	385

5.1.10 Análisis de secuenciación

Los alineamientos de las secuencias se realizaron con el programa DNA Baser v3.5.1 (Heracle BioSoft S.R.L.), utilizando los electroferogramas que muestra la secuencia de datos producida por una máquina automática de secuenciación de ADN para permitir los alineamientos que fueron para forward 5' y reverse 3', limpiando las regiones de baja calidad en las secuencias, eliminando la secuencia del vector y de los primer, corrigiendo automáticamente las ambigüedades. Después del ensamblaje de la secuencia, teniendo híbridos de ambos extremos se realizó un alineamiento con la base de datos del NCBI que es el Centro Nacional para la Información Biotecnológica es parte de la Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos y con el programa Blastn se comparó secuencias de nucleótidos problema contra una base de datos de secuencias de nucleótidos.

6. Resultados y Discusión

Para llevar a cabo este estudio se tomaron muestras de diferentes muestreos de la zona contaminada y a diferentes profundidades, a continuación se muestra un diagrama de las muestras tomadas Fig.5.

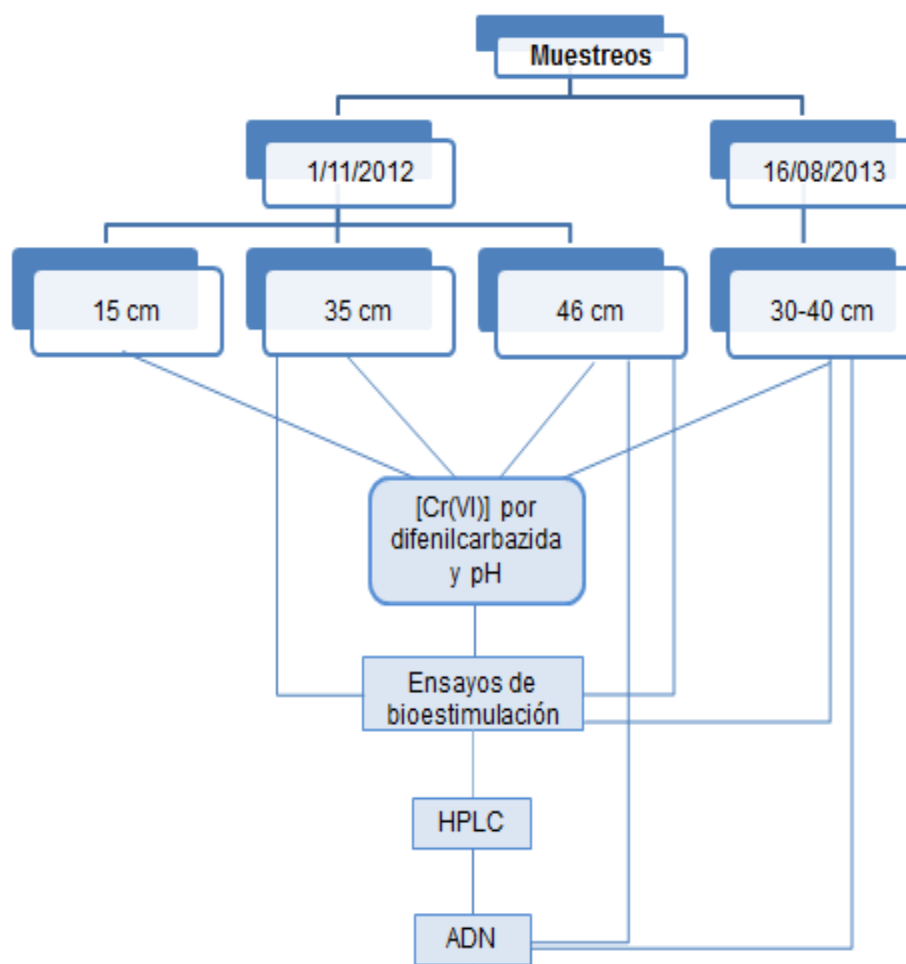


Fig.5. Esquema del tipo de muestras analizadas.

6.1 Caracterización físico-química de las muestras empleadas

Las muestras de las diferentes profundidades de suelo tuvieron un pH antes de ser bioestimulada con los diversos donadores de electrones de 8–11 indicando alcalinidad a diferentes profundidades de 15, 35, 46 cm del tercer muestreo y 30-40 cm del cuarto muestreo. Con una concentración de Cr(VI) en suelo para las diferentes profundidades ver tabla 4.

Tabla. 4. Concentración y pH de Cr(VI) en un suelo contaminado.

Profundidades	[Cr(VI)] en suelo ppm (mg/kg)	pH
15 cm	1178.86	8.3
35 cm	1189	9.5
46 cm	940.66	8.6
30-40 cm	1169.06	10.6

Como se puede observar este tipo de suelos y/o residuos tiene un pH alcalino. En otra fase del proyecto donde se aislaron muestras del acuífero no ha habido un cambio de pH.

6.2 Bioestimulación con diferentes donadores de electrones

En la bioestimulación sólo se consideró la menor concentración de Cr(VI) y la más alta concentración de cromo; utilizando 2 diferentes profundidades de suelo (35 cm y 46 cm) del tercer muestreo y del cuarto muestreo la profundidad de (30-40 cm).

Los donadores de electrones estudiados en estos ensayos son moléculas orgánicas que los microorganismos lo utilizan como fuente de energía. En el pri-

mer estudio de bioestimulación no hubo reducción de Cr(VI) a Cr(III) usando acetato, lactato y acetato-lactato como donador. Por lo que pudo haber influido la entrada de oxígeno. Ver Fig. 6. Ya que se han realizado estudios en los que se ve que el oxígeno es un aceptor de electrones que compiten con metales cuando estos son empleados como aceptor de electrones (Madigan, Martinko y Parker, 2003). También depende de las condiciones del suelo que permita una reducción como por ejemplo los trabajos realizados en Hanford en donde si ven una reducción con lactato.

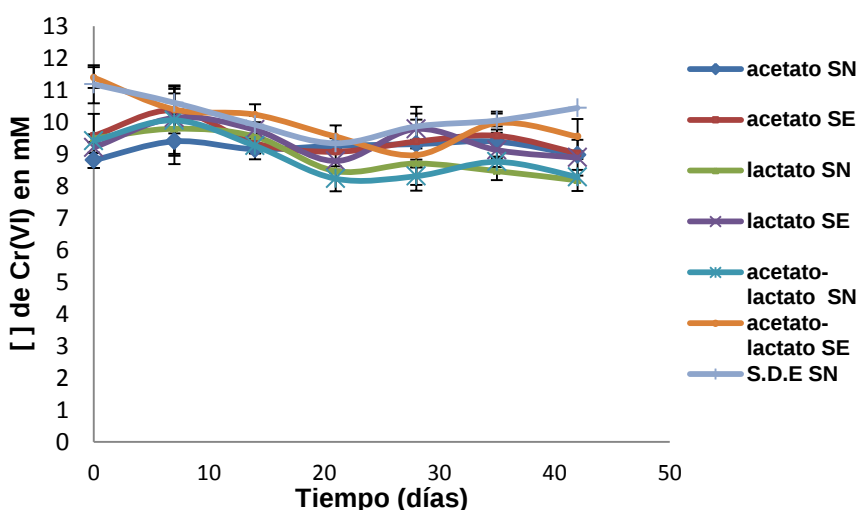


Fig.6. No se observa reducción de Cr(VI) con los donadores de electrones, 46 cm de profundidad tercer muestreo.

6.3 Bioestimulación con melaza

La melaza se ha usado por que es una fuente de carbono y de energía que tiene una alta solubilidad y es representativo del tipo de sustratos de residuos secundarios que pueden estar disponibles para minimizar el costo a largo plazo (por ejemplo, residuos de hidratos de carbono). El uso de la melaza es una alternativa de bajo costo y alta efectividad para la bioestimulación a escala de campo

(Arcadis, 2009) y ha mostrado resultados favorables para apoyar la biorremediación anaeróbica (Borden y Rodríguez, 2006; Gemoets *et al.*, 2003).

En nuestro grupo decidimos probar la melaza en una concentración al 2%, usando melaza pasteurizada. Como se puede observar en la Fig.7. se observa una reducción favorable a los 6 días partiendo de una concentración de 10.3 mM de Cr(VI). La mayoría de la reducción del Cr(VI) ocurrió durante la fase exponencial (Smith *et al.*, 2002). Por lo tanto los microorganismos nativos del suelo junto con la melaza pasteurizada están llevando a cabo la reducción biótica. Como control se puso el suelo estéril para comprobar que no existiera una reducción abiótica y como se puede ver no hay una reducción del Cr(VI).

