



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE INGENIERÍA
CENTRO INTERAMERICANO DE RECURSOS DEL AGUA**

**Aislamiento e identificación de bacterias
resistentes a sustancias tóxicas en sedimentos del
río Lerma.**

TESIS *que para obtener el grado de*
MAESTRA EN CIENCIAS DEL AGUA

Presenta:

ROCÍO BOJÓRQUEZ AGUILAR

Director/es de Tesis:

Dra. Marina Islas Espinoza

Dr. Juan Carlos Vázquez Chagoyan



C I R A

Toluca, México.

Noviembre, 2010.

RESUMEN

Los microorganismos que sobreviven a las condiciones de mezcla de contaminantes del río Lerma, requieren de un metabolismo especializado para poder sobrevivir, lo cual es una forma natural de adaptación biológica en el mismo río. Bajo éste precepto se tomaron sedimentos del río Lerma como fuente de bacterias resistentes a los contaminantes: Cr (VI) y paratión metílico (PM). Para obtener estas bacterias, se probaron diferentes medios de cultivo selectivo y se establecieron las condiciones de crecimiento de las cepas. Después del aislamiento de bacterias, se procedió a la identificación morfológica, bioquímica y molecular de cada cepa. Finalmente, se determinaron sus concentraciones mínimas inhibitorias y se estableció la cinética de degradación de una bacteria seleccionada por cada contaminante.

Siete cepas aisladas de sedimentos del río Lerma fueron capaces de resistir y reducir Cr (VI) a Cr (III). La capacidad de transformación en orden descendente fue: *Pseudomonas entomophila* L48 > *Pseudomonas* sp. > *Pseudomonas fluorescens* A > *Klebsiella pneumoniae* > *Pseudomonas fluorescens* B > *Comamonas testosteroni* A. Las cepas estudiadas presentaron una concentración mínima inhibitoria superior a la encontrada en otros trabajos. La biomasa de *Pseudomonas entomophila* L48 no se vió afectada por la presencia de Cr (VI). Entre las especies que no han sido reportadas previamente como resistentes a Cr (VI) y que fueron identificadas en este estudio se encontraron: *Pseudomonas reactans* AMP-13 y *Pseudomonas entomophila* L48. En un par de estudios locales las especies *Klebsiella pneumoniae* y *Comamonas testosteroni*, han sido identificadas como resistentes a Cr (VI). Por otro lado, once cepas con diferentes porcentajes de transformación de PM fueron aisladas, sin embargo, el porcentaje de degradación por cepa fue bajo. La capacidad de transformación en orden descendente fue: *Comamonas testosteroni* B > *Comamonas testosteroni* C > *Achromobacter piechaudii* B > *Rhodococcus erythropolis* > *Achromobacter piechaudii* A > *Pseudomonas fluorescens* C > *Pseudomonas fluorescens* D > Cepa 10-1 ISI 2-0.3 mM > *Pseudomonas fluorescens* E > *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* > *Pseudomonas fluorescens* F. Estas cepas representan un potencial biotecnológico para su aplicación en sistemas de tratamiento de reducción de Cr (VI) y degradación de PM.

CONTENIDO

| | |
|---|----|
| RESUMEN | I |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. ANTECEDENTES..... | 2 |
| 2.1 Importancia de la la identificación de bacterias de interés biotecnológico..... | 2 |
| 2.2 Mezcla variable de contaminantes en medios acuáticos | 5 |
| 2.3 Zona de estudio | 6 |
| 2.3.1 El cromo en el río Lerma..... | 7 |
| 2.3.2 Paratión metílico en el río Lerma | 9 |
| 2.4 Estudios previos sobre bacterias resistentes a xenobióticos | 10 |
| 2.4.1 Bacterias resistentes a Cr (VI)..... | 11 |
| 2.4.2 Bacterias resistentes a paratión metílico..... | 13 |
| 2.5 Bacterias identificadas en el río Lerma | 15 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 16 |
| 4. HIPÓTESIS..... | 17 |
| 5. OBJETIVO..... | 17 |
| 5.1 Objetivo general | 17 |
| 5.2 Objetivos específicos | 17 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS | 18 |
| 6.1 Selección de puntos de muestreo | 18 |
| 6.1.1 Parámetros evaluados | 20 |
| 6.1.2 Manejo de muestras de sedimentos, homogenización, transporte y almacenamiento | 20 |
| 6.2 Enriquecimiento de la comunidad bacteriana del sedimento | 21 |
| 6.3 Aclimatación con Cr (VI) y PM..... | 25 |
| 6.4 Cultivo selectivo de bacterias resistentes a Cr (VI) y PM | 25 |
| 6.5 Aislamiento de bacterias resistentes a Cr (VI) y PM | 26 |
| 6.6 Caracterización morfológica | 29 |

