

INFORME TECNICO
RESIDENCIA PROFESIONAL
INGENIERIA BIOQUÍMICA

QUE PRESENTA:

GÓMEZ LÓPEZ MIGUEL ANGEL

CON EL TEMA:

**“Evaluación del potencial de remoción del
decaclorobifenilo mediante bacterias endosimbióticas de
la lombriz *Eisenia foetida*”**

ASESOR

Dr. Reiner Rincón Rosales

TUXTLA GUTIERREZ,

DICIEMBRE 2016

ÍNDICE

Temas

Paginas

CAPÍTULO I

1. Introducción

1

CAPITULO II

2. Marco Teórico

4

2.1. Compuestos Orgánicos Persistentes (COP´s)

4

2.2. Bifenilos policlorados

5

2.2.1. Usos y aplicaciones

8

2.2.2. Métodos de detección

9

2.2.3. Métodos de eliminación de BPC's

9

2.2.3.1. Incineración

9

2.2.3.2. Desventajas del proceso de incineración

10

2.2.3.3. Métodos químicos

11

2.2.3.4. Proceso Goodyear

11

2.2.3.5. Desventajas del proceso Goodyear

12

2.2.3.6. Proceso PCBX

12

2.2.3.7. Proceso KPEG

12

2.2.3.8. Métodos físicos

13

2.2.4. Métodos biológicos

13

2.2.4.1. Biodegradación anaerobia de los BPC's

17

2.2.4.2. Biodegradación aeróbica de los BPC's

18

2.2.5. Bacterias endosimbióticas

21

CAPITULO III

3. Justificación

23

CAPITULO IV

4. Objetivos

24

4.1. Objetivo general

24

4.1.1. Objetivos específicos

24

CAPITULO V

5. Planteamiento del problema

25

CAPITULO VI

6. MATERIALES Y METODOS

26

6.1. Ubicación del proyecto

26

6.1.1. Preparación de la solución de BPC's

26

6.1.2. Cepas bacterianas

28

6.1.3. Reactivación de bacterias

28

6.1.4. Extracción de ADN genómico

30

6.1.4.1.	Electroforesis de ADN extraído	31
6.1.5.	Amplificación del gen 16S rRNA por PCR	31
6.1.5.1.	Electroforesis del amplicón 16S rRNA	32
6.1.6.	Purificación y secuenciación del gen 16S rRNA	32
6.2.	Diseño experimental	33
6.2.1.	Acondicionamiento de las cepas a medio de cultivo líquido	33
6.2.2.	Crecimiento en sistema de cultivo líquido(matraz Erlenmeyer)	34
6.3.	Extracción de decaclorobifenilo en medio de cultivo	35
6.3.1.	Extracción de decaclorobifenilo en biomasa	36
6.3.2.	Cuantificación de decaclorobifenilo	36
6.3.3.	Análisis estadístico	36
CAPITULO VII		
7.	Resultados y Discusión	37
7.1.	Caracterización morfológicas	37
7.2.	Extracción de ADN	38
7.2.1.	Amplificación del gen 16s rRNA	39
7.2.2.	Purificación del gen rRNA	39
7.2.3.	Filogenia de las cepas a partir del gen 16s rRNA	40
7.3.	Extracción del DCB en el sistema de cultivo líquida	42
CAPITULO VIII		
8.	Conclusión	44
CAPITULO IX		
9.	Referencias Bibliográficas	45
CAPITULO X		
10.1.	Recomendaciones	49
10.2.	Competencias alcanzadas	51
CAPITULO XI		53
11.	Anexos	53
11.1	Taxonomía de cepas identificadas	53
11.1.1.	<i>Bacillus cereus</i>	53
11.1.2.	<i>Klebsiella pneumonie</i>	54
11.1.3.	<i>Acinetobacter schindleri</i>	55
11.1.4.	<i>Citrobacter sp.</i>	56
11.1.5.	<i>Staphylococcus sciuri</i>	57
11.1.6.	<i>Pseudomonas sp.</i>	58

Figuras	Temas	Paginas
Figura 1.	Estructura química de los BPC´s	5
Figura 2.	Representación esquemática de las principales vías de biotransformación de BPC´s en los medios de comunicación natural y artificial bajo condiciones aeróbicas	16
Figura 3.	Posible mecanismo de dechloración reductiva de BPCs catalizada por microorganismos anaerobios	18
Figura 4.	Vía general de degradación de BPCs por bacterias	20
Figura 5.	Ubicación del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez	26
Figura 6.	Preparación de Decaclorobifenilo, para una concentración final de 1000 ppm	27
Figura 7.	Cepas bacterias endosimbióticas aisladas del sistema digestivo de la lombriz <i>E. foetida</i> guardadas en Glicerol	28
Figura 8.	Cepas bacterias endosimbióticas aisladas del sistema digestivo de la lombriz <i>E. foetida</i> inoculadas en medio solido Infusión Cerebro Corazón (ICC)	29
Figura 9.	Programa utilizado para ampliar el gen 16s rRNA	32
Figura 10.	Gel de electroforesis de ADN	38
Figura 11.	Electroforesis del gen16S rRNA amplificado	39
Figura 12.	Gel de electroforesis de los fragmentos del gen 16s rRNA purificados	40
Figura 13.	Eficiencia de Extracion de DCB expresado en porcentaje	41
Figura 14.	Gráfico de Barras donde se observa el porcentaje de DCB Bioacumulado en cada una de las Cepas Bacterianas analizadas	43
Figura 15.	Micrografía de <i>B. cereus</i> con tinción de Gram	53
Figura 16.	Micrografía de <i>K. pneumoniae</i> con tinción de Gram	54
Figura 17.	Micrografía electrónica de barrido de <i>Citrobacter freundii</i>	56
Figura 18.	Micrografías de <i>S. sciuri</i> en diferentes substratos de topografía definida y química después del lavado	57

Tablas	Temas	Paginas
1.	Nombres generales de los PCB ´s	6
2.	Mezcla de reacción para 16S	31
3.	Código de cepas identificadas aisladas del intestino de la lombriz <i>E. foetida</i>	35
4.	Eliminación potencial de contaminante por acción de bacterias aisladas del intestino de la lombriz de tierra <i>Eisenia fetida</i> en medio de cultivo contaminado con DCB	42

Capítulo I

1. Introducción

Los bifenilos policlorados (PCBs por sus siglas en inglés) comprenden un grupo de más de 200 compuestos formados por la sustitución de 1 a 10 átomos de cloro en los anillos bifenílicos y cuya fórmula general es $C_{12}H_{10-x}Cl_x$. Son compuestos incoloros e insípidos que no existían de manera natural en el medio ambiente y su presencia es debida a la actividad antropogénica (Sittig M. et al., 1981). Inicialmente, se les sintetizó y aplicó en numerosos productos industriales, como plastificantes, retardadores de flama, adhesivos y aceites dieléctricos. Algunas de las propiedades físicas que hicieron de los PCB's de gran utilidad para la industria, tales como baja volatilidad, resistencia y estabilidad a alta temperatura, solubilidad en solventes no polares, estabilidad y excelentes propiedades dieléctricas, los han convertido en un obstáculo para su eliminación. La convención de Estocolmo los catalogó como Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs) y su uso en la actualidad está prohibida [ONU 2004].

Considerando la alta toxicidad de estos compuestos se han diseñado procedimientos químicos y físicos para su degradación, tales como: incineración, oxido-reducción, entre otros, pero la mayoría de estos han resultado poco eficientes, caros y generan remanentes químicos que contaminan aún más al ambiente. La biorremediación consisten en el uso de microorganismos como plantas, hongos, bacterias para neutralizar sustancias tóxicas, transformándolas en sustancias menos tóxicas o inocuas para el ambiente y la salud humana (Schmidt W. 2000).

Así mismo, existen animales que actúan como agentes descontaminantes, ya que pueden desarrollarse en medios con fuerte toxicidad y poseen en su interior microorganismo capaces de retener

metales pesados; tal es el caso de la lombriz de tierra (*Lumbricus terrestris*) la cuál absorbe los contaminantes a través de los tejidos y los acumula en las vías digestivas (Atlas R et al, 2002, Rojas N et al, 1999). Las bacterias son las más empleadas en el proceso de biorremediación, aunque también se han empleado otros microorganismos como hongos, algas, Cianobacterias y Actinomicetes para la degradación de compuestos tóxicos en el suelo (Atlas R et al, 2002).

El intestino de la lombriz de tierra contiene una gran variedad de microorganismos, están situados en una parte esencial del intestino llamado el ciego y juegan un papel crítico en la descomposición de los alimentos dentro de la lombriz para que pueda absorber adecuadamente los nutrientes esenciales (Álvarez et al., 2015). Estas lombrices pueden acelerar significativamente la descomposición de la materia orgánica, que se sabe que está mediada por la microflora intestinal asociada. Sin embargo, de acuerdo con Singh et al. (2015), existe escasa información sobre la abundancia y diversidad de la flora bacteriana intestinal en diferentes géneros de lombrices, particularmente *Eisenia foetida*; la diversidad genética de bacterias asociadas al intestino de la lombriz de tierra *Eisenia foetida*.

En los estudios sobre bacterias dentro del intestino de la lombriz, diversos métodos y técnicas han sido usados los cuales han ayudado a identificar especies de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Azotobacter*, *Serratia*, *Aeromonas* y *Enterobacter* (Byzov et al., 2007; Singleton, et al., 2003). Estas bacterias son principalmente promotores de crecimiento de plantas fijadoras de nitrógeno de vida libre y solubilizadores de fosfatos (Martínez-Romero, 2001). Algunos investigadores también señalan la existencia de un posible tipo de mutualismo entre estos dos organismos (Brown et al., 2006).

En este trabajo de investigación se realizó la caracterización fenotípicamente y la identificación taxonómica de las bacterias endosimbióticas aisladas del intestino de la lombriz *Eisenia foetida* empleando herramientas de biología molecular. Así también se evaluó la capacidad de remoción de decaclorobifenilo por las bacterias endosimbióticas.

Capítulo II

2. Marco Teórico

2.1. Compuestos Orgánicos Persistentes (COP's)

Los Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP's) son un grupo de sustancias sintéticas de alto riesgo para la salud humana y el medio ambiente. Estas sustancias han sido encontradas alrededor del mundo, incluidas algunas zonas muy alejadas de aquellas en donde se emplearon tales contaminantes, ejemplos. las zonas polares, además de poblaciones humanas e, incluso, en la leche materna (MacDonald et al., 2000; Polder et al., 2003; She et al., 2007).

Para atender esta problemática a nivel mundial, se firmó el 23 de mayo de 2001 el Convenio de Estocolmo. En el texto del convenio se describen las propiedades de los COP de la siguiente forma: "los contaminantes orgánicos persistentes tienen propiedades tóxicas, son persistentes a la degradación, se bioacumulan y son transportados por el aire, el agua y las especies migratorias, a través de las fronteras internacionales y depositados lejos del lugar de su liberación, acumulándose en ecosistemas terrestres y acuáticos" (Convenio de Estocolmo: http://www.pops.int/documents/convtext/convtext_sp.pdf).

Los COPs son sustancias de difícil degradación, con una elevada persistencia en el medio. Sus altas concentraciones pueden llegar a tener efectos nocivos en la reproducción, desarrollo y función inmunológica de los organismos (**UNEP**). Dentro de estos compuestos se incluyen los pesticidas organoclorados como: Toxafeno, DDT (Diclorodifeniltricloroetano), HCHs (Hexaclorociclohexanos) y PCBs (Bifenilos policlorados).

Los COPs, tienden a bioacumularse en los organismos a través del tiempo y, posteriormente, a biomagnificarse y moverse a través de las redes tróficas, hasta alcanzar concentraciones muy elevadas (Pacheco, 2008). Así, la velocidad de bioacumulación depende, sobre todo, de la naturaleza química del compuesto, de la cantidad que está en contacto con el organismo y de la velocidad de adsorción y de excreción de la sustancia en cada organismo.

2.2. Bifenilos policlorados

Los bifenilos policlorados, BPC's (también conocidos como PCB, de la abreviatura inglesa de polychlorinatedbiphenyls) (López et al., 2001), son un subconjunto de compuestos químicos orgánicos sintéticos conocidos como hidrocarburos aromáticos halogenados (organoclorados) (Lopera et al., 2006).

Estos compuestos orgánicos aromáticos están formados por una molécula de bencilo (dos anillos de benceno conectados al carbono C-1 (Wiegel y Wu, 2000)), cada anillo de benceno puede tener hasta 5 sustituyentes de cloro en las posiciones orto, meta o para (Wiegel and Wu, 2000).

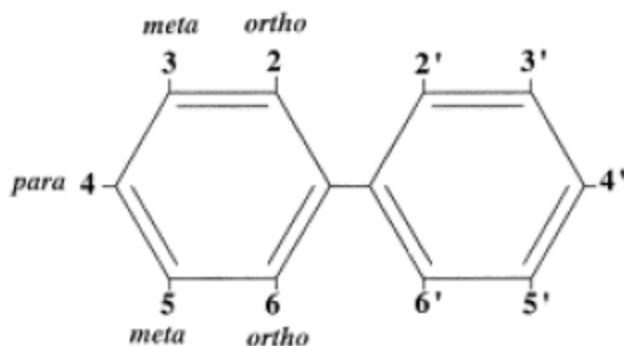


Figura1. Estructura química de los BPC's (Wiegel and Wu, 2000)

Los nombres de los PCB's están clasificados, según la IUPAC, en tres tipos: homólogos, congéneres y mezclas. Los homólogos se refieren al nombre general de un PCB dependiendo del número de cloruros que este posea, los nombres de los congéneres indican la posición de cada cloruro dentro de la molécula, las mezclas se refieren a nombres comerciales(Lopera *et al.*,2006), como ejemplo el aroclor , para nombrarlos se utiliza un código de cuatro dígitos: los primeros dos representan al bifenilo (12 átomos de carbono), y los últimos dos indican el porcentaje en peso del contenido de cloro de la mezcla; por ejemplo, el aroclor 1254 es una mezcla de BPC's con un 54% de cloro.