Estos resultados indican que los microorganismos pueden crecer usando diferentes rutas metabólicas, pero que sólo algunas de estas vías catalizan la reducción de Cr(VI). Por otra parte, algunos de los miembros del consorcio podrán ser reductores de Cr(VI) siendo mucho más activas que otras dependiendo de la fuente de carbono y energía empleada. Los cambios en la fuente de carbono y energía empleada pueden conducir a cambios en la preponderancia de la reducción Cr(VI) (Smith *et al.*, 2002).

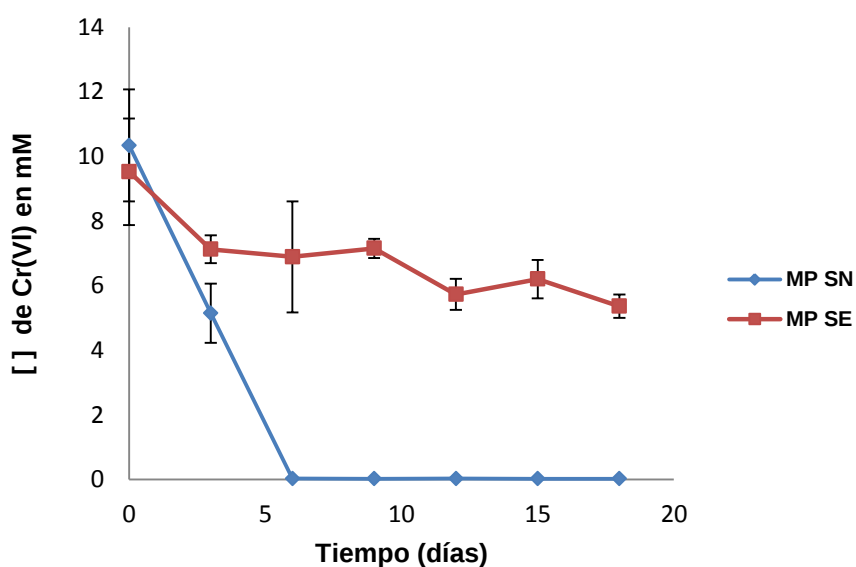


Fig.7. Se muestra la reducción de Cr(VI) a los 6 días de ser bioestimulada. Muestra de suelo de 46 cm tercer muestreo.

En la bioestimulación con otra profundidad de 35 cm del tercer muestreo. Es importante mencionar que se puso melaza estéril (pasada por la autoclave) para asegurarnos que en la melaza no existiera algún microorganismo vivo y la reducción del metal fuera por los microorganismos nativos. En la Fig. 8. muestra una reducción con melaza pasteurizada y con melaza estéril. Los microorganismos nativos del suelo juntos con los de la melaza pasteurizada están llevando a cabo una reducción de Cr(VI) más rápida partiendo de una concentración inicial de 11.60 mM redujo el metal en 6 días siguiendo la misma tendencia que la del primer ensayo con 46 cm de profundidad. Con la melaza estéril también se observa una reducción a los 10 días de estar muestreando partiendo de una concentración inicial de 10.97 mM indicando que los microorganismos del suelo y la materia orgánica de la melaza reduce el Cr(VI) comparando con lo que dijo (Amacher y Baker, 1982) pero tal reducción es más lenta porque solo las bacterias del suelo están llevando este proceso.

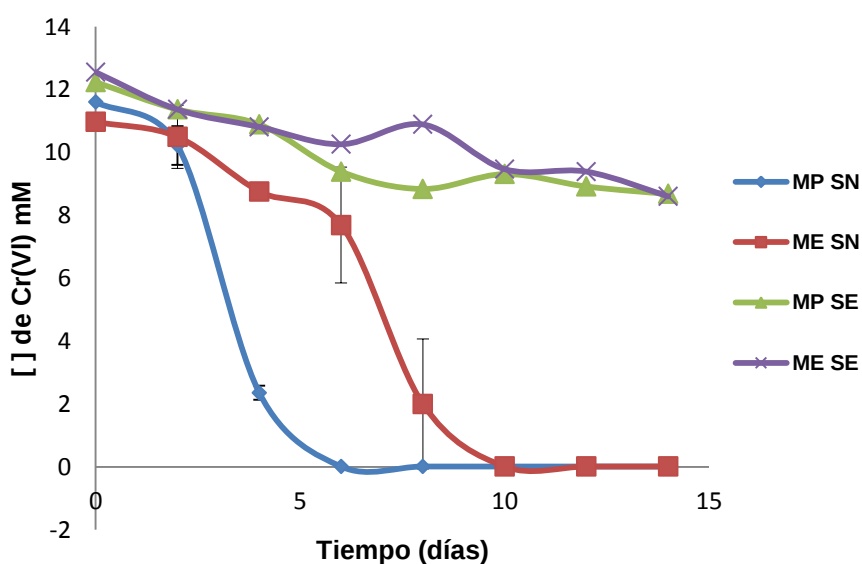


Fig. 8. En esta gráfica se observa la reducción de Cr(VI), utilizando melaza pasteurizada y estéril. Con melaza pasteurizada a los 6 días se muestra una reducción de Cr(VI) a una concentración final de 0.009 mM y con melaza estéril a los 10 días con una concentración final de 0.010 mM; en comparación con los controles negativos. Muestra de suelo de 35 cm tercer muestreo.

Existen reportes donde combinan varios donadores de electrones con el fin de bioestimular diferentes grupos de microorganismos con metabolismos distintos (Field *et al.*, 2013), es por esto que se decidió posteriormente combinar la melaza con otra fuente donadora de electrones, en este caso se empleó el lactato, ya que se tienen reportes donde el lactato es reductor de metales pesados (Hazen *et al.*, 2007) como se observa con la muestra de suelo 30-40 cm de profundidad tomada durante el cuarto muestreo que es en donde se realizarán los ensayos pilotos ya en campo. Melaza estéril-lactato tuvo una reducción a los 2 días del muestreo con una concentración inicial de 8.48 mM hasta llegar a los 14 días con .003 mM. Sin embargo con los demás controles también se observa una reducción seguida de la melaza pasteurizada que fue producto de la biomasa establecido también por (Sleep *et al.*, 2005; Yang, 2000 y McCarty, 1975, 2000). Melaza estéril con el suelo sin esterilizar la reducción fue a los 4 días; pero también se muestra una reducción a los 6 días con melaza pasteurizada y el suelo estéril Fig. 9.

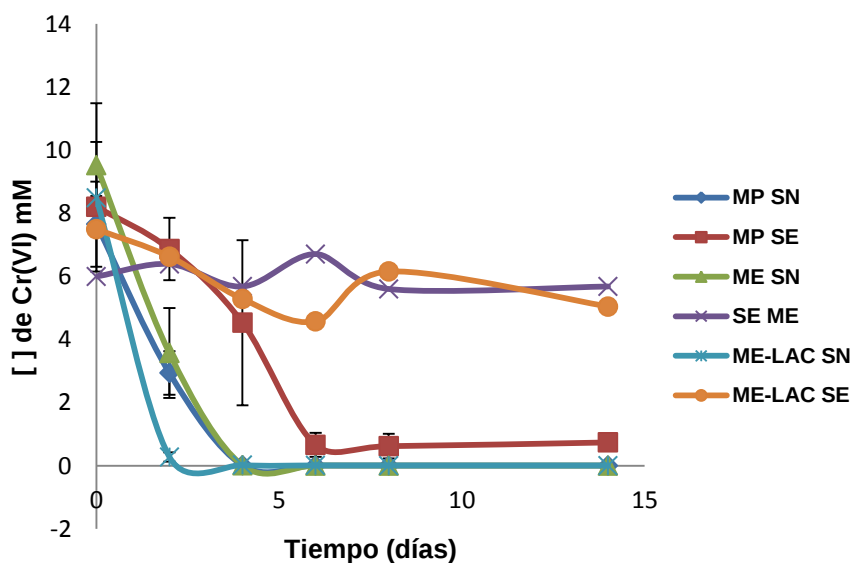


Fig. 9. El ensayo con melaza estéril-lactato muestra una reducción a los 2 días siendo el más favorable de todos los ensayos con melaza, seguido de melaza pasteurizada y melaza estéril en donde el suelo es sin esterilizar; aunque también se observa una reducción en la melaza pasteurizada con suelo estéril. Muestra de suelo de 30-40 cm de profundidad cuarto muestreo.