| | |
|---|----|
| 6.7 Identificación bioquímica..... | 32 |
| 6.8 Análisis molecular de cepas resistentes a Cr (VI) y PM..... | 35 |
| 6.8.1 Extracción de ADN | 36 |
| 6.8.2 Evaluación del ADN mediante electroforesis | 37 |
| 6.8.3 Reacción en cadena de la polimerasa | 39 |
| 6.8.1 Análisis de las secuencias..... | 39 |
| 6.9 Capacidad de degradación y/o transformación de Cr (VI) y PM..... | 39 |
| 6.9.1 Selección de porcentaje de inóculo y concentración de Cr (VI) | 39 |
| 6.9.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de Cr (VI) y PM..... | 40 |
| 6.9.3 Pruebas de transformación de Cr (VI) y PM..... | 41 |
| 6.10 Cinética de crecimiento y transformación de contaminantes..... | 43 |
| 6.10.1 Cinética de crecimiento y transformación de Cr (VI) | 44 |
| 6.10.1 Cinética de crecimiento y transformación de PM | 45 |
| 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 47 |
| 7.1 Cuantificación de la comunidad bacteriana inicial | 47 |
| 7.2 Comunidades bacterianas resistentes al Cr (VI) y PM en la fase de enriquecimiento..... | 47 |
| 7.3 Comunidades bacterianas resistentes al Cr (VI) y PM en la fase de aclimatación | 48 |
| 7.4 Comunidades bacterianas resistentes a diferentes concentraciones de Cr (VI) y PM | 49 |
| 7.5 Cepas puras resistentes al Cr (VI) y PM | 52 |
| 7.6 Medios de cultivo aplicados en el proceso de obtención y aislamiento de bacterias resistentes a Cr (VI) y PM..... | 61 |
| 7.7 Colonias aisladas | 63 |
| 7.8 Identificación bioquímica de las colonias aisladas | 68 |
| 7.9 Identificación molecular de las colonias aisladas | 72 |
| 7.10 Selección de porcentaje de inóculo y concentración de Cr (VI) | 77 |
| 7.11 Concentración mínima inhibitoria (CMI) de Cr (VI) y PM en cepas puras | |

| | |
|--|-----|
| seleccionadas..... | 78 |
| 7.12 Porcentajes de transformación de Cr (VI) y PM por las cepas puras seleccionadas. | 80 |
| 7.13 Cinéticas de crecimiento y transformación de Cr (VI) y PM para las cepas puras seleccionadas..... | 82 |
| 7.13.1 Reducción de Cr (VI) a Cr (III)..... | 82 |
| 7.13.2 Transformación de PM..... | 86 |
| 8. CONCLUSIONES | 89 |
| 9. RECOMENDACIONES..... | 91 |
| 10. REFERENCIAS..... | 92 |
| 11. ANEXOS | 106 |
| | |
| ÍNDICE DE TABLAS | V |
| ÍNDICE DE FIGURAS | VII |
| ÍNDICE DE ANEXOS | X |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | XI |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Aportes municipales e industriales en las zonas más contaminadas del río Lerma. | 19 |
| Tabla 2. Sitios de muestreo de sedimento del río Lerma. | 19 |
| Tabla 3. Clasificación numérica de las características morfológicas coloniales evaluadas. | 29 |
| Tabla 4. Clasificación numérica de las principales características celulares de las cepas bacterianas. | 30 |
| Tabla 5. Clasificación numérica de los grupos bacterianos representativos para cada medio diferencial. | 32 |
| Tabla 6. Número de UFC/g de sedimento | 47 |
| Tabla 7. Colonias aisladas de la prueba de resistencia directa (sin aclimatación)..... | 48 |
| Tabla 8. Comunidades bacterianas resistentes a Cr (VI) de la etapa de cultivo selectivo en medio líquido. | 49 |
| Tabla 9. Comunidades bacterianas resistentes a PM de la etapa de cultivo selectivo en medio líquido. | 49 |
| Tabla 10. Comunidades bacterianas preseleccionadas de la etapa de cultivo selectivo para bacterias resistentes a Cr (VI). | 51 |
| Tabla 11. Comunidades bacterianas de la etapa de cultivo selectivo para bacterias resistentes a PM. | 51 |
| Tabla 12. Cepas bacterianas resistentes a Cr (VI) obtenidas durante la fase de aislamiento. | 53 |
| Tabla 13. Cepas bacterianas resistentes a PM obtenidas durante la fase de aislamiento..... | 54 |
| Tabla 14. Características morfológicas de las colonias aisladas resistentes a Cr (VI). | 56 |
| Tabla 15. Características morfológicas de las colonias aisladas resistentes a PM. | 57 |
| Tabla 16. Caracterización de las cepas resistentes a Cr (VI) en la última etapa de aislamiento. | 60 |
| Tabla 17. Caracterización de las cepas resistentes a PM en la última etapa de aislamiento. | 61 |
| Tabla 18. Medios de cultivo aplicado para bacterias resistentes a Cr (VI)..... | 62 |