Nombre	Tipo
Monoclorobifenilo	Homólogo
Diclorobifenilo	Homólogo
Triclorobifenilo	Homólogo
Tetraclorobifenilo	Homólogo
Pentaclorobifenilo	Homólogo
Hexaclorobifenilo	Homólogo
Heptaclorobifenilo	Homólogo
Octaclorobifenilo	Homólogo
Nonaclorobifenilo	Homólogo
Decaclorobifenilo	Congénere
2-Clorobifenilo	Congénere
2,2',3,3',4,4',5,6'- Octaclorobifenilo	Congénere
Aroclor 1254	Mezcla

Tabla 1. Nombres generales de los PCB's (Lopera *et al.*, 2006)

Existen alrededor de 209 compuestos individuales conocidos como congéneres en los que varía su estructura orgánica y el número de posiciones sustituidas por átomos de cloro (López *et al.*, 2001), Aproximadamente 189 congéneres fueron identificados en mezclas comerciales, 36 de los cuales están considerados como los más significativos por su abundancia y alta toxicidad (McFarland y Clarke, 1989). Físicamente, presentan desde aspecto aceitoso hasta resinas

duras y transparentes o cristales blancos, dependiendo del grado de cloración de la molécula, por lo tanto, el manejo de estos compuestos requiere tener presente que se trata de sustancias tóxicas con capacidad de persistir sin modificarse durante muchos años, de atravesar las membranas celulares y de bioacumularse en el tejido adiposo de animales y seres humanos. Aunque son termo resistente, pueden arder en contacto directo con una llama liberando dioxinas y furanos cuando se incendian los equipos que los contienen (Cortinas, 2003). Los BPC's se encuentran principalmente en dos estados: líquido y sólido. Los líquidos van de color claro al amarillo ligero, tienen consistencia resinosa por contener cantidades elevadas de cloro y en estado sólido, son polvo blanco (SEMARNAT, 2011). Tienen un peso molecular de 188.7-498.7 g/mol; densidad de 1.1821-1.566 g/L; punto de ebullición de 320- 420 °C; presión de vapor de 0.00006 mm Hg a 20°C; son hidrofóbicos, su solubilidad en agua de 0.0027 y 0.42 ng/L; de naturaleza no polar y muy liposolubles (Lopera *et al.*, 2006).

Los BPCs pueden viajar largas distancias en el aire y ser depositados en áreas distantes del lugar de liberación. En agua, una pequeña porción de los BPCs puede permanecer disuelta, pero la mayor parte se adhiere a partículas orgánicas y a sedimentos del fondo de los cuerpos de agua. Los BPCs también se adhieren fuertemente al suelo.(SEMARNAT,2011) Los congéneres de BPC's con mayor contenido de cloro son prácticamente insolubles en agua y sumamente resistentes a la degradación (Ruíz, 2005), se absorben con más fuerza al suelo o sedimento y tienen mayor tendencia a bioacumularse (Arbeli, 2009).

Los PCB's fueron producidos a escala industrial por más de 50 años y se exportaron como materias primas prácticamente en todo el mundo. Se estima que la cantidad de PCB's producida entre 1930 y 1980 fue de

1'200.000 toneladas, de las cuales 400.000 se depositaron en los océanos y 800.000 en aparatos de servicio. Los países que fabricaban PCB's incluían Austria, China, Checoslovaquia, Francia, Alemania, Italia, Japón, la Federación Rusa, España, Reino Unido y Estados Unidos. Estos compuestos fueron patentados en 1929 por la compañía SwanChemical, quien en 1931 vendió la patente a la Monsanto Chemical (Lopera et al., 2006), en México se reportó por SEMARNAT en el 2011 que el inventario de BPC's es de 2,704.86 ton.

2.2.1. Usos y aplicaciones

Entre 1929 y 1989 la producción total mundial de PCB (excluida la ex-Unión Soviética) fue de 1,5 millones de toneladas, lo que hace un promedio de unas 26,000 toneladas al año. Incluso después de que en 1979 se prohibiese en Estados Unidos la fabricación, venta y distribución de PCBs debido a evidencia de acumulación en el medio ambiente y de efectos nocivos producidos por estos compuestos, entre 1980 y 1984 la producción mundial se mantuvo en 16,000 toneladas al año, y entre 1984 y 1989, en 10,000 toneladas (SEMARNAT-2011).

Los BPC's son usados como fluidos dieléctricos por sus propiedades fisico-químicas, debido a esto, el sector eléctrico es uno de los principales contaminantes, pues muchos equipos como condensadores y transformadores de luz fueron diseñados y fabricados para trabajar utilizando fluidos dieléctricos de alta concentración de BPC's (Lopera et al., 2006).

Los usos de los BPCs se pueden clasificar como cerrados o abiertos. Sistemas completamente cerrados: transformadores eléctricos; condensadores eléctricos (incluidas las reactancias de lámparas fluorescentes); interruptores, capacitores, balastras, interruptores de

alta tensión, bobinas reguladoras y otros accesorios eléctricos; cables eléctricos; motores eléctricos y electroimanes (cantidades muy pequeñas). Sistemas abiertos: plastificante en cloruro de polivinilo, neopreno y otros cauchos artificiales; ingrediente en pinturas, barnices, ceras de pisos, plastificantes en resinas y otros materiales de recubrimiento; ingrediente en tintas y papel de autocopia; ingrediente en adhesivos. Aditivos de plaguicidas; Ingrediente en lubricantes, materiales de sellado (composiciones obturadoras en la industria de la construcción) y de calafateo; Ignífugo en telas, alfombras, espuma de poliuretano, etc.; Lubricantes (lubricantes para microscopios, guarniciones de frenos, lubricantes para cuchillas, lubricantes de otros tipos).(SEMARNAT-2011)

2.2.2. Métodos de detección

Los métodos analíticos para BPC´s se basan en su separación por medio de cromatografía de gases, usando columnas capilares con diferentes polaridades y detectores específicos tales como el detector de ionización de llama (FID), el detector de captura de electrones (ECD) y la espectrometría de masas (MS) (Robles *et al.*, 2005, zenteno et al., 2016). Otro método es el uso de cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (GC-MS): Su sensibilidad es menor que el GC-ECD, pero tiene una gran selectividad para los BPC´s y puede distinguir y medir individualmente los congéneres de BPC´s (Zenteno et al., 2016).

2.2.3. Métodos de eliminación de BPC's

2.2.3.1. Incineración

Implica la oxidación a altas temperaturas de los desechos para transformarlos en óxidos (CO₂, H₂O) y residuos inorgánicos que pueden ser liberados al ambiente con bajo impacto adverso. El proceso debe asegurar que los desechos estén expuestos a atmósferas oxidantes a alta temperatura, por eso una de las características más importantes de diseño es el consumo eficiente de combustible. Se utiliza aire y un hidrocarburo como combustible, aunque puede usarse el poder calorífico de los desechos contaminados con BPC's, siempre que esto no degrade la condición oxidante a alta temperatura.

Las condiciones de operación mínimas para la cámara de combustión principal, sugeridas para lograr la destrucción de los BPC's son de un tiempo de residencia de 2 segundos a 1200°C y un exceso de oxígeno del 3% (Lopera *et al.*, 2006).

2.2.3.2. Desventajas del proceso de incineración

- Los átomos de cloro presentes en los BPC's son efectivos retardantes de llama, que tienden a capturar los radicales libres de hidrógeno, que propagan las reacciones en el incinerador. Este hecho dificulta una combustión completa adecuada (López *et al.*, 2001).
- Los incineradores tienen altos costos de operación debido a las altas temperaturas que son usadas para destruir los BPC's.
- Los gases resultantes de la combustión provocan serios problemas de corrosión a altas temperaturas de operación.
- Generación de productos de combustión incompleta, formados a nivel de cantidades traza. Cuando los BPC's se queman, pueden generarse

dioxinas y dibenzofuranos clorados. Los gases de salida pueden contener ácido clorhídrico (HCl), monóxido de carbono (CO) y dióxido de carbono (CO₂), cuya eliminación suele ser más difícil y costosa.

- Debido a las pocas unidades de incineración existentes, los residuos de BPC's deben ser transportados con el consiguiente aumento de costos y riesgos.

2.2.3.3. Métodos químicos

Los procesos basados en reacciones químicas específicas para destruir los BPC's se diferencian de los procesos de incineración en que no necesitan de altas temperaturas para que la reacción ocurra, sino que estos procesos se llevan a cabo gracias al potencial de los compuestos químicos para reaccionar. Los procesos de dechloración usan reactivos químicos para romper los enlaces en la molécula de BPC's, que es extremadamente estable, formando otros compuestos químicos que se consideran inofensivos y ambientalmente seguros. Estos procesos no rompen la estructura de bifenilo de la molécula, sólo son removidos los átomos de cloro que son los que dan a la molécula del bifenilopoliclorado su estabilidad química y biológica (López *et al.*, 2001).

2.2.3.4. Proceso Goodyear

Es un método de tratamiento químico para tratar los fluidos de transmisión de calor que contienen BPC's. La preparación de los reactivos se inicia con la dispersión de un fundido de sodio en aceite caliente para formar un reactivo químico de sodio altamente reactivo y dispersado en forma de gotas muy finas. Se continúa la agitación mientras la mezcla es enfriada rápidamente a temperatura ambiente, provocando la solidificación de las gotas de sodio en forma de esferas finas y claras. A la mezcla se le adiciona una disolución de naftaleno y tetrahidrofurano para formar naftalida de sodio. Para conseguir una

disolución homogénea es necesaria una agitación adicional entre una y cuatro horas. La naftalida de sodio rompe los enlaces químicos carbono-cloro produciendo cloruro sódico más iones hidrógeno. La reacción dura menos de cinco minutos a temperatura ambiente y necesita una relación mínima de 50 moles de naftalida por cada 100 moles de cloro para eliminar el 98% de los BPC's de un fluido de transmisión de calor estándar que contiene 82 ppm de BPC's (López *et al.*, 2001; Lopera *et al.*, 2006).

2.2.3.5. Desventajas del proceso Goodyear

- Se deben extremar precauciones en el manejo de sodio metálico.
- Se utiliza nitrógeno o un gas inerte similar para prevenir la formación de mezclas hidrógeno/oxígeno potencialmente explosivas. La Agencia de Protección al Ambiente (EPA, por sus siglas en inglés) ha clasificado al naftaleno como un compuesto de uso restringido, dado su potencial cancerígeno.

2.2.3.6. Proceso PCBX

El proceso PCBX es un método de destrucción química, implica compuestos orgánicos de sodio empleando una amina como disolvente. El cloro de los BPC's es transformado en cloruro sódico, mientras que la porción orgánica de la molécula de BPC, el núcleo bifenilo, se convierte en sólidos poliméricos que son insolubles en agua. Este proceso permite descontaminar 2.27 m³/h de aceites de transformadores que contienen más de 2600 ppm de BPC's (López *et al.*, 2001).

2.2.3.7. Proceso KPEG

Es un proceso donde la descomposición de compuestos orgánicos halogenados puede llevarse a cabo eficientemente usando un compuesto producido por la reacción de un hidróxido de metal alcalino, un poliglicol

o poliglicolmonoalquil éter y oxígeno, resultando un polietilenglicolato de metal alcalino. La descomposición de BPC's usando este método genera productos relativamente inocuos, los principales son cloruro de sodio y varios compuestos orgánicos deshalogenados, como por ejemplo derivados fenólicos de los BPC's (Lopera *et al.*, 2006).

2.2.3.8. Métodos físicos

No son tratamientos que impliquen destrucción, es decir, los BPC's sólo son vaciados de los contenedores y/o transformadores y reemplazados con otro fluido, esto no ayuda a liberarse del problema de los BPC's sino que sólo cambia su ubicación (Zenteno *et al.*, 2016)

2.2.4. Métodos biológicos

La degradación microbiana de los BPC's requiere actividades metabólicas debido al alto número de congéneres existentes. La degradación de los BPC's ocurre principalmente vía co-metabolismo en la que los microorganismos son los responsables de la transformación de los BPC's y están dispuestos a crecer teniendo como única fuente de carbono a los BPC's y requieren de un co-sustrato para el crecimiento microbiano y la degradación (Arbeli, 2009).

La transformación parcial de BPC's se realiza por dos procesos: aerobio y anaerobio. Los anaerobios remueven los cloros del anillo bifenílico sin afectar la estructura del bifenilo (decloración), y los aerobios atacan oxidativamente, rompiendo el anillo y destruyendo los compuestos (Abramowicz, 1990; Ruiz, 2005), esto con base en las enzimas que posean los microorganismos estudiados.

Los dos ejemplos más importantes de procesos de co-metabolismo de contaminantes haloorgánicos son la oxidación de solventes clorados como PCE y TCE, y de BPC's (Pieper, 2005).

Sin embargo, los BPC's en particular los congéneres más clorados, pueden servir como aceptores de electrones para el almacenamiento de energía en ambientes anaeróbicos bajo déficit aceptor de electrones; en el curso de este proceso, se someten a la decloración reductiva (Vasilyeva, 2007).