Comparando con los controles no hubo reducción de Cr(VI) en donde el suelo es estéril, excepto para el control de melaza pasteurizada y suelo estéril donde pudo haber influido que algún microorganismo de la melaza pasteurizada haya resistido a altas temperaturas o que la pasteurización no se haya realizado bien.

6.2 Efecto del pH en los estudios de bioestimulación

El pH juega un papel importante en la mayoría de los sistemas biológicos. El intervalo preferible de pH en tales sistemas es de 6-8. Se estudió el efecto del pH sobre la reducción de Cr(VI) a Cr(III) en los ensayos de bioestimulación teniendo un pH de 6-7. A pH neutro, se observó que hubo una reducción de Cr(VI) comparado a lo reportado por (James, 2002) ya que menciona que a pH bajos mejora las condiciones de reducción.

6.3 Determinación de azúcares de la melaza y como producto de su metabolismo por Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Debido a que la utilización de la melaza por microorganismos fue muy efectiva, es importante el conocer qué tipo de azúcares son empleados por los microorganismos y en que azúcares se transformaba y metabolizaba por la comunidad microbiana.

Para esto se decidió hacer un análisis de los azúcares presentes en las muestras como se describe a continuación. Con esta técnica se determinó que en la composición de las melazas había una mayor cantidad de sacarosa siendo el tiempo de retención desde el momento de la inyección y el término de la curva que fue a los 7.8 minutos, glucosa 9.0 min y fructosa 9.7 leído por el Índice de Refracción. En la Fig.10. se muestra que al inicio del ensayo hay una producción de sacarosa, en menor proporción glucosa y fructosa; pero a los 6 días hay una

degradación de sacarosa, permaneciendo por un tiempo la glucosa y fructosa; pero a los 10 días hay un consumo total de los tres azúcares, los microorganismos presentes en el ensayo de bioestimulación utilizan los azúcares para la reducción de Cr(VI) a Cr(III). En comparación con los controles donde el suelo es estéril y la melaza también no hubo esa transformación de los azúcares y no se observó una metabolización por parte de la comunidad microbiana

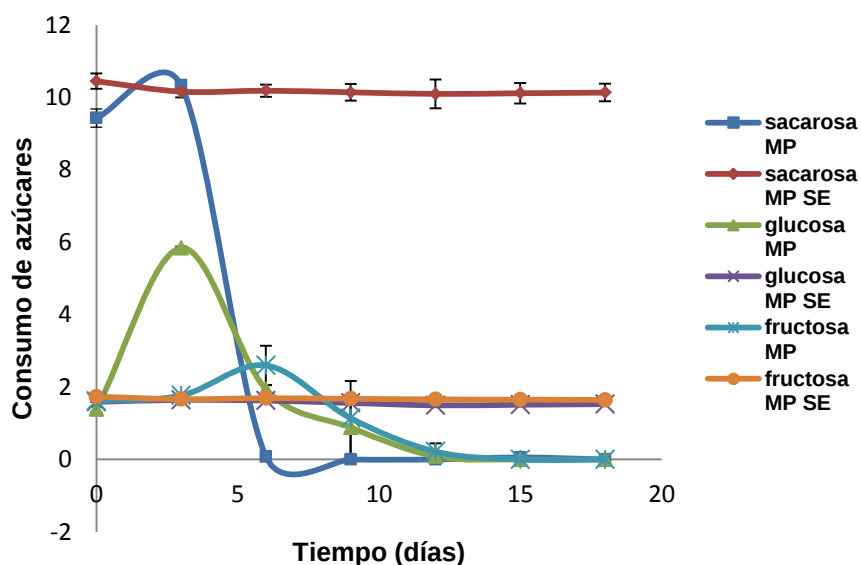


Fig. 10. Consumo de azúcares en prueba de bioestimulación con la profundidad de 46 cm.

La melaza tiene un alto contenido de sacarosa, pero el aumento de las tasas de reducción de Cr(VI) es más probable con glucosa y fructosa (Field *et al.*, 2013). En la Fig. 11. se observa el consumo de todos los azúcares; empezando a degradarse la sacarosa donde la melaza es pasteurizada y el suelo es sin esterilizar, produciéndose glucosa y fructosa durante un determinado tiempo hasta llegar al día 10 en donde estos dos azúcares terminan degradándose. Para la melaza estéril con el suelo sin esterilizar el tiempo de consumo de los azúcares fue a los 14 días.

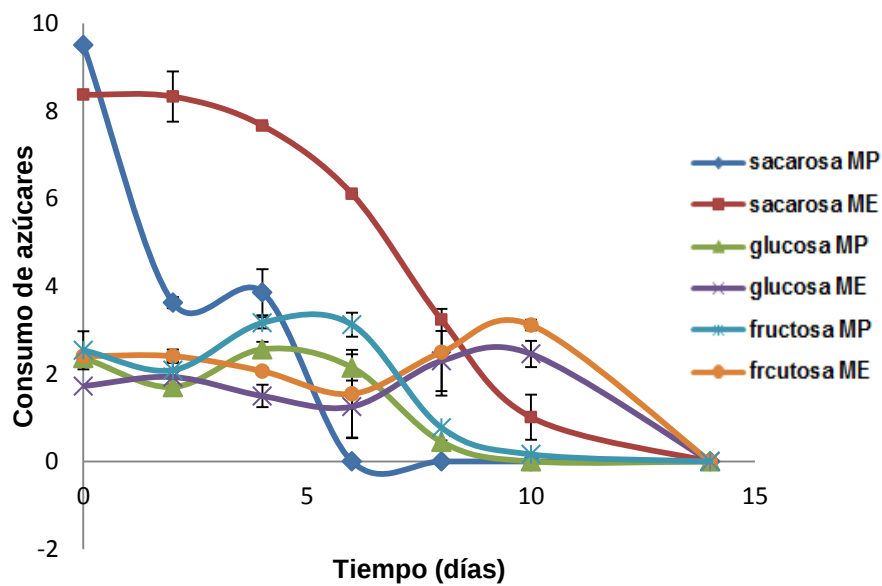


Fig. 11. Consumo de todos los azúcares en prueba de bioestimulación 35 cm de profundidad.

También se obtuvieron datos con las melazas pasteurizadas y melaza estéril pero con el (suelo estéril) se realizó para ver lo que estaba pasando con los azúcares, efectivamente como se observa en la Fig.12. No hay una producción de azúcares, los microorganismos no están haciendo nada ya que están muertos, no se muestra reducción abiótica.

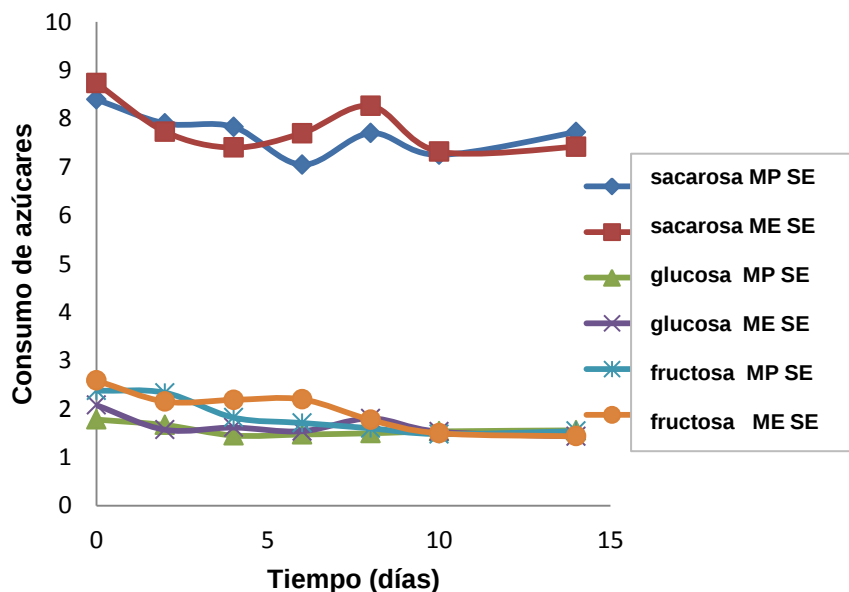


Fig. 12. No se muestra consumo de azúcares en muestras con melaza y suelo estéril; 35 cm de profundidad.

En la Fig.13. Se observa que todos los azúcares son degradados al mismo tiempo con los diferentes ensayos de melaza, metiendo un control más que fue el lactato, indicando lo mismo que en los demás ensayos con las diferentes profundidades. Corroborando que los microorganismos nativos utilizan los azúcares para su metabolización. En este análisis de bioestimulación se realizó con el cuarto muestreo correspondiente a la profundidad 30-40.

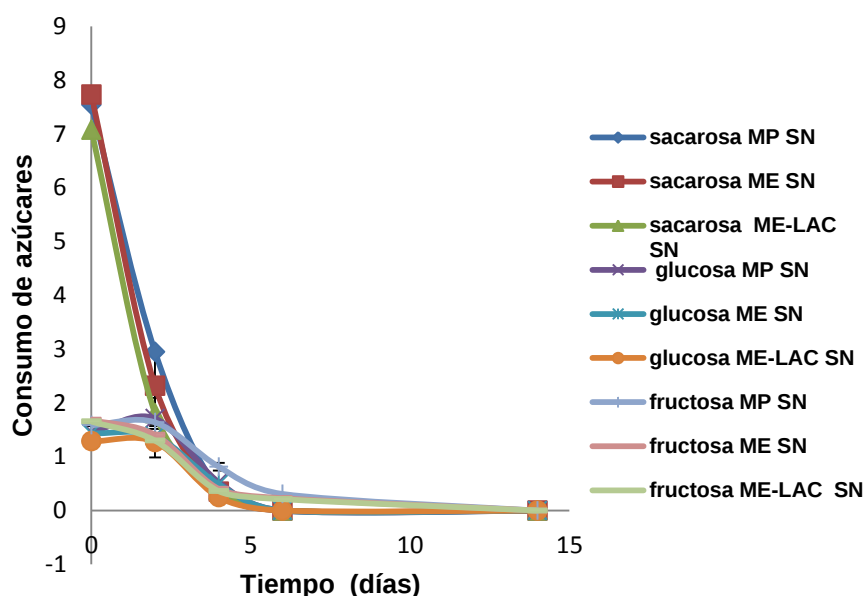


Fig.13. Consumo de todos los azúcares con los diferentes ensayos de melazas. Muestra 30-40 cm.

Hay una degradación de sacarosa en muestras de melaza pasteurizada con el suelo estéril a los 10 días Fig.14. correspondiente a la reducción de Cr(VI) a Cr(III), también hay una producción de glucosa y fructosa pero después de los 14 días es consumido. Consumiéndose glucosa para la melaza pasteuriza y fructosa siendo melaza pasteurizada, melaza estéril y melaza estéril-lactato. Permanece constante la sacarosa con melaza estéril y melaza estéril-lactato; para la glucosa siendo la melaza estéril junto con la melaza estéril-lactato. Lo cual quiere decir que los microorganismos presente en la melaza pasteurizada influyen para la reducción del Cr(V) junto con su composición de este donador de electrón.

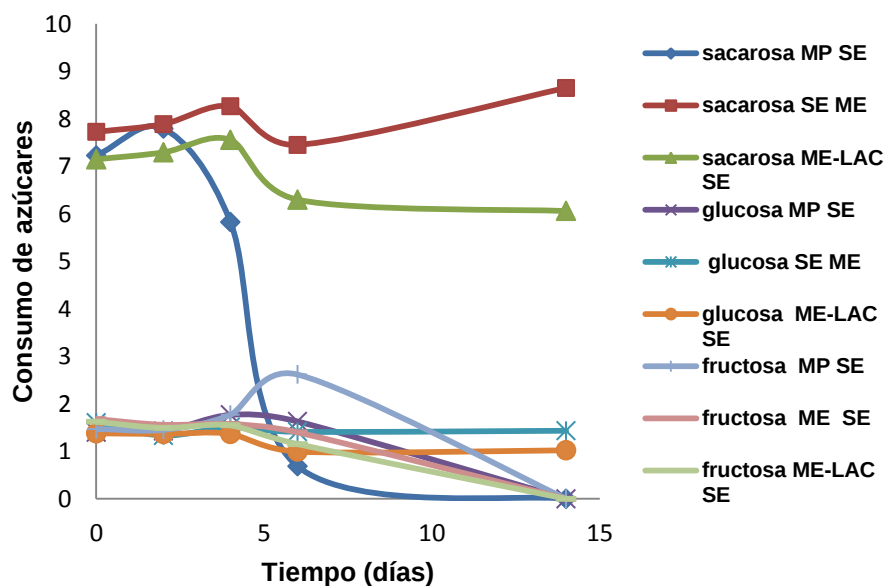


Fig.14. Consumo de algunos azúcares para los diferentes ensayos de bioestimulación. Muestra 30-40 cm.

Con esta técnica también se pudieron leer los ácidos orgánicos (acetato y lactato) presentes en las melazas. El tiempo de retención del lactato fue de 12 minutos y acetato 14 minutos, analizado en el detector UV/vis. Produciéndose acetato y lactato en melaza pasteurizada y melaza estéril (con el suelo sin esterilizar) indicándonos que los componentes de la melaza son producto de la fermentación (Truex *et al.*, 2007, 2009). La reducción de Cr(VI) a Cr(III) se da manera fermentativa correspondiente con (Field *et al.*, 2013) produciéndose ácidos orgánicos. Fig.15. Ya que en la fermentación anaerobia, el procesos de producción del metabolito de interés se desarrolla en ausencia de oxígeno; los productos finales son sustancias orgánicas, como los encontrados en la melaza, que después de reducir el Cr(VI) se terminan degradando estos ácidos orgánicos. Comparado con los controles en donde no hubo una producción de ácidos.

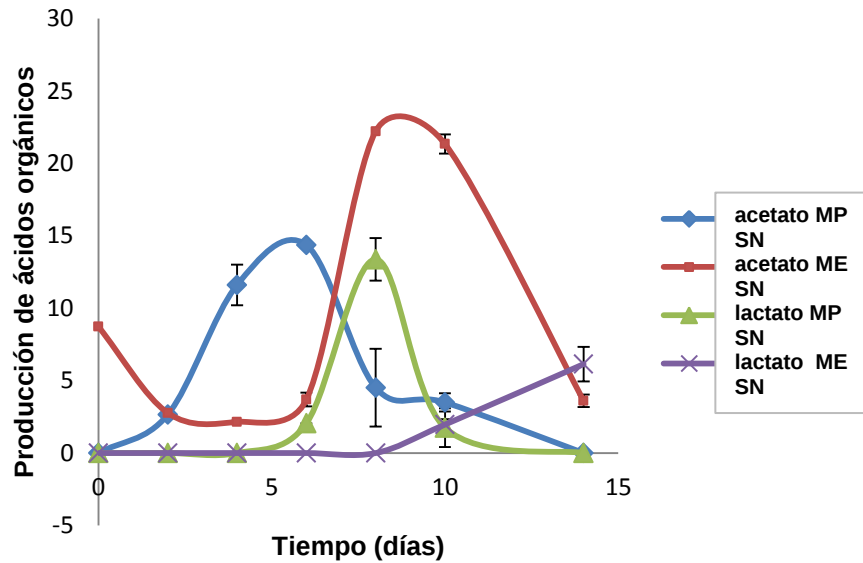


Fig.15. Producción de ácidos orgánicos. Muestra 35 cm

Entonces en los procesos anaeróbicos, los microorganismos producen mucho menos energía que en los aerobios y para suplir sus necesidades de energía, metabolizan una mayor cantidad de azúcares; por consiguiente elaboran más metabolitos. Entonces, a través de la cantidad de oxígeno, se puede manipular un proceso de fermentación para incrementar la producción de la sustancia de interés; por ejemplo, cuando se trabaja con un microorganismo facultativo (capaz de crecer en presencia o ausencia de oxígeno).

En la Fig.16. Se observa una imagen después de varios meses de estar bioestimulándose los ensayos de melaza, a simple vista se ve una reducción del Cr(VI) en melaza pasteurizada y en melaza estéril-lactato, los dos frascos últimos de la derecha. Comparando con los controles de los tres primeros frascos a la izquierda en donde no hubo un cambio permaneciendo el mismo color desde el inicio de la bioestimulación.



Fig.16. Ensayos de bioestimulación con melazas

6.4 Identificación de microorganismos presentes en los ensayos de bioestimulación por medio de la extracción de DNA

El 99% de los microorganismos que habitan en el suelo no son cultivables, es por ello que una manera de ver que comunidades están presentes en estos suelos es por medio de uso de técnicas moleculares. Mediante la extracción de los ácidos nucleicos del sitio.