En este sentido se han sugerido varios métodos para la destrucción de BPC's en matrices ambientales (Kubatova *et al.*, 2001). Sin embargo, debido a las técnicas de remediación clásicas (proceso catalítico, incineración, etc.) son generalmente caros, y no siempre es eficiente, en la actualidad la investigación se ha centrado en el desarrollo de los procesos de biorremediación (Sierra *et al.*, 2003; Andreoniet *al.*, 2004).

Así pues existen una multitud de microorganismos capaces de biodegradar o biotransformar a compuestos químicos tóxicos y persistentes haciéndolos inocuos para el medio ambiente y la salud humana (Asha *et al.*, 2010). Son conocidas numerosas bacterias y hongos que pueden degradar compuestos haloorgánicos en diversas rutas metabólicas bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Arbeli, 2009).

La alternativa de utilizar bacterias como un agente de control contra los patógenos por la presencia de genes en su estructura genética molecular con alto potencial para la eliminación de estos, ha desarrollado ciertas cepas bacterianas con un amplio espectro de efectividad. Algunas especies incluyen *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. cepacia*, *Aerufasciens*, *Pseudomonas*, *P. chlororhapis*, *P. corrugata*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *Burkholderiacepacia*,

Enterobacter sp. BF 14, Serratia plymuthica, Serratia marcescens, Agrobacterium spp. (Zenteno et al., 2016).

De acuerdo con esto, las bacterias degradadoras de BPC's son abundantes y diversas (Pieper, 2005; Leigh et al., 2006) y se hallan también en suelos o sedimentos no contaminados (Macedo et al., 2007). Se aislaron bacterias degradadoras de BPC's de diversos géneros como *Pseudomonas, Burkholderia, Achromobacter, Comamonas, Ralstonia, Sphingomonas, Acinetobacter, Rhodococcus* y *Bacillus* (Pieper, 2005). Es importante resaltar que las bacterias aisladas no necesariamente representan la comunidad nativa ni a los degradadores importantes del suelo (Tillmann et al., 2005; Ritz, 2007). Por ejemplo, el análisis de un suelo con métodos independientes de cultivo indicó que bacterias de los géneros *Pseudonocardia, Kribella, Nocardia* y *Sphingomonas* son las degradadoras dominantes de bifenilos, mientras que los *Rhodococcus* representaron el 73% de los aislamientos (Leigh et al., 2007). Los genes de degradación están ubicados en plásmidos u otros elementos genéticos móviles (Pieper et al., 2005). Por lo tanto, la degradación aeróbica de BPC's no se puede correlacionar con un género particular de bacterias. Es decir, aunque muchas cepas degradadoras se encuentren en algunos géneros (los mencionados arriba) no todos los miembros de estos géneros son degradadores de BPC's y, además, no son los únicos géneros que pueden degradar BPC's. Es por ello que la presencia o ausencia de dichos géneros en un sitio contaminado con BPC's, de ninguna manera puede utilizarse como indicador de la degradación de tales compuestos (Leigh et al., 2007). Las enzimas de degradación de BPC's conocidas hasta la fecha pertenecen a una misma familia y, probablemente, tienen un ancestro común. Sin embargo, estas enzimas presentan gran variabilidad (Pieper et al., 2005).

Varias especies bacterianas aeróbicas han demostrado la capacidad excepcional para degradar una variedad aún mayor de congéneres, incluyendo la penta-, hexa- e incluso varios heptaclorobifenilos (*Pseudomonas LB400*, *Alcaligenes eutrophus H850*, *Corynebacterium MB1* y *Acinetobacter P6*), uno de estos organismos ha demostrado la capacidad de degradación de más del 90% de los BPC's presentes en la mezcla de Aroclor 1242 (LB400) (Abramowicz et al., 1990).

Muchos microbios y cultivos de enriquecimiento se han conocido que son capaz de metabolizar y utilizar los BPCs como fuentes de carbono y/o fuentes de energía en condiciones aeróbicas o anaeróbicas (Abraham et al., 2002). Sin embargo, la degradación es un proceso muy específico y el crecimiento de algunos microorganismos incluso puede ser inhibida por un xenobiótico (Zenteno et al., 2016). Cada microorganismo tiene un comportamiento distinto hacia el estrés causado por los contaminantes (Figura 2) (Abraham et al., 2002).

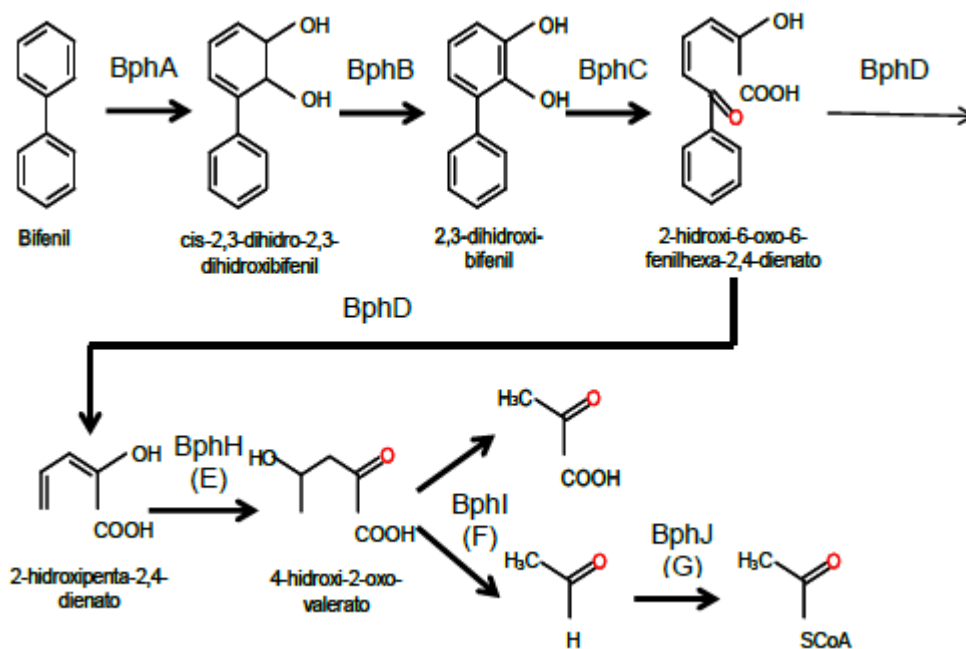


Figura 2. Representación esquemática de las principales vías de biotransformación de BPC's en los medios de comunicación natural y artificial bajo condiciones aeróbicas (Pieper et al., 2008).

Ahmed y Focht (1990) fueron los primeros en describir dos cepas del género *Achromobacter* capaces de degradar varios congéneres de BPC's a ácidos clorobenzoico. Desde entonces varios microorganismos pertenecientes a los géneros *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus* y *Corynebacterium* se han aislado porque pueden degradar aeróbicamente BPC's (Zenteno et al., 2016).

Abraham *et al.*, (2002) menciona que los microorganismos generalmente degradan BPCs bajo clorados en condiciones aeróbicas, mientras que los BPC's altamente clorados se degradan comúnmente en condiciones anaeróbicas. Varios autores han encontrado la degradación microbiana de los BPC's en condiciones aeróbicas (Ruiz - Aguilar *et al.*, 2002; Komancová *et al.*, 2003).

La degradación de los congéneres *no-orto* y *mono-orto* sustituidos también son muy importantes, debido a que estos compuestos están relacionados estructuralmente con la 2,3,7,8 -tetraclorodibenzo-p-dioxin y tienen efectos similares a las dioxinas , es decir, efectos cancerígenos (Zenteno et al., 2016).

2.2.4.1. Biodegradación anaerobia de los BPCs

El aislamiento anaerobio de cultivos puros degradadores de BPCs no ha sido posible. Sin embargo, se ha trabajado con consorcios de microorganismos anaerobios de BPCs, que mostraron dechloraciones selectivas (Higson, 1992, Vila et al., 2015; Zenteno et al., 2016).

La degradación anaerobia se realiza por medio de la deshalogenación de los anillos. Los microorganismos anaerobios utilizan el cloro como un aceptor final de electrones, involucrando la adición del electrón al enlace carbono-cloro, seguido por la pérdida del cloro y la subsiguiente

pérdida del hidrógeno (Figura 3). La disponibilidad del hidrógeno en sistemas microbianos anaerobios podría ser la principal fuente de equivalentes de reducción (Ruiz, 2005).

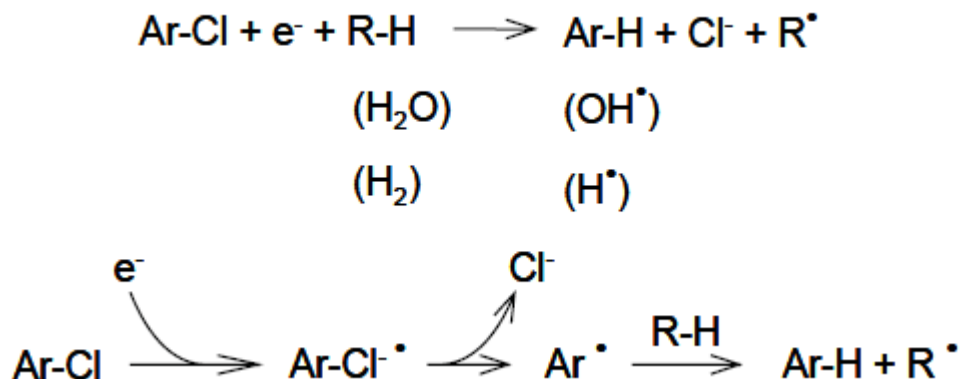


Figura 3. Posible mecanismo de dechloración reductiva de BPCs catalizada por microorganismos anaerobios (Abramowicz, 1990).
Ar = Compuesto aromático; R = Compuesto desconocido.

El compuesto del cual el hidrógeno es eliminado el principal potencial donador de electrones incluye al agua, al hidrógeno o a un compuesto orgánico (Ruiz et al., 2005).

2.2.4.2. Biodegradación aeróbica de los BPC's

El uso de bacterias para el tratamiento de los BPC's ha sido estudiado más extensamente que el empleo de hongos (Wolf-Raineret *al.*, 2002; Kim *et al.*, (2004a)). La degradación microbiológica de varios isómeros y congéneres de BPC's por cultivos mixtos y por cepas de bacterias puras, incluyen a géneros como *Achromobacter*, *Alcaligenes* *Acinetobacter*, entre otros (Nakhlaet *al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004a). El paso inicial en la biodegradación aeróbica de BPC's es la dioxigenación de los congéneres de este compuesto por medio de la enzima bifenildioxigenasa. En este paso, las enzimas catalizan la incorporación

de dos grupos hidroxilo en el anillo aromático del congénere del BPC, el cual incrementa la reactividad y lo hace más susceptible a la ruptura del anillo enzimático. (Vasilyeva *et al.*, 2007) (fig.3). El grado de transformación depende de la estructura del sustrato y del microorganismo empleado, sin embargo un estudio detallado sobre un número de congéneres de BPC's ($C_{12}H_9Cl-C_{12}H_5Cl$), sugiere las siguientes correlaciones (Safe *et al.*, 1984).

- La velocidad de degradación de BPC's generalmente disminuye cuando incrementa la cloración de los anillos.
- Para BPC's con número desigual de cloros en cada uno de los anillos del bifenilo, se degradan preferencialmente, los del anillo menos sustituido.
- Los BPC's con una sustitución 2,4'-dicloro son altamente susceptibles a un rompimiento del anillo en la posición *meta*, con la consecuente acumulación del metabolito ácido fenilhexadienóico.
- Las posiciones 2, 3 son muy sensibles a una oxidación que genera al *cis*-2,3-dihidro-2,3-dihidroxi como metabolito intermediario.
- Los congéneres, en muchos casos, con 2 o 3 posiciones sustituidas en ambos anillos no son realmente sensibles a la degradación metabólica.
- El metabolismo para cada BPC es diferente para diferentes microorganismos.

La biotransformación de los BPC's por parte de las bacterias se lleva a cabo a través de la adición inicial de oxígeno a la posición 2, por la acción de una enzima dioxigenasa, con la subsecuente deshidrogenación

a catecol seguido por el rompimiento del anillo (Furukawa, 2000) (Figura 3).