Es importante mencionar que en algunas ocasiones las extracciones de DNA del suelo contaminado con Cr(VI) no han sido posibles por su alto contenido del metal pesado lo que impide la presencia de muchos microorganismos. En nuestro caso de estudio no pudimos extraer el DNA de los suelos estudiados a diferentes profundidades por lo que creemos que un pH alcalino influye en la extracción ya que se ha reportado que hacen un pre tratamiento antes de hacer la extracción de DNA (Mareckova *et al.*, 2008; Verma y Satyanarayana, 2011). Aunque no se sabe con certeza que factores impiden obtener DNA. Solo se pudo obtener DNA de los ensayos de bioestimulación a los 6 días y 18 de la melaza pasteurizada del tercer muestreo 46 cm de profundidad y de los 103 días de melaza estéril-lactato del cuarto muestreo 30-40 cm de profundidad.

6.5 Amplificación del Gen 16S rRNA

El DNA fue leído en el Nanodrop espectrofotómetro que mide micro volúmenes de DNA, ARN y proteínas. Por absorbancia de 260 nm se leyó del DNA dando como resultado ≥ 10 ng/ml. Se realizaron los PCR para todas las muestras extraídas, cambiando varias condiciones: como la temperatura, haciendo gradientes y otros factores hasta lograr su amplificación. Solo las muestras que si amplificaron por 16s fueron las muestras de los ensayos de bioestimulación del día 6 y 18 con melaza pasteurizada del tercer muestreo 46 cm de profundidad y del tiempo 103 dias con melaza estéril-lactato del cuarto muestreo 30-40 cm de profundidad, ver Fig.17.

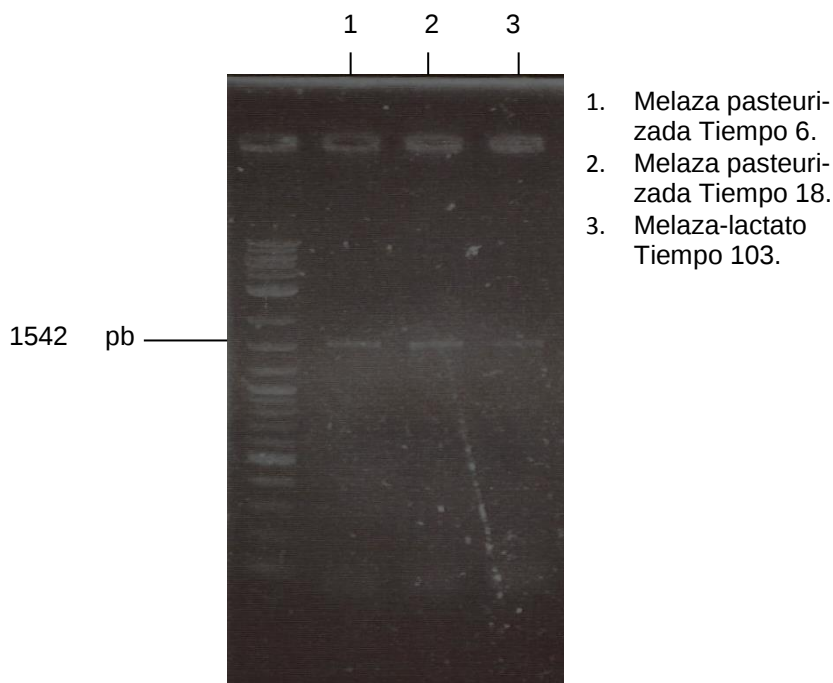


Fig.17. Amplificación del ADN de los ensayos de bioestimulación a los diferentes tiempos de ser bioestimulada.

6.6 Clonación del fragmento de PCR amplificado del 16s rDNA y secuenciación del inserto

Después de insertar el DNA amplificado mediante PCR (DNA pasajero o inserto) en un plásmido apropiado (DNA vector o vehículo) por ligación. Observando bacterias blancas y azules. Con fenotipo Lac⁺ que resultan de la complementación α se pueden reconocer porque forman colonias azules en presencia del sustrato cromogénico (X-gal) y un inductor del gen de la lactosa como el (IPTG). Sin embargo, la inserción de una DNA pasajero en el sitio de policlonación del vector, produce casi invariablemente un extremo amino terminal de β -galactosidasa que no es capaz de conseguir la complementación α . Estas bacterias recombinantes con DNA pasajero ligado en el vector generaron colonias blancas en dicho medio; las cuales fueron seleccionadas y aisladas. Aislando 24 colonias de las cuales se realizaron purificaciones de plásmido. Después de haber purificado se pusieron en digestión con una enzima de restricción EcoRI para cortar fragmentos.

Sólo 8 clonas mostraron el inserto del plásmido para las muestras de bioestimulación. Con melaza pasteurizada al tiempo 18 tuvieron el inserto 3 clonas, correspondiente a la profundidad 46 cm del tercer muestreo en comparación con melaza estéril-lactato tiempo 103 que solo 5 tuvieron el inserto de la profundidad 30-40 cm del cuarto muestreo; la del tiempo 6 ninguna tuvo el inserto.

Después de haber mandado a secuenciar se hicieron alineamientos y buscando en GenBank las secuencias de los microorganismos los que más se asemejan son: *Paenibacillus borealis* NR_025299 con un 1493/1543(97%) de identidad y un 88% de cobertura, *Desulfosporosinus lacus* NR_042202 1374/1568(88%) de identidad, cobertura de 89% y *Bacillus korlensis* NR_044538 con 1449/1471(99%) de identidad y una cobertura de 85%.

En la muestra de 103 días se encontró un consorcio de 3 géneros de bacterias: *Paenibacillus borealis*, *Desulfosporosinus lacus* y *Bacillus korlensis*. Mientras

que a los 18 días de ser bioestimulada se encontró a *Desulfosporosinus lacus* y *Paenibacillus borealis*. Aunque no es comparable porque son diferentes muestras y profundidades; hubo un enriquecimiento de bacterias después de varios meses de seguir incubándose.

Los tres géneros de bacterias llevaron a cabo la metabolización rápida para la reducción de Cr(VI) a Cr(III). Las bacterias son formadoras de esporas, están dentro del phylum *Firmicutes* y son Gram-positivas (Spring y Rosenzweig, 2006). El aislamiento y caracterización de bacterias reportado por (González *et al.*, 2005) ha tenido un amplio estudio para la reducción y que ha sido importante para saber que microorganismos reducen el metal pesado.

Se ha reportado a *Paenibacillus sp* como un reductor de metales pesados (Thavamani *et al.*, 2012), esta bacteria resulto ser muy tolerante a las altas concentraciones de Cr(VI) (Rawat *et al.*, 2013). Este género de bacterias son anaerobias facultativas, fijadoras de nitrógeno, se han aislado de ácidos húmicos, suelos de rizosfera, agua, rizosfera de las plantas (Elo *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2012; Kong *et al.*, 2013).

Bacillus korlensis se aislado de la una provincia de Xinjiang en el noroeste de China y produce H₂S (Zhang *et al.*, 2009). El género de *Bacillus sp* crece tanto en condiciones anaeróbica facultativa y aeróbicas (Garbisu *et al.*, 1998) también se ha visto que reduce el Cr(VI) siendo un modelo de estudio para varios trabajos de investigación (Rehman *et al.*, 2008).

Las bacterias de *Desulfoporosinus lacus* son anaerobias estrictas capaces de crecer fermentativamente utilizando piruvato y lactato como fuentes de energía.

(Ramamoorthy *et al.*, 2006; Pester *et al.*, 2012) por tal motivo es de esperarse que crecieran en muestras con melaza. Además de su capacidad para reducir

el sulfato, algunas especies de *Desulfosporosinus* también pueden crecer mediante el uso de nitrato, Fe(III), o As(V) como aceptores de electrones terminales. Los miembros del género *Desulfosporosinus* se encuentran en ambientes de agua dulce, en suelos con bajo contenido de sulfato y también en ambientes contaminados con metales pesados (Pester *et al.*, 2012). Los tres géneros fueron resistentes a las altas concentraciones de Cr(VI) y reductores del metal.