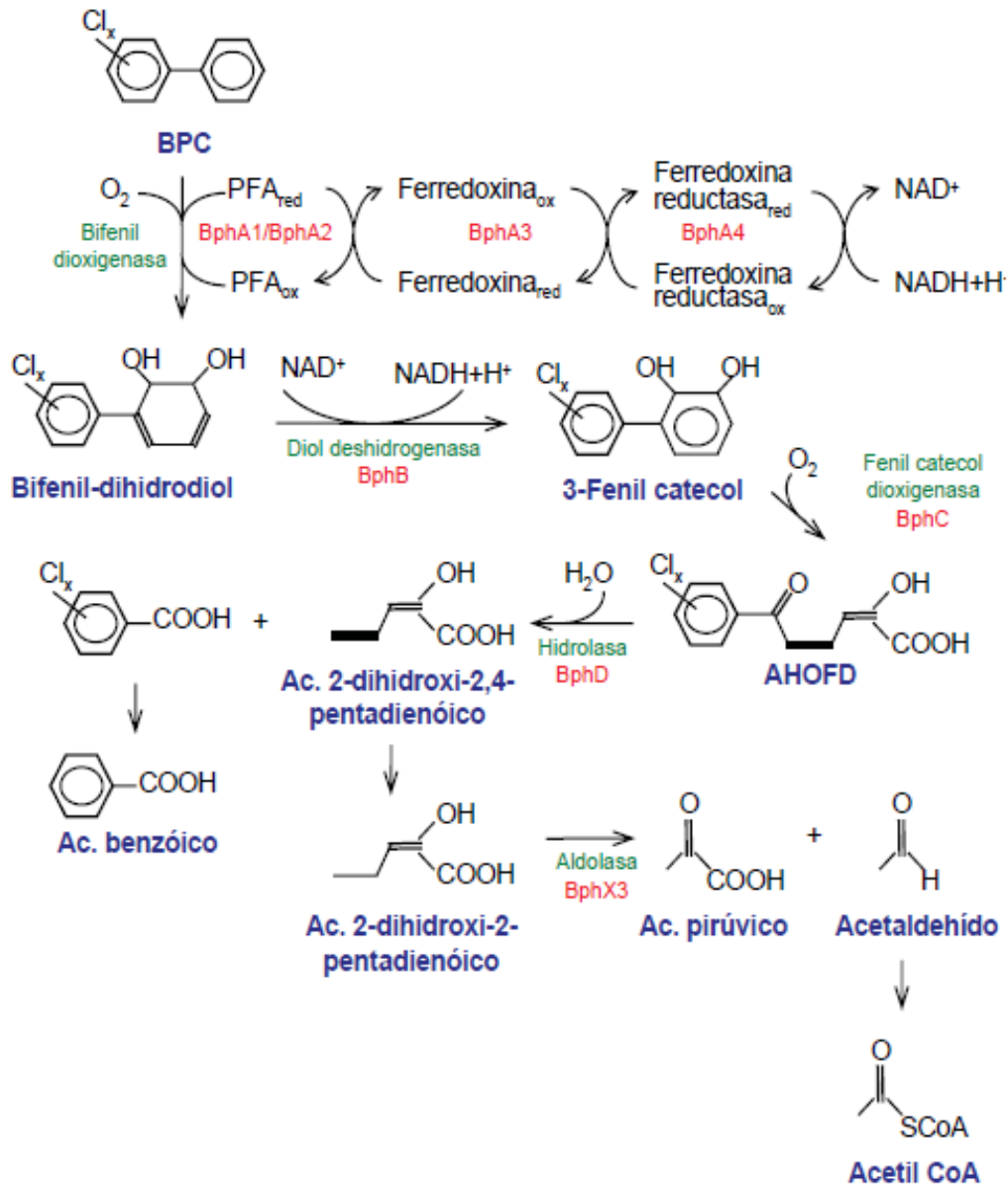


Figura 4. Vía general de degradación de BPCs por bacterias (Focht, 1995. ox=Estado oxidado; red = Estado reducido).

2.2.5. Bacterias endosimbióticas

Es bien sabido, aunque poco documentado, que lombrices de tierra transforman la materia orgánica gracias a la actividad de la microflora mutualista que ingresa a su tracto digestivo a través de la ingestión de material orgánico en diferente grado de descomposición y suelo.

Varios estudios clásicos ilustran que el microhábitat del intestino de la lombriz posee una equivalente carga microbiana comparada con el suelo, haciendo un microbioma metabólicamente activo. En las últimas décadas, los avances en técnicas de microscopía electrónica de barrido y microscopía de epifluorescencia han llevado en gran parte hacia el desciframiento de la comunidad microbiana del intestino de la lombriz, de una manera más efectiva. 16S rDNA basada en reconocimientos clonales de DNA del intestino de lombriz, Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización (DGGE) (Singh et al 2015). La microscopía fluorescente ha sido usada para estudiar variaciones de la población bacteriana dentro de cada segmento intestinal de las Oligochaetas.

Desde que se descubrió la simbiosis en los nefridios de *Eisenia foetida*, varios estudios con respecto a la colonización bacteriana de los nefridios de las lombrices han sido reportados (Davidson *et al.*, 2006; Pinel *et al.*, 2008; Lund *et al.*, 2010). Davidson (2006) demostró que los simbiosis en los nefridios son directamente transferidos de los adultos a las cápsulas durante el apareamiento, y no son adquiridos del medio ambiente en *Eisenia foetida*.

Los nefridios son órganos osmoregulatorios-excretorios presentes en cada segmento del cuerpo de la lombriz, de acuerdo con los descubrimientos de Schram *et al.*, (2003) se encontró que esas bacterias pueden ser proteolíticamente activas durante la excreción,

facilitando la absorción de péptidos y aminoácidos por el anfitrión. Hasta qué punto esta asociación influye sobre la excreción de nitrógeno por las lombrices, es la consecuencia de que el ciclo del nitrógeno en el suelo es aún desconocido (Zirbes, Thonart, & Haubruge, 2012).

En los estudios sobre bacterias dentro del intestino de la lombriz mediante diversos métodos y técnicas han sido usados los cuales han ayudado a identificar especies de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Azotobacter*, *Serratia*, *Aeromonas* y *Enterobacter* (Byzov *et al.*, 2007; Singleton, *et al.*, 2003). Estas bacterias son principalmente promotores de crecimiento de plantas fijadoras de nitrógeno de vida libre y solubilizadores de fosfatos (Martínez Romero *et al.*, 2007). Cabe mencionar que la supervivencia de los microorganismos en el intestino de la lombriz depende de su capacidad para resistir las enzimas digestivas microbianas, mucosa intestinal, CaCO_3 , o sustancias bacteriostáticas y microbianas (Zirbes, Thonart & Haubruge *et al.* 2012).

Byzov *et al.* 2009 reportó en un estudio evidencia de simbiosis en el intestino de la lombriz de tierra. Encontraron algunos microorganismos en el intestino de la lombriz que estaban ausentes en el suelo circundante. Aun así la presencia de todas las bacterias en el intestino de la lombriz y en el suelo, no permite determinar si las comunidades bacterianas comparten una simbiótica o mutualista interacción metabólica con las lombrices de tierra (Thakuria *et al.*, 2010).

Nueva evidencia revela un mayor sistema simbiótico y complejo en *Eisenia foetida* que involucran a 3 simbiosis bacterianas de diferentes clases: *V. eiseniae*, una Microbacteriaceae y una Flexibacteriaceae. La presencia de esas 3 bacterias en las cápsulas y en lombrices adultas confirmó que son simbiosis asociados de *Eisenia foetida* y transmitidos a la siguiente generación (Davidson *et al.*, 2010).

CAPITULO III

3. Justificación.

En diversos estudios, *Eisenia foetida* se ha empleado como indicador biológico de la estabilización de la materia orgánica y contaminación ambiental por compuestos xenobióticos (Bifenilos Policlorados BPC para este estudio) estas contienen en su tracto digestivo microorganismos endo-simbiontes capaces de biodegradar una amplia gama de compuestos contaminantes, y de acelerar su proceso de degradación siempre y cuando se mantengan en condiciones óptimas.

Así también, existen informes en los que demuestran que las lombrices de tierra podrían acelerar la eliminación de BPC mediante el aumento de la abundancia y distribución de microorganismos, específicamente bacterias asociadas a la degradación de estos compuestos. Es por ello, que es necesario el estudio de endobacterias asociadas al intestino de la lombriz de tierra *Eisenia foetida* que estén involucradas en procesos de degradación y/o remoción de congéneres de BPC's.

Las enzimas dioxigenasas son las responsables de la degradación de los bifenilos policlorados actuando en las posiciones orto de los anillos que le conforman, permitiendo la degradación del compuesto, la identificación de microorganismos que sean capaces de biosintetizar esta familia de enzimas, beneficiaria a los procesos de biorremediación que involucran trabajar con esta clase de contaminantes.

CAPITULO IV

4. Objetivos

4.1.1. Objetivo general

- Analizar la influencia de las bacterias endosimbióticas aisladas del sistema digestivo de la lombriz *E. foetida* sobre la remoción de BPC's (decaclorobifenilo).

4.1.1.1. Objetivos específicos

- Evaluar el potencial de remoción en cepas bacterianas endosimbióticas de la lombriz *E. foetida* sobre decaclorobifenilo a una concentración de 1000 ppm.
- Determinar la(s) cepa(s) que presente(n) mejor potencial de remoción en un sistema de cultivo líquido (utilizando el medio Infusión Cerebro Corazón) contaminado a una concentración de 1000 ppm con decaclorobifenilo.

Capítulo V

5. Planteamiento del problema

Debido a las propiedades físico-químicas que presenta el Decaclorobifenilo, congénere perteneciente a la familia de los Bifenilos Policlorados (BPC´s), fue ampliamente utilizado en México en diversos tipos de industria, sin embargo, estas mismas características los convierten en compuestos de gran peligrosidad, provocando diversos problemas medio ambientales y a la salud de las personas, aunque existen diversos métodos para eliminarlos, son costosos o con bajos rendimientos, por ello, la biodegradación de BPC´s, se ha propuesto como una alternativa más sustentable, efectiva y económica para resolver este problema, nosotros proponemos el uso bacterias endosimbióticas aisladas del sistema digestivo de la lombriz *E. foetida* para lograr la remoción de Decaclorobifenilos.

Capítulo VI

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. Ubicación del proyecto

Se realizó del 5 de agosto al 5 de diciembre del de 2016, El experimento se llevó a cabo en el laboratorio 1 del Polo Biotecnológico, ubicado en el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez., Chiapas, donde se cuenta con infraestructura para análisis fenotípico y genotípico de microorganismos, ubicado en Carretera Panamericana Km.1080, Terán, 29050.

El BPC utilizado fue decaclorobifenilo de la marca SIGMA ALDRICH, debido a que representa el congénere más clorado de todos los existentes conteniendo un átomo de cloro en cada átomo de carbono, 10 en total.

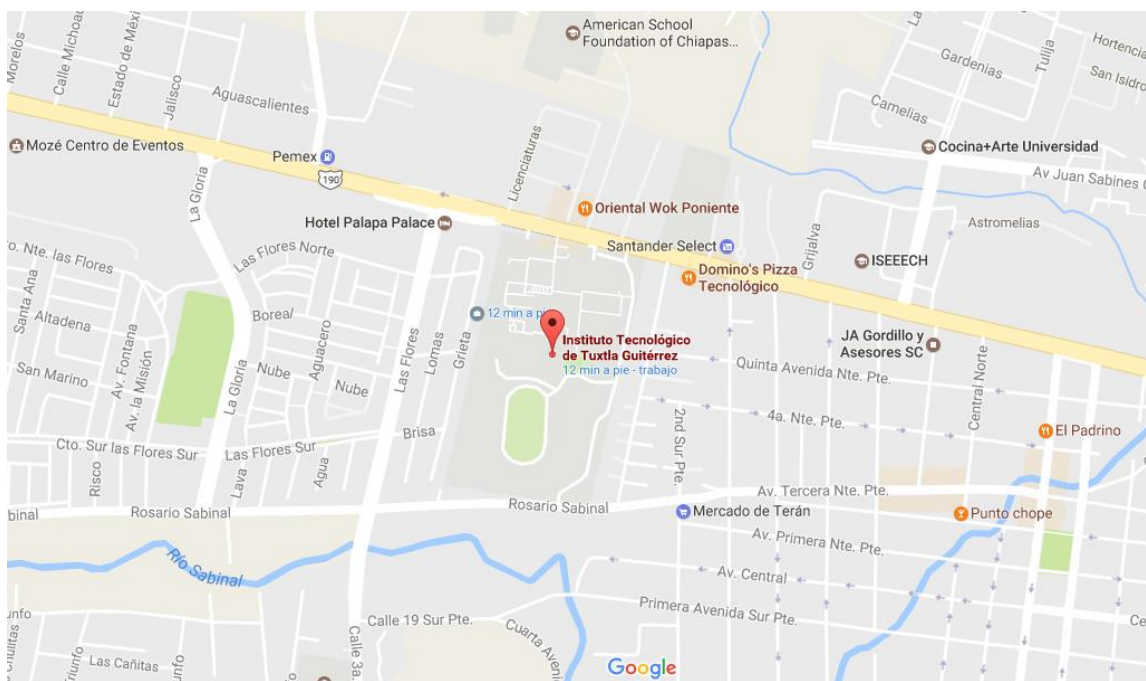


Figura 5. Ubicación del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, lugar donde se llevara a cabo el experimento.

6.1.1. Preparación de la solución de BPC's

Una cantidad de 100 mg de decaclorobifenilo se agregaron a 100ml de pentano en un matraz aforado de 100 ml, para obtener una solución madre a una concentración de 1000ppm. Homogenizando con sonicador durante 40 min.

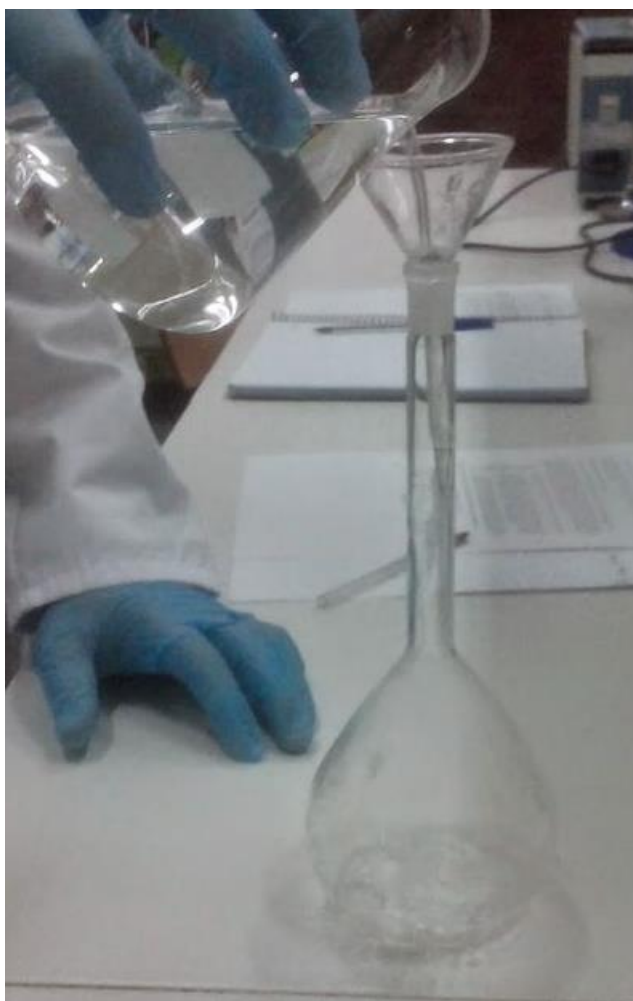


Figura 6.Preparación de Decaclorobifenilo, para una concentración final de 1000 ppm.