7. Conclusiones

- No todos los donadores de electrones funcionan para llevarlo a biorremediación de un suelo contaminado por Cr(VI) ya que depende del tipo del suelo en el que se encuentre.
- Los microorganismos pueden crecer usando diferentes rutas metabólicas, pero sólo algunas vías catalizan la reducción de Cr(VI). Algunos de los miembros del consorcio podrán ser reductores de Cr(VI), siendo mucho más activas que otras dependiendo de la fuente de carbono y energía empleada
- Melaza fue el donador de electrón que los microorganismos metabolizaron para llevar a cabo la reducción del Cr(VI) a Cr(III).
- La melaza es factible para llevarlo a la recuperación de suelos, por su solubilidad y su bajo costo.
- Las altas concentraciones de Cr(VI) y un pH alcalino impiden el crecimiento de microorganismos; de tal manera que sólo los microorganismos resistentes a este contaminante puedan permanecer en el suelo. Por tal motivo la extracción de DNA no es tan factible; aunque se logre obtener una concentración de ≥ 10 ng/ μ l de DNA su amplificación por PCR es nulo.
- La extracción de DNA sólo se pudo realizar con los ensayos de bioestimulación con melaza pero teniendo complicaciones para su obtención.
- El resultado de las clonas corresponde a bacterias que se han encontrado en los suelos.
- Los 3 géneros encontrados pertenecen a las *Firmicutes*.

8. Perspectivas

- Llevar a in situ la bioestimulación con melaza para la recuperación de suelos contaminados.
- Hacer un estudio en especial con las bacterias de *Desulfosporosinus sp* ya que se ha encontrado que reduce metales pesados.
- Conocer los genes involucrados en la reducción del Cr(VI).
- Realizar un estudio de las bacterias para ver cuál es el metabolismo más eficiente para la reducción de Cr(VI).

Literatura citada

Agarwal, Kumar y Pandey (2008). Remediation options for the treatment of electroplating and leather tanning effluent containing chromium, a review. *Miner Process Extr Metall Rev* 272:99–130.

Amacher y Baker (1982). Redox reactions involving Chromium, Plutonium and Manganese in soils. DOE/DP/04515- 1. Institute for Research on Land and Water Resources, Pennsylvania State University and U.S. Department of Energy, Las Vegas, NV.

Aoki y Munemori (1982). Recovery of chromium(VI) from waste waters with iron(III) hydroxide. I. Adsorption mechanism of chromium(VI) on iron(III) hydroxide. *Water Res.* 16: 798-797.

Arcadis (2009). ARCADIS, Denver, Colorado. Available at www.arcadis-us.com

Arslan, Beltrame y Tomasi (1987). Intracellular chromium reduction, *Biochim. Biophys. Acta* 931 10–15.

Bartlett (1987). Chromium oxidation in soils and water: measurements and mechanisms. In: *Proceedings of the Chromium Symposium; Update, 1986* (D. Seirone, Ed.), Industrial Health Foundation, Pittsburgh, PA, pp. 310-330.

Bartlett (1991). Chromium Cycling in soils and water: links, gaps, and methods. *Environmental Health Perspectives* Vol. 92, pp. 17-24.

Bartlett y James (1988). Mobility and bioavailability of chromium in soils. In: *Chromium in the Natural and Human Environments* (J. O. Nriagu and E. Nieboer, Eds.), John Wiley and Sons, pp 267-:383.

Borden y Rodriguez (2006). Evaluation of slow release substrates for anaerobic bioremediation. *Bioremediation J.* 10(1-2):59–69.

Buttner y Beyersmann (1985). Modification of the erythrocyte anion carrier by chromate, *Xenobiotica* 15 735–741.

Clark (1994) Chromate reductase activity of *Enterobacter aerogenes* is induced by nitrite. *FEMS Microbiol Lett* 122:233–238.

Costa (1997) Toxicology and carcinogenicity of Cr(VI) in animal models and humans. *Cr Rev Toxicol* 27:431–442.

Das y Singh (2011). Occupational health assessment of chromite toxicity among Indian miners, *Indian J. Occup. Environ. Med.* 15, 6–13.

Deuren, Wang y Ledbetter (1997). Remediation technologies screening matrix and reference guide. 3^a Ed. Technology Innovation Office, EPA. <http://www.epa.gov/tio/remed.htm>.

Devlin (2004). Bioquímica, 4^a edición. Reverté, Barcelona. ISBN 84-291-7208-4.

Dhal, Thatoi, Das y Pandey (2013). Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and mining/metallurgical solid waste: A review. *Journal of Hazardous Materials* 250-251, 272-291.

Díaz, Pérez, Vargas, Rosas, Garcia y Cervantes (2008). Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals* 21:321–332.

Dinakarbandian, Morrisette, Chaudhary, Amini, Bennett y Horn (2004) An informatics search for the low molecular weight chromium binding peptide. *BMC Chem Biol* 4:1–7.

Elo, Suominen, Kämpfer, Juhanoja, Salonen y Haahtela (2001). *Paenibacillus borealis* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from spruce forest humus in Finland. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 51, 535–545.

Field, Gerlach, Viamajala, Jennings, Peyton y Apel (2013). Hexavalent chromium reduction by *Cellulomonas* sp. strain ES6: the influence of carbon source, iron minerals, and electron shuttling compounds. *Biodegradation* 24:437-450.

Fredrickson, Kostandarithes, Li, Plymale y Daly (2006). Reduction of Fe(III), Cr(VI), U(VI) and Tc(VII) by *Deinococcus radiodurans* R1. *Appl Environ Microbiol* 66: 2006–2011.

Garbisu, Alkorta, Llama y Serra (1998). Aerobic chromate reduction by *Bacillus subtilis*. *Biodegradation* 9:133–141.

Gemoets, Gielen, Hermans, Vermoortel y Carpels (2003). Evaluation of the Potential for Natural Attenuation and In Situ Bioprecipitation of Chromium in Groundwater. Paper L-07 in *Proceedings of the Seventh International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium*, Orlando, Florida.

Gerhardt, Murray y Wood (1994). Methods for general and molecular bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, D.C.

González, Ackerley, Lynch, Matin (2005). *ChrR*, a soluble quinone reductase of *Pseudomonas putida* that defends against H₂O₂. *J Biol Chem* 280:22590–22595.

González, Ackerley, Park y Matin (2003). A soluble flavoprotein contributes to chromate reduction and tolerance by *Pseudomonas putida*. *Acta Biotechnol* 23:233–239.

Nordberg (2013). Metales: propiedades químicas y toxicidad. ENCICLOPEDIA DE SALUD Y SEGURIDAD EN EL TRABAJO, cuarta edición. Pp. 63.15-63.18.

Hazen, Faybishenko, Brodie, Joyner, Barglin, Chakraborty, Conrad, Tokunaga, Wan, Hubbard, Williams, Peterson, Firestone, Anderson, DeSantis, Long, Newcomer, Willett y Koenigsberg (2007). Field investigations of lactate-stimulated bioreduction of Cr(VI) to Cr(III) at Hanford 100Hz. Environmental Remediation Sciences Program, U.S. Department of Energy Office of Science.

He, Gao, Sha, Hu y He (2009). Isolation and characterization of a Cr(VI)-reducing *Ochrobactrum* sp. strain CScr-3 from chromium landfill. *J Hazard Mater* 163:869–873.

Ishibashi, Cervantes y Silver (1990). Chromium reduction in *Pseudomonas putida*. *Appl Environ Microbiol* 6:2268–2270.

James (2002). Chemical transformations of chromium in soils: relevance to mobility, bio-availability and remediation. In: The chromium file, Inter. Chromium Dev. Assoc., Paris, pp 1–8.

Jeyasingh y Philip (2004). Bioremediation of chromium contaminated soil: optimization of operating parameters under laboratory conditions. *Journal of Hazardous Materials B118*, 113–120.

Kong, Liu, Min Liu, Yang Liu, Lei Liu, Li Li, Yu y Hong Li (2013). *Paenibacillus typhae* sp. nov., isolated from roots of *Typha angustifolia* L. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 1037–1044.

Krishna y Philip (2005). Bioremediation of Cr(VI) in contaminated soils, *Journal of Hazardous Materials B12*, 109–117.

Kwak, Lee y Kim (2003). *Vibrio harvey* nitroreductase is also a chromate reductase. *Appl Environ Microbiol* 69:4390–4395.

Losi, Amrhein y Frankenberger (1994). Factors affecting chemical and biological reduction of hexavalent chromium in soil. *Environ Toxic Chem* 13:1727–1735.

Macías (1993). Contaminación de suelos: algunos hechos y perspectivas. En: Ortiz Silla, R., (Ed.), Problemática Geoambiental y Desarrollo, Tomo I, pp. 53-74. V Reunión Nacional de Geología Ambiental y Ordenación del Territorio. Murcia.

Madigan, Martinko y Parker (2003). *Brock Biología de los Microorganismos*, 10ª edición. Ed. Prentice-Hall, Madrid. ISBN 978-84-205-3679-8

Mareckova, Cermak, Novotna, Plhachova, Forstova, y Kopecky (2008). Innovative Methods for Soil DNA Purification Tested in Soils with Widely Differing Characteristics. *Applied and environmental microbiology*, p. 2902–2907.

Mazoch, Tesar, Sedlacek, Kucera y Turanek (2004). Isolation and Biochemical Characterization of two Soluble iron (III) reductases from *Paracoccus denitrificans*. *Eur J Biochem* 271:553–562.

McCarty (1975). Stoichiometry of Biological Reactions. *Prog. In Water. Technol.* 7(1):157-172.

McCullough, Hazen, Benson, Meyying, Palmisano (1999). Bioremediation of metals and radionuclides. US Dept. of Energy, Office of Biological and Environmental Research, Germantown, MC 20874.

McLean, Beveridge y Phipps (2000). Isolation and characterization of a chromium-reducing bacterium from a chromated copper arsenate contaminated site. *Blackwell Science Ltd, Environmental Microbiology*, 2, 611±619.

Mikalsen, Alexander, Wallin, Sundberg y Andersen (1991). Reductive metabolism and protein binding of chromium(VI) by P450 protein enzymes, *Carcinogenesis* 12 825–831.

Mulligan (2001). Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology*, 60: 193-207.

Myers, Carstens, Antholine y Myer (2000). Chromium(VI) reductase activity is associated with the cytoplasmic membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J Appl Microbiol* 88:98–106.

Nelson y Cox (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry* (4th ed edición). W. H. Freeman. ISBN 978-0716743392.

Nishioka (1975). Mutagenic activity of metal compounds in bacteria. *Mutat Res* 31:185–189.

O'Brien, Xu, y Patierno (2001). *Mol. Cell. Biochem.* 222, 173-182.

Otiniano, Tuesta, Robles, Luján y Chávez (2007). Capacity of Chromium VI bioremediation from waste waters of tanneries by *Pseudomonas* sp and its effect over the cellular cycle of *Allium cepa*. *Rev. Med. Vallejiana*. Vol. 4 N° 1.

Peña, Arroyo, Gómez, Tapia y Gómez (2004). *Bioquímica*. Segunda edición.

Editorial Limusa. Pp 218-219.

Pester, Brambilla, Alazard, Spring, Loy, Woyke, Ollivier, Klenk, Szeto, Mikhailova, Pati, Wagner, Chen, Mavromatis, Markowitz, Davenport, Daligault, Chain, Pagani, Huntmann, Wei, Hauser, Kyrpides, Ivanova, Detter, Han, Tapia, Land, Lo Peters, Ovchinnikova, Teshima, Lapidus, Cheng, Goodwin, Pitluck, Rattei, Weinmaier, Han, Lucas y Alla (2012). Complete Genome Sequences of *Desulfosporosinus orientis* DSM765T, *Desulfosporosinus youngiae* DSM17734T, *Desulfosporosinus meridiei* DSM13257T, and *Desulfosporosinus acidiphilus* DSM22704T. *J. Bacteriol*, 194(22):6300. DOI: 10.1128/JB.01392-12.

Puzon, Petersen, Roberts, Kramer, Xun (2002). A bacterial flavin reductase system reduces chromate to a soluble chromium (III)-NADH complex. *Biochem Biophys Res Commun* 294:76–81.

Quievryn, Goulart, Messer y Zhitkovich (2001). *Mol. Cell. Biochem.* 222, 107-118.

Quievryn, Messer y Zhitkovich (2002). *Biochemistry* 41, 3156-3167.

Rai, Sass y Moore (1987). Chromium(III) hydrolysis constants and solubility of chromium(III) hydroxide. *Inorg Chem* 26: 345±349.

Ramamoorthy, Sass, Langner, Schumann, Kroppenstedt, Spring, Overmann y Rosenzweig (2006). *Desulfosporosinus lacus* sp. nov., a sulfate reducing bacterium isolated from pristine freshwater lake sediments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 2729–2736.

Rawat, A.P. Rawat, Giri y Rai (2013). Cr(VI) sorption by free and immobilised chromate-reducing bacterial cells in PVA–alginate matrix: equilibrium isotherms and kinetic studies. *Environ Sci Pollut Res* 20:5198–5211, DOI 10.1007/s11356-013-1493-4.

Rehman, Zahoor, Muneer y Hasnain (2008). Chromium tolerance and reduction potential of a *Bacillus* sp. ev3 isolated from metal contaminated wastewater. *Bull Environ Contam Toxicol* 81:25–29.

Romanenko y Koren'kov (1977). A pure culture of bacteria utilizing chromates and bichromates as hydrogen acceptors in growth under anaerobic conditions. *Mikrobiologiya* 46: 414±417.

Saleh, Parkerton, Lewis, Huang, Dickson (1989). Kinetics of chromium transformations in the environment. *Sci Total Environ* 86:25–41.

“Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Que establece los criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, barios, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, niquel, pla-

ta, plomo, selenio, talio y/o vanadio". NORMA Oficial Mexicana NOM-147 Semarnat/SSA1-2004, Diario Oficial de la Federación, 2 de marzo de 2007.

Shannon y Unterman (1993). Evaluating bioremediation: distinguishing fact from fiction. *Ann Rev Microbiol* 47:715–738.

Shen y Wang (1993). Characterization of enzymatic reduction of hexavalent chromium by *Escherichia coli* ATCC 33456. *Appl Environ Microbiol* 59:3771–3777.

Shi, Chiu, Chen, Halliwell, Castranova y Vallyathan (1999) *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 2,87-104.

Sleep, Brown y Lollar (2005). Long-Term Tetrachloroethene degradation sustained by endogenous cell decay. *J. Environ. Eng. Sci.* 4:11-17.

Smith, Apel, Petersen y Peyton (2002). Effect of carbon and energy source on bacterial Chromate reduction, *Bioremediation Journal*, 6:3, 205-215, DOI: 10.1080/10889860290777567.

Snow (1992). *Pharmacol. Ther.* 53, 31-6.

Spring y Rosenzweig (2006). The genera *Desulfitobacterium* and *Desulfosporosinus*: taxonomy. *Prokaryotes* 4:771–786 DOI: 10.1007/0-387-30744-3_24. CHAPTER 1.2.24.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1992). APHA, AWWA and WPLF. Ed. 18 pp 3500.

Standeven y Wetterhahn (1991). *Carcinogenesis* 12, 1733-1737.

Standeven y Wetterhahn (1992). *Carcinogenesis* 13, 1319-1324.

Stollenwerk y Grove (1985). Adsorption and desorption of hexavalent chromium in an alluvial aquifer near Telluride, Colorado. *J. Environ. Qual.* 14: 150-155).

Suzuki, Miyata, Horitsu, Kawai, Takamizawa, Tai, Okazaki (1992). NADPH-dependent chromium(VI) reductase of *Pseudomonas ambigua* G-1: a Cr(V) intermediate is formed during the reduction of Cr(VI) to Cr(III). *J Bacteriol.* 174:5340–5345.

Suzuki y Fukuda (1990). *Arch. Toxicol.* 64, 169-176.

Tapia, Freer y Mansilla (2002). Estudio de reducción fotocatalizada de cromo hexavalente. *Bol.Soc.Chil.Quím.* v.47 n.4.doi:10.4067/S0366-16442002000400018.

Thavamani, Megharaj y Naidu (2012). Bioremediation of high molecular weight polyaromatic hydrocarbons co-contaminated with metals in liquid and soil

slurries by metal tolerant PAHs degrading bacterial consortium. *Biodegradation* 23:823–835, DOI 10.1007/s10532-012-9572-7.

Truex, Oostrom, Vermeul, Newcomer, Fritz, Brockman, Mackley, Bilskis, Mendoza, Hubbard, Elmore, Peterson, Mitroshkov, Williams, Sklarew, Gasperikova, Johnson y Franklin (2009). Hanford 100-D area biostimulation treatability test results. prepared for the U.S. Department of Energy under Contract DE-AC05-76RL01830 PNNL-18784.