6.1.2. Cepas bacterianas

Las cepas utilizadas durante el desarrollo del experimento fueron *Klebsiella sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus sciuri*, la cual se conservaron en criopreservación en un congelador marca Thermo Scientific, en tubos Eppendorf con 1.0 mL de solución que contenía el 60% de glicerol y el 40% del caldo ICC a -20°C .

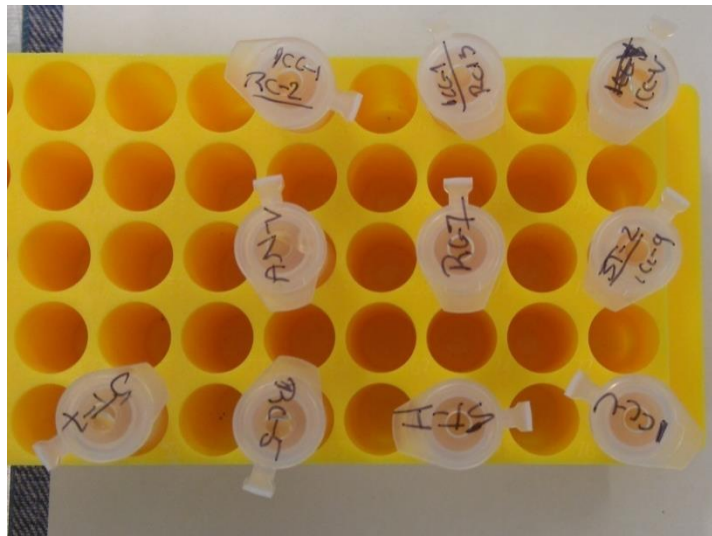


Figura 7. Cepas bacterias endosimbióticas aisladas del sistema digestivo de la lombriz *E. foetida* guardadas en Glicerol para su conservación.

6.1.3. Reactivación de bacteriana

Se retiró un tubo del congelador, verificando que el tubo estuviera sellado y se esperó hasta la descongelación, para reactivar la cepa se empleó el medio de cultivo ICC con la siguiente Composición por litro: 7.5 g de Infusión de Cerebro de Corazón de Ternera, 10g de Infusión de Corazón de Res, 2 g de D(+)-Glucosa, 10 g de Peptona de Gelatina, 5 g de Sodio Cloruro, 2,5g de di-Sodio Hidrógeno Fosfato, a un pH:

7,4±0,2. Todos los componentes sólidos se disolvieron en un litro de agua destilada, se calentaron a ebullición y se esterilizaron a 121 lb/pulg² por 15 minutos en una autoclave marca Yamato SK100C, se dejó enfriar hasta 55 °C luego se colocaron de 20-25 mL de medio en cajas Petri dejando enfriar hasta solidificar. Se tomaron 50 µl del cultivo previamente descongelado y se sembraron en las cajas Petri con medio de cultivo previamente preparado y solidificado utilizando la técnica de estría cruzada se incubaron a 30°C por 24 horas en una incubadora marca Thermo Scientific.

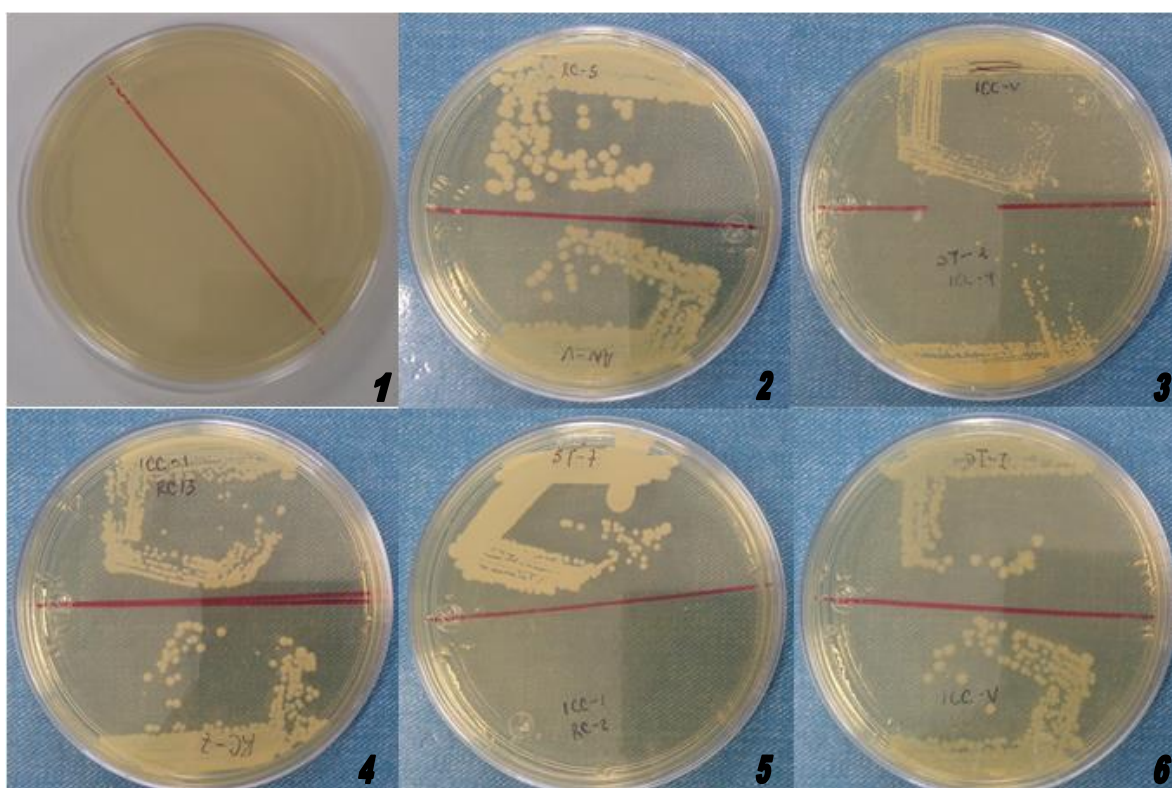


Figura 8. Cepas bacterias endosimbióticas aisladas del sistema digestivo de la lombriz *E. foetida* inoculadas en medio solido Infusión Cerebro Corazón (ICC. La imagen No.1 muestra una caja de medio ICC sin inocular como blanco. La cepa RC-2, imagen 5, presenta la menor tasa de crecimiento, es necesario mayor tiempo de inoculación para observar su desarrollo).

6.1.4. Extracción de ADN genómico

La extracción del ADN genómico de las cepas, se realizó mediante el kit comercial ZYMO® Research, Se tomó una asada del cultivo desarrollado en las cajas de Petri y se suspendió en 400 μ L de agua contenida en un tubo Eppendorf, la suspensión microbiana se depositó en un tubo de lisis, adicionándose 750 μ L de solución lisis al tubo, se mezcló en vortex por 5 min y se centrifugó a 10,000 rpm por 1 minuto. Se tomaron 400 μ L de la solución del tubo de lisis y se colocaron en el filtro Zymo-Spin IV con tubo colector, centrifugándose a 7,000 rpm por 1 min, el sobrenadante se recuperó en tubo colector, se adicionaron a 1,200 μ L de solución de unión de ADN, se colocaron 800 μ L de la mezcla anterior a una columna IIC con tubo colector, centrifugándose a 10,000 rpm por 1 min y se desechó el sobrenadante repitiéndose este paso para los 800 μ L restantes; después se añadieron 200 μ L de solución de pre-lavado a la columna IIC, se centrifugó a 10,000 rpm por 1 min y se desechó el sobrenadante; posteriormente se añadieron 500 μ L de buffer de lavado a la columna IIC, se centrifugó a 10,000 rpm por 1 min, y se desechó el sobrenadante; finalmente se transfirió la columna IIC a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se le adicionaron 30 μ L de solución de elución de ADN y se centrifugó a 10,000 rpm por 30 segundos, posteriormente la calidad del ADN extraído se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X, y analizado en un fotodocumentador UV-320 nm.

6.1.4.1. Electroforesis de ADN extraído

Se preparó gel de agarosa al 1% con buffer TAE al 1X de 50 mL, el gel fue sumergido en TAE 1X en una cámara de electroforesis luego de solidificar, los posos del gel fueron cargados en una mezcla de 5µL de ADN extraído de cada una de las cepas a analizar, y 2µL de Syber Green al 6X (Biorad®), 2µL de marcador de peso 1kb, y esto se corrió a 115 volts por 30 minutos, luego fue revelado en fotodocumentador UV-320 nm.

6.1.5. Amplificación del gen 16S rRNA por PCR

Se amplificó el gen 16S rRNA, a partir de ADN total extraído de las cepas, usando los primers universales fD1-rD1 y también los primer's 27F-1492R (Weisburg *et al.*, 1991), a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se preparó la siguiente mezcla de reacción (Cuadro 2).

Reactivo	1X (µl)
fD1 o 27F	1
rD1 o 1492R	1
Mg (50mM)	3
Buffer 10X	10
dNTP's (10mM)	0.8
Taq polimerasa	0.5
DNA total	1
H2O miliQ	82.7
Total	100

Tabla 2. Mezcla de reacción para 16S.

Posteriormente se amplificó el gen 16S rRNA, por medio de la PCR con el siguiente programa (Figura 10).

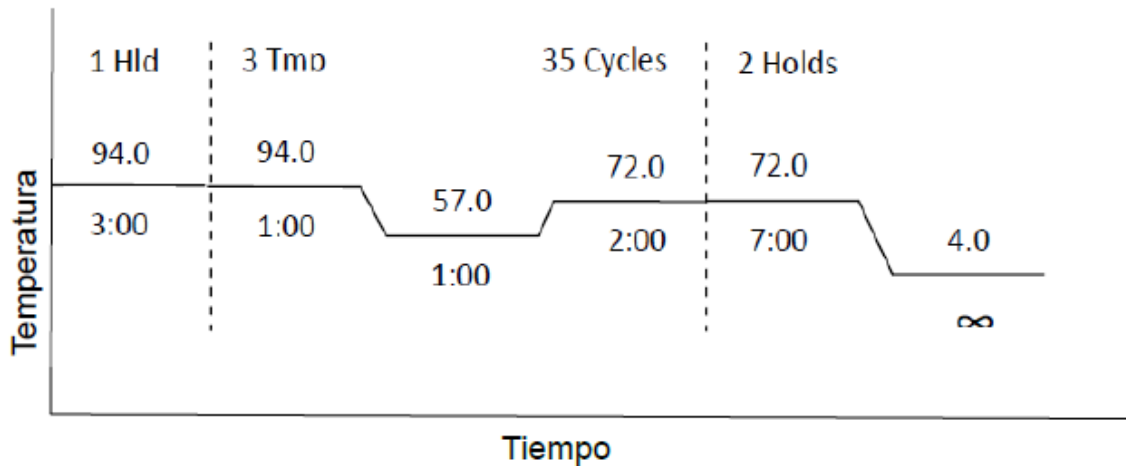


Figura 9. Programa utilizado para amplificar el gen 16S rRNA

6.1.5.1. Electroforesis del ampliación 16S rRNA

Los productos de la PCR 16S rRNA se cargaron en un gel de agarosa al 1%, colocando 5µL del producto de PCR de cada muestra y 3µL de Syber Green al 6X, usando 2µL de marcador de peso molecular 1kb. Las muestras se corrieron a 115 volts por 40 minutos.

6.1.6. Purificación y secuenciación del gen 16S rRNA

Los productos de PCR para amplificar el gen 16S rRNA fueron purificados, para liberar al fragmento amplificado de los residuos de la PCR, usando el kit "*PCR product purification system*" de la marca Roche™. Cada producto de PCR fue ajustado a un volumen de 100µL, al cual se le adicionaron 500µL del buffer de unión (*Binding Buffer*) y fue mezclado cuidadosamente, posteriormente se pasó esta mezcla a un tubo con un filtro insertado sobre un tubo recolector y las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 1 minuto. La solución que pasó a través del filtro fue descartada. Enseguida se les adicionó 500 µL de

buffer de lavado (*Wash Buffer*), se centrifugaron nuevamente a 13000 por 1 minuto y el filtrado fue desechado. Se realizó un segundo lavado con 200 μ L del buffer de lavado y se centrifugaron nuevamente, el filtrado fue desechado. A continuación el tubo con el filtro se trasladó a un tubo Eppendorf nuevo estéril de 1.5 mL y se colocaron 85 μ L de buffer de elución (*Elution Buffer*) y se centrifugó nuevamente durante un minuto para obtener el ADN purificado.

Los productos purificados de la PCR del gen 16S rRNA (1,500 pb) fueron secuenciados por la Unidad de Secuenciamiento Masivo del Instituto de Biotecnología (SSU-IBT-UNAM, México). Las secuencias fueron editadas con el BioEdit v.7.0.0 (Hall, 1999). La Herramienta de Alineamiento de Básica Local (BLAST) del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y secuencias tipo obtenidas del Proyecto de Base de Datos Ribosomal (<http://rdp.cme.msu.edu>) fueron usadas para búsqueda de secuencias similares. Las secuencias fueron alineadas con CLUSTAL_X v1.8 (Thompson et al., 1997). El Análisis filogenético y evolución molecular fue realizado con MEGA v. 5.2. (Kumar et al., 2004). El árbol filogenético fue construido con las secuencias del gen 16S rRNA de cada una de las cepas usando el método Neighbour-Joining con 1000 pseudoreplicas y con el modelo evolutivo Tamura-Nei (Kimura, 1980).

6.2. Diseño experimental

6.2.1. Acondicionar las cepas a medio de cultivo líquido

Se tomaron muestras de biomasa de cada una de las cepas bacterianas puras, de 2 a 3 veces con el palillo y se resuspendieron en 1 ml de medio Infusión Cerebro Corazón (ICC), posteriormente se llevó a vortex por 20 seg, hasta homogeneizar el medio.

El medio ICC (1 ml) con cepa resuspendida, se adiciono a un tubo de ensaye de 18x150 mm con 15 ml de medio ICC estéril. Cada uno de estos tubos, con la respectiva cepa inoculada, se mantuvo en agitación constante de 120 rpm durante 24 hrs, para asegurar un óptimo crecimiento.

6.2.2. Crecimiento en sistema de cultivo liquido

Para inoculación de cada una de las cepas en medio liquido con presencia de BPC´s a 1000 ppm, se procedió de la siguiente manera:

Se esterilizaron siete matraces Erlenmeyer de 125 ml y un matraz extra con 175 ml de medio ICC a 120 lb de presión por 15 min, en condiciones estériles, se adiciono a cada uno de ellos 20 ml de la solución de pentano con decaclorobifenilo a 1000 ppm, dejando evaporar el pentano de cada uno de los matraces.

A cada uno de los matraces se les adiciono 25 ml de medio ICC estéril, para disolver el decaclorobifenilo fue necesario emplear un sonificador por 15 min. Cada uno de los matraces contaba con un volumen final de 25 ml de medio ICC estéril contaminado con decaclorobifenilo a 1000 ppm.

En condiciones asépticas, cada matraz rotulado, fue inoculado con 2.5 ml de medio ICC procedente de las cepas acondicionadas en medio liquido en tubos de ensaye, los matraces se dejaron en condiciones de agitación a 120 rpm durante 72 hrs, debido al lento crecimiento presentado.

6.3. Extracción de decaclorobifenilo en medio de cultivo

Usando la técnica modificada de Bokvajova et al., (1994), para medir la cantidad de DCB remanente en el medio en Tf (tiempo final), usando 20 mL de caldo se agregó pentano en una relación 1:1 (v/v) manteniendo durante 20 minutos en vórtex y 30 minutos en sonicador. La fase orgánica obtenida o sobrenadante se separó y concentró hasta 1mL de solución, el proceso se repitió 3 veces.

6.3.1. Extracción de decaclorobifenilo en biomasa

El pellet producido de cada una de las bacterias evaluadas, la muestra se centrifugó a 4000 rpm por 5 min y al pellet se trató con el Método modificado de Valenzuela-Encinas *et al.* (2008) al cual se le agregó 15mL de pentano después del choque térmico agitando durante 30 minutos en sonicador, separando la fase orgánica y dejando concentrar hasta 1mL, se repitió el método tres veces.

6.3.2. Cuantificación de decaclorobifenilo

La concentración de decaclorobifenilo fue cuantificada GC-MS, usando un cromatógrafo marca Agilent Technologies 7890 A (Marca, Modelo, Ciudad, País), equipado con una columna PE-XLB (30 m x 0.25 μ m x 0.25 mm), la fase móvil fue helio a una presión de 16 psi, manteniendo un flujo de 1.4 mL/min. La temperatura de inyección fue de 110 °C, temperatura del detector de 150 °C, temperatura inicial de 110 °C por 0.5 min y temperatura final: 320 °C. El tiempo de retención del decaclorobifenilo fue de 14.25. Esta determinación fue realizada por triplicado.

6.3.3. Análisis estadístico

Se utilizó un análisis de comparación de medias t-student a un nivel confianza (1-alfa) del 95%, para evaluar el potencial de remoción del decaclorobifenilo. Los datos generados fueron analizados mediante el empleo del paquete estadístico Statgraphics Centurion XV versión 15.205, considerando un nivel de significancia de ($P < 0.05$).

CAPITULO VII

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1. Caracterización fenotípica de las bacterias

Las características morfológicas de las cepas bacterianas aisladas del intestino de la lombriz de tierra *Eisenia foetida* se muestran en la Tabla 4. Todas las cepas bacterianas presentaron forma de bacilos pequeños y fueron Gram negativo, con excepción de las cepas ST-07 e ICC-V, que fueron Gram (+). El medio de cultivo Rojo Congo, resulto el más adecuado para el aislamiento de las endobacterias asociadas a la lombriz de tierra. En este medio la mayor parte de las cepas produjeron exopolisacáridos.

Tabla 4. Morfología de las colonias de las cepas bacterianas aisladas de *Eisenia foetida* cultivadas diferentes medios de cultivo

Morfología de las colonias.					
No.	Cepa	Tamaño mm	Color	Morfología	Tinción de Gram
1	RC-05	1-3	Crema	Redondas, bordes lisos, cóncavas, cremosos	Gram (-)
2	RC-02	3-5	Amarillas	Creemosas, redondas, bordes regulares	Gram (-)
3	ST-07	1-2	Crema	Redondas, planas, bordes regulares, brillosas.	Gram (+)
4	ICC-V	1-3	Crema	Creemosas, redondas, bordes regulares, brillosas.	Gram (+)
5	ST-02	1-3	Cremas	Planas, borde regular, brillosas.	Gram (-)
6	RC-07	1-2	Transparentes	Redondas, bordes regulares, opacos.	Gram (-)
7	RC-13	1-2	Crema	Redondas, bordes regulares, brillosos.	Gram (-)

7.2. Extracción de ADN

En la figura 10 se muestra la electroforesis de ADN total obtenido de las 7 cepas estudiadas. En el primer carril se muestra el marcador molecular 1 kb y en las siguientes carriles los ADN de los aislados. Cabe señalar que se obtuvo ADN de calidad de aproximadamente 10000 pb (120 ng/ug aprox) con respecto al marcador utilizado, cantidad adecuada para las diferentes pruebas genéticas que se realizaron posteriormente.

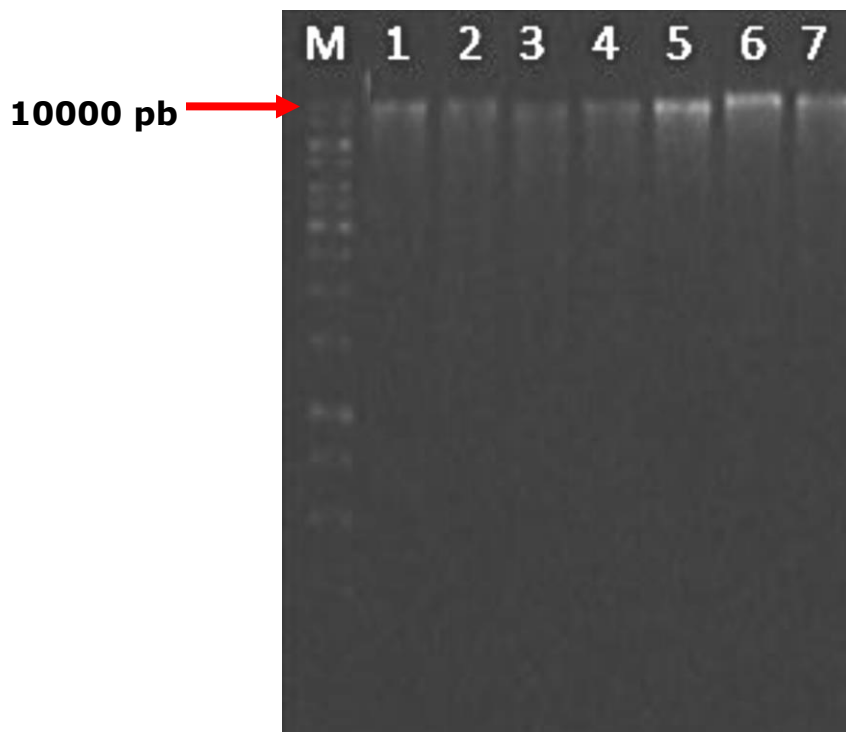


Figura 10. Gel de electroforesis de ADN

7.2.1. Amplificación del gen 16S rRNA

Se les realizó la amplificación del gen 16S rRNA. Los fragmentos amplificados se muestran en las figuras 11, con un tamaño estimado de 1500 pb.

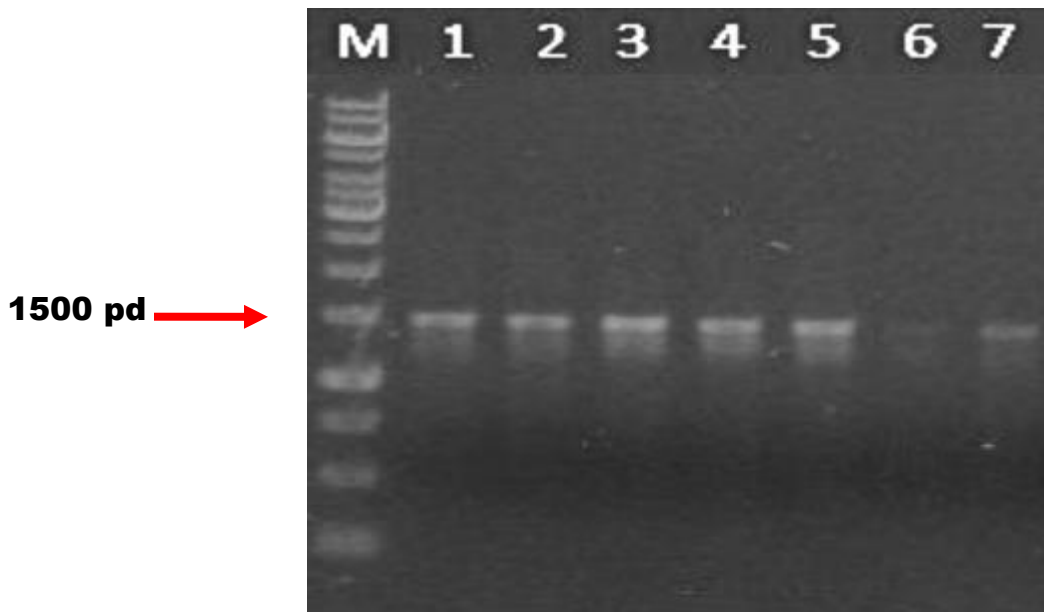


Figura 11. Electroforesis del gen16S rRNA amplificado.

7.2.2. Purificación del gen 16s rRNA

Los productos de PCR del gen 16S rRNA de las cepas fueron purificados para mandar a secuenciación en el Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM en Cuernavaca, Morelos. La calidad de la purificación se observó en electroforesis en gel de agarosa al 1%.

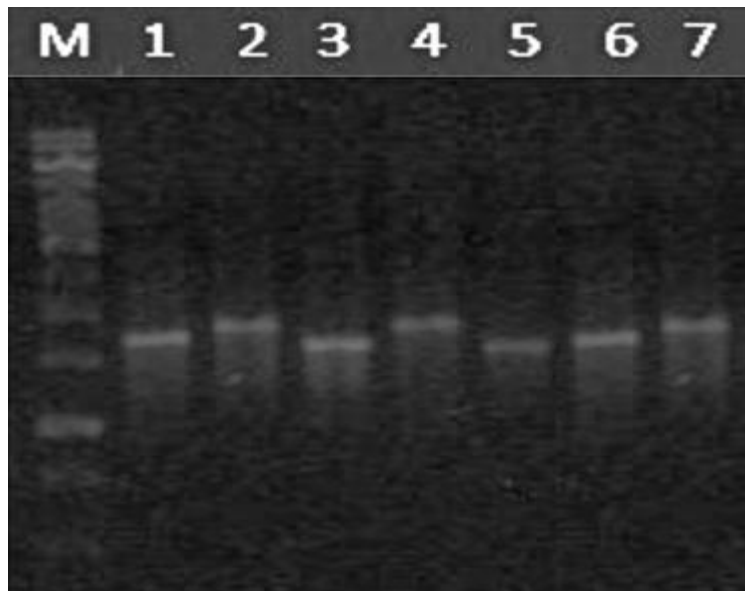


Figura 12. Gel de electroforesis de los fragmentos del gen 16s rRNA purificados.

7.2.3. ANALISIS FILOGENETICO del gen 16S rRNA de las cepas bacterianas.

Las secuencias del gen 16S rRNA obtenidas de esas cepas fueron alineadas con otras secuencias de diferente género, como *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Acinetobacter* y *Staphylococcus*, las cuales fueron usadas como referencia para el análisis filogenético. De esta manera, los árboles filogenéticos fueron construidos por el algoritmo de Neighbor-Joining, usando las secuencias de los genes 16S rRNA de cepas tipo, representantes de los géneros bacterianos antes mencionados.