Truex, Vermeul, Long, Brockman, Oostrom, Hubbard, Borden y Fruchter (2007). Treatability test plan for an In situ biostimulation reducing barrier. Prepared for the U.S. Department of Energy under Contract DE-AC05-76RL01830. PNNL-16424.

Verma y Satyanarayana (2011). An Improved Protocol for DNA Extraction from Alkaline Soil and Sediment Samples for Constructing Metagenomic Libraries. *Appl Biochem Biotechnol*, 165:454–464, DOI 10.1007/s12010-011-9264-5.

Wang, He y Pan (2007). A new method for the treatment of chromite ore processing residues, *Journal of Hazardous Materials* 149, 440-444.

Wang, Mori, Toda, Ohtake (1990). Membrane-associated chromate reductase activity from *Enterobacter cloacae*. *J Bacteriol* 172:1670–1672.

Xie, Zhang, Zhou, Liu, Chen (2012). *Paenibacillus taohuashanense* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from rhizosphere soil of the root of *Caragana kansuensis* Pojark. *Antonie van Leeuwenhoek*, 102:735–741.

Yang y McCarty (2000). Biomass, oleate, and other possible substrates for chloroethene reductive dehalogenation. *Bioremediation J.* 4(2):125-133.

Zee y Cervantes (2009). Impact and application of electron shuttles on the redox (bio) transformation of contaminants: a review. *Biotechnol Adv* 27:256–277.

Zhang, Wang, Dai, Tang, Yang, Luo y Fang (2009). *Bacillus korlensis* sp. nov., a moderately halotolerant bacterium isolated from a sand soil sample in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 1787–1792.

Anexos

Método de difenilcarbazida

Reactivos

- Agua.
- Solución de difenilcarbazida (pesar en el frasco).
 - ✓ .25 gr de difenilcarbazida.
 - ✓ 50 ml de acetona.
- Cubrir frasco con aluminio.
- Ácido sulfúrico 10% (v/v): 10 ml H_2SO_4 + 100 ml H_2O .
- Solución stock $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$: 141.4 mg de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ + 1 L H_2O
- Solución standard $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$: 10 ml de sol. Stock a 100 ml H_2O .
- Solución utilizada de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 100 mg de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ + 1 L H_2O

Equipo.

Espectrofotómetro

Preparación de las soluciones de acetato, lactato y melazas.

20 ml de lactato 2 M

FW= 112.06 g/mol

2M = 2 mol/L para 10 ml

$$2\text{M} = \frac{2\text{mol}/100}{1\text{L} / 100} = 0.02 \text{ mol}/10\text{ml}$$

$$\text{gr} = (112.06\text{g/mol})(0.02\text{mol}) = 2.2412 \text{ gr para } 10\text{ml}$$

4.4824 gr para 20 ml.

Se puso a reducción de oxígeno; burbujeando con N_2/CO_2 20 min en líquido y 10 min con (cánula fuera del líquido).

SE REALIZO LO MISMO CON EL ACETATO.

Preparación de melazas

Se pesó 4 gr de melazas para 200 ml esto equivale al 2%.

2 gr ----- 100 ml 2%
4 gr ----- 200 ml

Se pasteurizo a una temperatura entre $63^{\circ}C - 65^{\circ}C$ por 30 minutos enseguida se llevó a enfriar y se volvió a meter a baño maría a $63^{\circ}C$ por 30 minutos por tres veces.

Precipitación del DNA

- | | |
|---|----------------------|
| a) NaCl 5 M 1/25 | c) isopropanol 1 vol |
| b) Acetato de sodio ($C_2H_3NaO_2$) 3 M 1/10 vol. | d) etanol 100 % 2.5 |

Se necesita siempre una sal y un alcohol.

Puedo usar:

a/c
a/d
b/c
b/d

1. Llevar las muestras de DNA a un volumen de 100 ml; si las muestras resuspendidas están en un volumen menor.
2. Agregar 4 μl de NaCl y mezclar.
3. Agregar 104 de isopropanol y mezclar.
4. Incubar 2 horas a $-20^{\circ}C$.
5. Centrifugar 10 minutos a 10500 rpm.
6. Retirar todo el isopropanol.
7. Secar en el savant a $50^{\circ}C$
8. Resuspender en la cantidad deseada dependiendo de la cuantificación de DNA.

Preparación de buffer de cargado

- 0.25 % de azul bromofenol.
- 0.25 % xileno cianol.
- 30 % glicerol en agua.

Preparación de buffer de corrimiento

10x Tris-borate-EDTA (TBE) buffer stock
(0.89 M Tris, 0.89 M ácido bórico, 20 mM EDTA, pH aproximadamente 8.2, para 1000ml)

Base Tris (PM = 121.1)	0.89 M	108 g
Ácido bórico (PM = 61.8)	0.89	55 g
Solución EDTA 0.5 M, pH 8.0	0.02 M = 20mM	40 ml
H ₂ O des ionizada		para 1000 ml

Purificación del producto de PCR

- Se corre en un gel de agarosa toda la cantidad de la amplificación del PCR.
- Cortar banda del gel de agarosa
- Agregar de 500-1000 µl de buffer QxI
- Incubar a 55-60°C por 10 minutos hasta dejar que se diluya bien la agarosa
- Pasar por columna de PCR
- Centrifugar por 30 segundos
- Lavar con 500 µl de B wash 30 segundos 2 veces
- Pasar la columna a un tubo ependorf
- Agregar de 30-50 µl de agua tibia en el centro de la columna
- Se vuelve a correr un gel de agarosa pero con 3 µl del producto para ver si no se perdió

Ligación del producto de PCR con el kit TOPO TA

- ✓ Agregar 4 µl del producto de PCR purificado.
- ✓ 1 µl de solución de ligación diluida 1/10
- ✓ 0.8 µl de TOPO

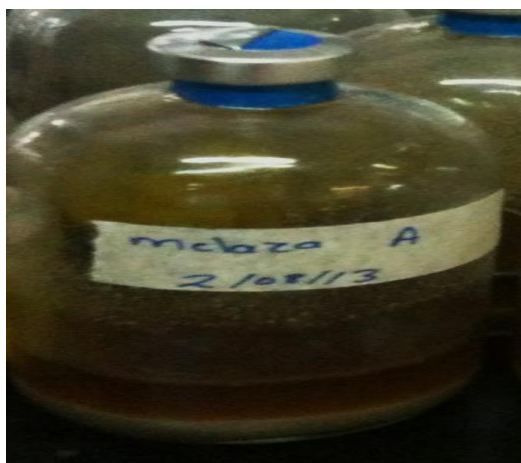
Se deja ligando overnight a -20°C; pero también se puede dejar a temperatura ambiente.

Transformación por electroporación

1. Poner en hielo
 - Células competentes (descongelar)
 - Producto de ligación
 - Columnitas limpias
2. En campana agregar 5.8 µl de producto de PCR a los tubos donde vienen la células competentes
3. Agregar a la celda con cuidado para que no haya burbujas dar unos golpecitos, meter con tapa y dar el pulso (con el electroporador) sino Arquea listo
4. Agregar 900 µl de SOC enjuagar celda y agregar a tubos de ensayo con tapa estériles
5. Poner cultivo a 37 °C en agitación con termomix 1 hora
6. Plaquear 900 y 100 µl en cajas LB con Km 30 µg/ ml, IPTG y Xgal con una concentración final de 25 µg/ ml
7. Incubar a 37 °C overnight.



a)



b)



c)



d)

Se muestran fotografías de los ensayos de bioestimulación con diferentes donadores de electrones a) se muestran ensayos con lactato y lactato, se observa el color que tiene el Cr(VI) del cual nunca se observó un cambio de color que nos dijera que estuviera reduciendo el metal pesado. b) se observa un ensayo que fue realizado con melaza pasteurizada. c) se muestran ensayos con melaza estéril-lactato a los primeros días de estar bioestimulada. d) Después de varios días de estar bioestimulándose los ensayos de melaza pasteurizada y melaza estéril-lactato; se muestra que hubo un cambio de color a negro indicando a simple vista la reducción del metal.

Abreviaturas utilizadas.

Cr(VI). Cromo hexavalente

SN. Suelo normal (sin esterilizar)

SE. Suelo estéril

MP SN. Melaza pasteurizada

MP SE. Melaza pasteurizada suelo estéril

ME SN. Melaza estéril suelo normal (sin esterilizar)

SE ME. Melaza estéril suelo estéril

ME-LAC. Melaza estéril-lactato