Con respecto a las bacterias aisladas se obtuvieron como resultados, la cepa RC-05 tuvo una similitud del 99.0% con *Enterobacter xiangfangensis*, la cepa RC-07 tuvo una similitud del 96.1% *Klebsiella pneumoniae*, la cepa RC-13 con una similitud del 100.0% con *Bacillus cereus*, la cepa ST-02 con un 98.4% a *Acinetobacter schindleri*, la cepa

ST-07 con un 99.7% a *Staphylococcus sciuri* y la cepa ICC-V con un 98.2% tiene una similitud con *Pseudomonas extremaustralis*.

7.3 Extracción del DCB en el sistema de cultivo líquida

Con la metodología seguida para la extracción del contaminante en el sistema de cultivo líquido, como puede apreciarse en la figura 13, se logró una extracción de un 33.05% del DCB presente en el medio, aunque el porcentaje recuperado fue menor al 50% de la concentración inicial de DCB (1000 ppm), los datos obtenidos representan una valiosa aportación que permite conocer de una mejor manera el comportamiento que presentan las cepas aisladas del intestino de la lombriz *E. foetida*. Así mismo, estos datos permitirán mejorar la metodología empleada para la extracción del contaminante, logrando aumentar la eficiencia de extracción de DCB.

Eficiencia de Extracción de DCB.

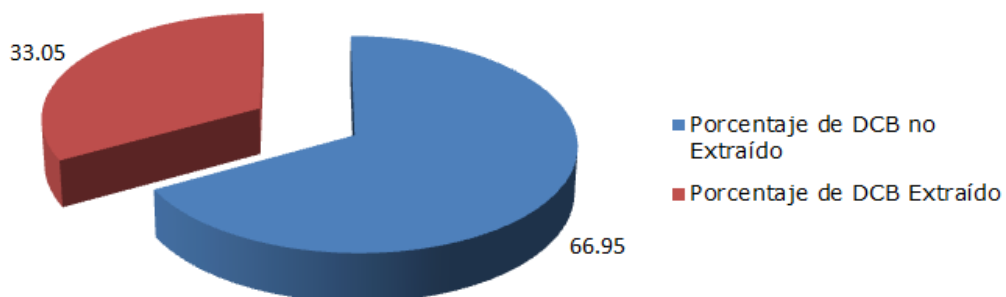


Figura 13. Eficiencia de Extracción de DCB expresado en porcentaje, se logró una eficiencia de extracción del contaminante en un 33.05%.

De acuerdo a los análisis realizados con el cromatógrafo de gases, se obtuvieron datos que permitieron la elaboración del cuadro 5, en el cual se aprecia la concentración final de DCB presente en el caldo y en la

biomasa celular, teniendo en cuenta el porcentaje de remoción, la máxima cantidad extraída de contaminante fue de 346.49 mg L⁻¹ y 54.65 mg L⁻¹ la mínima cantidad, estos datos se obtuvieron de la siguiente forma:

- Tomando como referencia la concentración inicial de DCB en el caldo (1000 ppm o 1000 mg L⁻¹) se dividió entre el porcentaje de eficiencia de extracción (33.05%), este resultado (330.57 mg L⁻¹) se interpretó como la cantidad de DCB que es posible extraer de acuerdo a la metodología empleada.

A este nuevo dato obtenido, se le resta la concentración final de DCB en el caldo, obteniendo así, los datos para la concentración final removida durante el muestreo.

Cuadro 5. Eliminación potencial de contaminante por acción de bacterias aisladas del intestino de la lombriz de tierra *Eisenia fetida* en medio de cultivo contaminado con DCB.

Cepa Bacteriana.	Concentración final de DCB en el caldo. (mg L ⁻¹)	Concentración final de DCB en la biomasa celular. (mg L ⁻¹)	Concentración final removida durante el muestreo (mg L ⁻¹)	% de DCB removido o reducido.	% de DCB bioacumulado en la biomasa celular.
<i>Pseudomonas extremaustralis</i> ADA-5	4.01	219.7	326.49	98.78	66.47
<i>Staphylococcus sciuri</i> ADA-12	6.12	162.74	324.38	98.14	49.24
<i>Acinetobacter schindleri</i> ADA-15	275.85	57.3	54.65	16.53	17.33
<i>Bacillus cereus</i> ADA-18	231.65	73.13	98.85	29.90	22.12
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ADA-19	201.07	65.51	129.43	39.16	19.82
<i>Enterobacter xiangfangensis</i> ADA-20	131.19	47.14	199.31	60.30	14.26

a) Los medios seguidos por la misma letra mayúscula no muestran diferencias significativas (prueba de Tukey, P <0,05).

b) Concentración inicial de DCB en el medio de cultivo: 1000 mg L⁻¹

c) Porcentaje de eficiencia de extracción: 33.05 %

Así mismo, con los datos del cuadro 5, se logró obtener un perfil del porcentaje de DCB bioacumulado en la biomasa celular (Figura 14), analizando el gráfico, se observa que la cepa *Pseudomonas extremaustralis* presenta un mejor potencial para la remoción de DCB al bioacumular este contaminante, seguido de *Staphylococcus sciuri*, ambos microorganismos demuestran tener potencial biotecnológico para su empleo en la biorremediación de suelos contaminados con esta clase de contaminante.

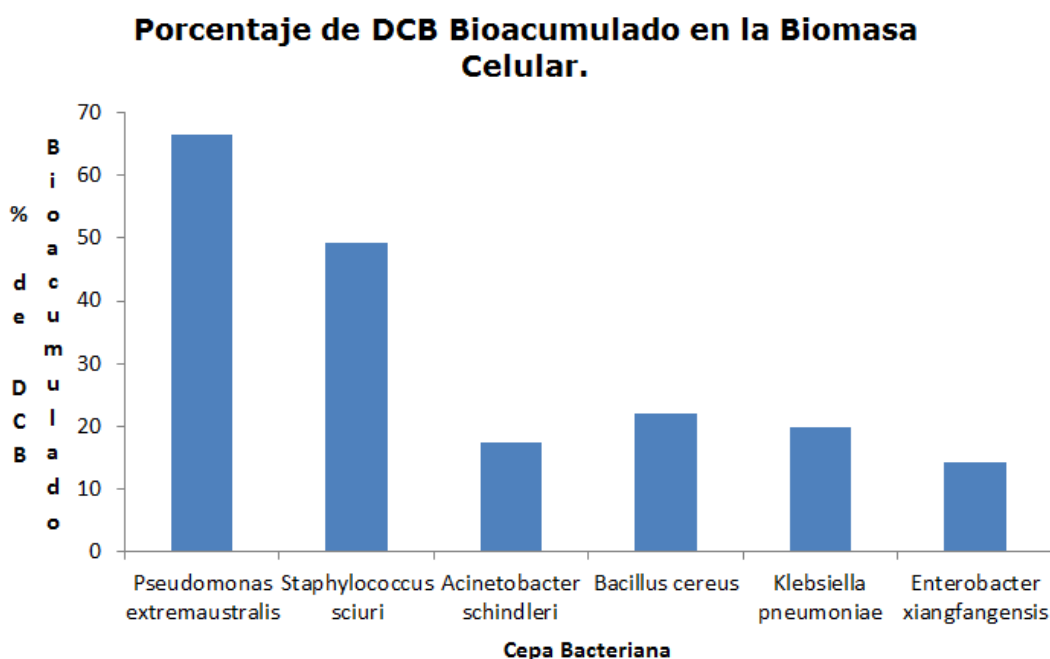


Figura 14. Gráfico de Barras donde se observa el porcentaje de DCB Bioacumulado en cada una de las Cepas Bacterianas analizadas, *Pseudomonas extremaustralis* y *Staphylococcus sciuri* presentaron los mayores porcentajes de Bioacumulación.

Capítulo VIII

8. Conclusión

A partir de los datos obtenidos en esta investigación, se logró determinar la influencia que presentan las cepas bacterianas endosimbióticas aisladas del sistema digestivo de la lombriz *E. foetida* sobre la remoción de BPC's (decaclorobifenilo), encontrándose que *Pseudomonas extremaustralis* presenta un mejor potencial para la remoción de DCB al bioacumular el contaminante dentro de sus células, posiblemente, las enzimas que poseen, son incapaces de degradar compuestos como el DCB.

Así mismo, fue posible evaluar el potencial de remoción que presentaba cada cepa sobre el contaminante decaclorobifenilo, encontrándose que *Pseudomonas extremaustralis* y *Staphylococcus sciuri*, presentan características que permitirían su empleo en un sistema de biorremediación de suelos contaminados, ya que fueron estas cepas las que presentaron mayores porcentajes de DCB bioacumulado en la biomasa celular.

Capítulo IX

9. Referencia bibliográficas

- Abraham WR**, NOGALES B, GOLYSHIN PN, PIEPER DH, TIMMIS KN. Polychlorinated Biphenyl-Degrading Microbial Communities in Soils and Sediments. *Curr Opin Microbiol.*2002; 5: 246-253.
- Abramowicz**, D.A. (1990). Aerobic and anaerobic biodegradation of PCBs: A review. *Critical of Review Biotechnology*, 10, 241-251.
- Álvarez** González Obed, 2015. "Biodiversidad genética de endobacterias asociadas a la lombriz de tierra *Eisenia foetida*". Instituto tecnológico de tuxtla gutiérrez. Pag: 9-29,
- Anzai**Y, Kim H, Park, JY, Wakabayashi H (2000). «Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence :) ». *Int J SystEvolMicrobiol* **50**: 1563-89
- Arbeli**Z. 2009. Biodegradación de compuestos orgánicos persistentes (COP): el caso de los Bifenilos Policlorados (PCB). *Actabiológica colombiana*, 14(1): 55-86.
- Asha** A., Sanjeev K., Ackmez M. 2010. A comprehensive overview of elements in bioremediation: A review. *Rev Environ Science Biotechnology*, 9:215–288.
- Beecher** D.J., Wong A.C.L. (1997) Tripartite hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Hemolytic analysis of component interaction and model for its characteristic paradoxical zone phenomenon. *J. Biol. Chem.* **272**, 233–239.
- Byzov**, B. A., Thanh, V. N., & Babveja, I. P. (2009). Yeasts associated with soil invertebrates. *Biology and Fertility of Soils*, 183-187.
- Cortinas** de Nava C. 2003. Diagnóstico Nacional de Bifenilos Policlorados en México. Acosta y Asociados. Proyecto INE-1/01. Instituto Nacional de Ecología No. INE/AD-084/2001.
- Davidson**, S. K. (2006). A global survey of the bacteria within earthworm nephridia. *Molecular Phylogenetic Evolution*, 188-200.
- Fotch**, D.D. (1995). Strategies for the improvement of aerobic metabolism of polychlorinated biphenyls, *Curr Op Biotechnology*, 6, 341-346.

- Furukawa**, K. (2000). Biochemical and genetic bases of microbial degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs), *The Journal of General and Applied Microbiology*, 46, 283-296.
- Kim**, A.A., Pestsov, G.V., Yadgarov, Kh. T., Dzhumaniyazova, G.I., Zonovev, P.V., Dzhuraeva, G.T., Abdugarimovv, A.A., Gings, V.K. (2004a). Microorganisms degrading polychlorinated biphenyls, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40, 60-62.
- Kloos**, W. E.; Schliefer, K. H.; Smith R. F. (1 January 1976). "Characterization of *Staphylococcus sciurisp.nov.* and its Subspecies". *International Journal of Systematic Bacteriology*. **26** (1): 22–37
- Komancová** M., Jurcová I., Kochanková L., Burkhard J. 2003. Metabolic pathways of polychlorinated degradation by *Pseudomonas* sp. 2. *Chemosphere* 50: 537-543.
- Kubatova**, A., Erbanova, P., Eichlerova, I., Homolka, L., Nerud, F., and Sasek, V., "PCB Congener Selective Biodegradation by the White Rot Fungus *Pleurotus ostreatus* in Contaminated Soil.", *Chemosphere*, 2001, vol. 43, pp. 207–215.
- LEIGH MB**, PELLIZARI VH, UHLÍK O, SUTKA R, RODRIGUES J, OSTROM NE, *et al.* Biphenyl-Utilizing Bacteria and their Functional Genes in a Pine Root Zone Contaminated with Polychlorinated Biphenyls (PCBs). *ISME J.* 2007;1:134-148.
- Lipsky** BA, Hook III EW, Smith AA, *et al.*: *Citrobacter* infections in humans: Experience at the Seattle Veterans Administration Medical Center and a review of the literature. *Rev Infect Dis* 1980; 2:746-760.
- Lopera** E., Aguirre J. 2006. Purification of mineral insulating oil contaminated with polychlorinated biphenyls (PCB's). *Dyna*, 73: 75-88.
- López** E., Díez F. V., Ordoñez S. 2001. Contaminación por bifenilos policlorados. *Ingeniería química. Medio ambiente*: 199-207.
- Lund** T., Granum P.E. (1997) Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *Bacillus cereus*. *Microbiology* **143**, 3329–3339.
- MacDonald**, R.W., Barrie, L.A., Bidleman, T.F., Diamond, M.L., Gregor, D.J., Semkin R.G., *et al.* (2000). Contaminants in the Canadian Arctic: 5 years of progress in understanding sources, occurrence and pathways, *Science of Total Environment*, 254, 93-234.

- MACEDO AJ**, TIMMIS KN, ABRAHAM WR. Widespread Capacity to Metabolize Polychlorinated Biphenyls by Diverse Microbial Communities in Soils With no Significant Exposure to PCB Contamination. *Environ Microbiol.* 2007;9:1890-1897. **MAGAR VS.** PCB Treatment Alternatives and Research Directions. *J Environ.*
- Martínez-Romero, E.**, Guerrero, M. G., Orrillo, E. O., & Martínez-Romero, J. (2007). Buffet Hypothesis for Microbial Nutrition at the Rhizosphere. *Research Topics*, 152-164.
- MCFARLAND VA**, CLARKE JU. Environmental Occurrence, Abundance, and Potential Toxicity of Polychlorinated Biphenyl Congeners: Considerations for a Congener-Specific Analysis. *Environ Health Perspect.* 1989;81:225-239.
- ONU**, *Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants*, Estocolmo, Suecia p. 26 (2004).
- Pacheco**, 2008. Environmental Fate of Bioaccumulative and Persistent Substances. A Synopsis of Existing and Future Actions. *Rev. Gerenc. Polit. Salud, Bogotá (Colombia)*, 7 (15): 14-23.
- Pieper D.H.**, Seeger M. 2008. Bacterial metabolism of polychlorinated biphenyls. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 15: 121-138.
- Ruiz G.M.L.** 2005. Biodegradación de bifenilos policlorados (BPCs) por microorganismos. *Actauniversitaria*, 15: 19-28.
- Safe, S.H.** (1984). Microbial degradation of organic compounds. En: *Degradation of polychlorinated biphenyls*, Marcel Dekker Inc, 13, 361-369.
- SEMARNAT.** 2011. Proyecto: "Manejo y destrucción ambientalmente adecuados de Bifenilos Policlorados (BPC's) en México". Proyecto No.PNUD 00059701.
- Sierra, I.**, Valera, J.L., Marina, M.L., and Laborda, F., *Study of the Biodegradation Process of Polychlorinated Biphenyls in Liquid Medium and Soil by a New Isolated Aerobic Bacterium (Janibacter sp.)*, *Chemosphere*, 2003, vol. 53, pp. 609-618.
- Simoons-Smit A**, Verweij-van Vught A, McLaren D. The role of K antigens as virulence factors in Klebsiella. *J Clin Microbiol* 1986; 21: 133-137.

- Singh, A.,** Dushyant P, S., Rameshwar, T., Kanika, K., Ran Vir, S., Surender, S., . . . Lata, N. (2015). Taxonomic and functional annotation of gut bacterial communities of *Eisenia foetida* and *Perionix excavatus*. *Microbiological Research*, 48-56.
- Sittig, M.** 1981. Handbook of toxic and Hazardous Chemical, pp. 615-617. Park ridge, N.J,:Noyes.
- Thakuria, D.,** Schmidt, O., Finan, D., Egan, D., & Doohan, F. M. (2010). Gut wall bacteria of earthworms: a natural selection process. *The ISME Journal*, 357-366.
- UNEP.** Consideration of global measures on persistent organic pollutants (POPs). UNEP/ICL/1/INF 3. N 95-5040. Meeting of government designated experts to review and revise a global program of action to protect the marine environment from land based activities. (1995).
- Vasilyeva**G.K. and E. R. Strijakova. 2007. "Bioremediation of Soils and Sediments Contaminated by Polychlorinated Biphenyls." *Institute of Physicochemical and Biological Problems in Soil Science Vol. 76, No. 6, pp. 725-741.*
- Wiegel,** Juergen and Qingzhong Wu. 2000. "Microbial Reductive Dehalogenation of Polychlorinated Biphenyls." *FEMS MicrobialEcology*32(1):1-15.
- Zenteno** rojas adalberto. 2016."*influencia de las bacterias del sistema digestivo de la lombriz Eisenia foetida en la remoción de decaclorobifenilo*".instituto tecnológico de tuxtlagutiérrez. pag: 13-21.
- Zirbes,** L., Thonart, P., & Haubruge, E. (2012). Microscale interactions between earthworms and microorganisms: a review. *Biotechnology Agronomy Society Environmental*, 125-131.

CAPITULO XI

10. Recomendaciones

Durante la inoculación de las cepas.

- Encontramos que para la preparación de cajas Petri con medio ICC sólido, al término de vaciar en caja, exponerlas a luz UV por 20 min minimiza la posibilidad de contaminación por hongos o bacterias en casi un 100%.
- Es recomendable inocular primero una cepa en un tubo de vidrio con medio líquido antes de su inoculación en matraz, para ello, la muestra debe provenir de una caja sembrada por estría cruzada, asegurándose que se inoculara una cepa pura.
- Al inocular en matraz, para evitar contaminación cruzada, el tubo con cepa debe ser limpiado con alcohol etílico puro, además, el matraz con el medio ya preparado, debe estar expuesto a luz UV por 15 minutos para asegurarse las condiciones de esterilidad.

Durante la extracción del contaminante.

- El manejo de Pentano grado reactivo requiere de cuidados al momento de manejarlo, debido a sus propiedades fisicoquímicas, se evapora rápidamente, mantenerlo bien sellado y en condiciones de baja temperatura evitara la evaporación, otra dificultad se encontró al momento de pipetearlo, es preferible realizar este paso de la forma más rápida posible.
- Posterior al centrifugado, para la separación de las fases liquido-precipitado, es recomendable el empleo de micropipetas para evitar mezclar las fases previamente separadas.

Durante la lectura de muestras en el Cromatógrafo de gases.

- Primordialmente, se recomienda que la muestra se encuentre lo más pura y concentrada posible, sin partículas no liquidas (Biomasa celular o algún otro residuo físico) que podrían obstruir la columna del cromatógrafo.

Del experimento.

- Evaluar a concentraciones menores de DCB cada una de las cepas, así como reducir la cantidad en la fuente de carbono (Glucosa) presente en el medio de cultivo, esto con la finalidad de inducir a las cepas a emplear el DCB como una fuente de carbono.

10.1 Competencias Alcanzadas

- Formular y gestionar un proyecto, con iniciativa y espíritu emprendedor.
- Tomar decisiones, gestionar, negociar e interactuar con diversos investigadores y personal competente con temas relacionados con el proyecto.
- Manifestar conciencia del impacto de las soluciones tecnológicas en el contexto social y ecológico.
- Habilidad de convertirse rápidamente en un colaborador eficiente con un mínimo de requisitos de capacitación, como individuo y como miembro de un equipo.
- Una actitud de búsqueda de la excelencia en las actividades que realice.
- Confianza y seguridad en sí mismo, capacidad de estimar o predecir resultados, teniendo en cuenta las consecuencias de la incertidumbre.
- Capacidad y conciencia cabal de saber que se puede hacer un trabajo, que se puede hacer bien y que los resultados van a ser correctos.
- Trabajar bajo presión, es decir, entregar buenos resultados antes o en el plazo fijado, independientemente de las circunstancias particulares que afectan a la obtención de los resultados.
- Dominio del idioma inglés.
- Facilidad de comunicarse en público (investigadores, ingenieros, proveedores, consumidores, sociedad en general).
- Proactivo, dinámico, responsable, excelentes relaciones interpersonales, espíritu de servicio.
- Manejo de personal, capacidad de organización y distribución de actividades (roles).

- Manejo de PC, paquetería Windows® y Office® y tener la capacidad de aprender y dominar software específico.
- Manejo de nuevas herramientas y técnicas Bioquímicas y Biología Molecular.

CAPITULO XII

11. Anexos

11.1. Taxonomía de Cepas identificadas.

11.1.1 *Bacillus cereus*.

Dominio: Bacteria

Filo: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Bacillaceae

Género: Bacillus

Especie: *B. cereus*

"*Bacillus cereus*."NCBI website.Accessed on November, 2016.

Caracterizado por ser un bacilo gram positivo, que forma esporas, móvil, aeróbico que también crece bien anaeróbicamente.Se ha identificado a *B. cereus* como causante de dos tipos diferentes de intoxicación alimentaria: el tipo diarreico y el tipo emético.



Figura 15.Micrografía de *B. cereus* con tinción de Gram (+).

***Klebsiella pneumoniae*.**

Dominio: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Klebsiella*

Especie: *K. pneumoniae*

(Schroeter 1886) Trevisan 1887

Caracterizado por ser un bacilo gram-negativo, no móvil, de la familia Enterobacteriaceae. Siendo la especie de mayor importancia clínica y más estudiada dentro del género *Klebsiella*.

Usualmente desarrolla una cápsula que actúa como factor determinante en la virulencia de la bacteria, y de acuerdo con sus determinantes antigénicos se puede clasificar en 77 serotipos diferentes, la cápsula protege al microorganismo de la fagocitosis.

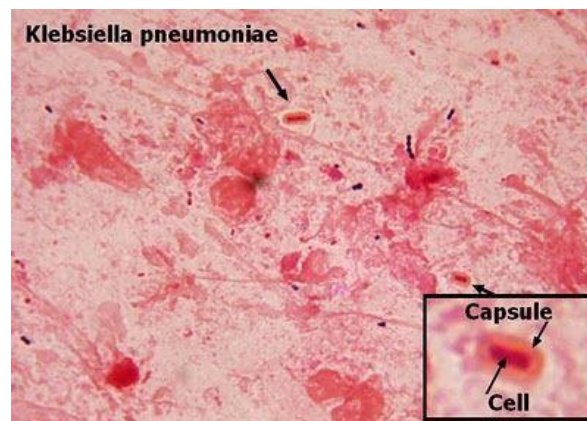


Figura 16.Micrografía de *K. pneumoniae* con tinción de Gram (-), se observa la estructura de la capsula protectora.

Acinetobacter schindleri

Dominio: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Pseudomonadales

Familia: Moraxellaceae

Género: Acinetobacter

Especie: A. schindleri

Nemec et al. 2001

Citrobacter sp.

Dominio: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: Citrobacter

Werkman and Gillen, 1932

Citrobacter es un género de bacterias Gram-negativas coliformes en la familia Enterobacteriaceae.

Las especies *C. amalonaticus*, *C. koseri* y *C. freundii* pueden utilizar el citrato como única fuente de carbono. Las especies de Citrobacter se diferencian por su capacidad para convertir el triptófano en indol (*C. koseri* es el único citrobacter que es comúnmente indol-positivo), la lactosa fermentada (*C. koseri* es un fermentador no lactosa) y el malonato.

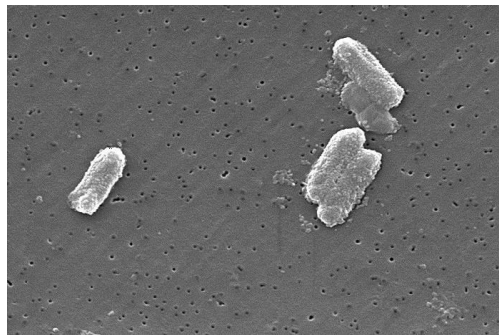


Figura 17. Micrografía electrónica de barrido de Citrobacter freundii

Staphylococcus sciuri

Reino: Bacteria

Filo: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Staphylococcaceae

Género: Staphylococcus

Especie: *S. sciuri*

Kloos et al. 1976

Una nueva especie, *S. sciuri*, fue descrita por Kloos y cols (1976), la cual contiene dos subespecies *sciuri* y *lentus*. *Staphylococcus sciuri* es un miembro Gram-positivo, oxidasa positivo, coagulasa-negativo del género bacteriano *Staphylococcus* que consistente en cocos agrupados. La subespecie tipo *S. sciuri* subsp. *Sciuri* se utilizó originalmente para categorizar 35 cepas mostradas para usar celobiosa, galactosa, sacarosa y glicerina.

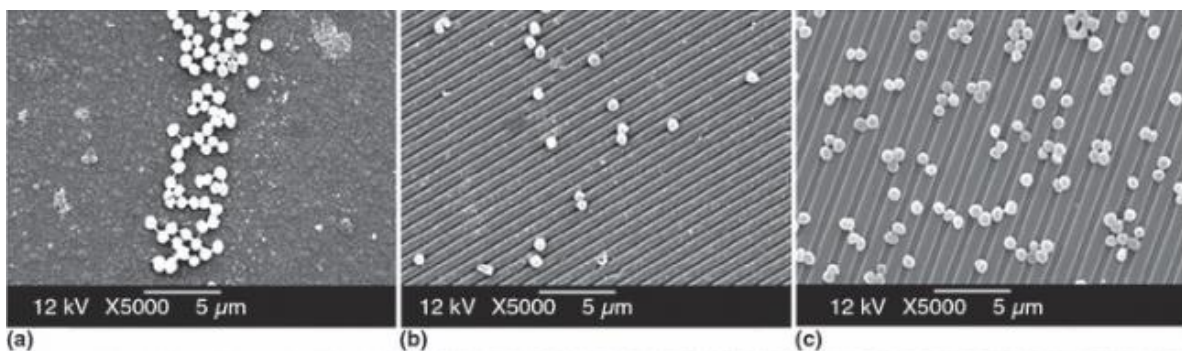


Figura 18. Micrografías de *S. sciuri* en diferentes substratos de topografía definida y química después del lavado: (a) superficie lisa recubierta de titanio; (B) una superficie de ranura de 0,59 μm de ancho; (C) superficie de ranura de 1,02 μm de ancho.

Pseudomonas sp.

Dominio: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Pseudomonadales

Familia: Pseudomonadaceae

Género: Pseudomonas

Migula, 1894

Pseudomonas es un género de bacilos rectos o ligeramente curvados, Gram negativos, oxidasa positivos, aeróbicos estrictos aunque en algunos casos pueden utilizar el nitrato como aceptor de electrones. El catabolismo de los glúcidos se realiza por la ruta de Etner-Doudoroff y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Algunos miembros del género son psicrófilos, mientras que otros sintetizan sideróforos fluorescentes de color amarillo-verdoso con gran valor taxonómico. Es común la presencia de plásmidos y no forman esporas.