| | |
|---|----|
| Tabla 19. Medios de cultivo aplicado para bacterias resistentes a PM..... | 63 |
| Tabla 20. Cepas seleccionadas para identificación..... | 64 |
| Tabla 21. Características morfológicas coloniales y celulares de las cepas aisladas, resistentes a Cr (VI). | 64 |
| Tabla 22. Características morfológicas coloniales y celulares de las cepas aisladas, resistentes a PM. | 66 |
| Tabla 23. Código de identificación API 20E de nueve dígitos..... | 69 |
| Tabla 24. Caracterización morfológica, fisiológica y bioquímica de las cepas aisladas resistentes a Cr (VI) | 70 |
| Tabla 25. Caracterización morfológica, fisiológica y bioquímica de las cepas aisladas resistentes a PM | 71 |
| Tabla 26. Identificación molecular de bacterias resistentes a Cr (VI), con su respectivo % de similitud respecto a su secuencia en el Genbank | 72 |
| Tabla 27. Identificación de bacterias resistentes a PM, con su respectivo % de similitud respecto a su secuencia en el Genbank | 74 |
| Tabla 28. Pruebas de resistencia, para dos cepas de bacterias Cr-resistentes..... | 77 |
| Tabla 29. Conteo celular en cámara de Neubauer para la detección de crecimiento de bacterias resistentes a Cr (VI) expuestas a diferentes concentraciones de contaminante..... | 78 |
| Tabla 30. Conteo celular en cámara de Neubauer para la detección de crecimiento de bacterias resistentes a PM expuestas a diferentes concentraciones de contaminante..... | 79 |
| Tabla 31. Porcentaje de transformación de Cr (VI) a Cr (III) en las cepas aisladas..... | 80 |
| Tabla 32. Porcentajes de transformación de PM en las cepas aisladas..... | 81 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Diagrama general de actividades realizadas..... | 18 |
| Figura 2. Ubicación de los tres sitios de muestreo. | 20 |
| Figura 3. Draga tipo ponar utilizada en el muestreo de sedimento. | 21 |
| Figura 4. Conformación de la muestra compuesta. | 21 |
| Figura 5. Condiciones de incubación en la etapa de enriquecimiento..... | 22 |
| Figura 6. Aspecto de la dilución de sedimento por diluciones consecutivas..... | 22 |
| Figura 7. Técnica de estriado abierto utilizada para aislar colonias bacterianas. | 23 |
| Figura 8. Monitoreo de crecimiento sobre agar cuenta estándar. | 23 |
| Figura 9. Técnica de inoculación para antibiograma..... | 24 |
| Figura 10. Principales fases para el cultivo de bacterias resistentes a Cr (VI) y PM, así como sus respectivos medios de cultivo. | 24 |
| Figura 11. Bacterias incubadas en medio líquido selectivo de Cr (VI) y PM. | 26 |
| Figura 12. Técnica de inoculación en agar inclinado. | 26 |
| Figura 13. Técnica para realizar las resiembras de medio sólido a líquido..... | 28 |
| Figura 14. Aspecto de colonias de fácil aislamiento. | 29 |
| Figura 15. Aspecto de colonias difíciles de aislar. | 29 |
| Figura 16. Calibración de la retícula micrométrica. | 31 |
| Figura 17. Técnica de inoculación por picadura..... | 32 |
| Figura 18. Galería API 20E sin inocular con medios deshidratados. | 33 |
| Figura 19. Aspecto de la galería API 20E inoculada con medios hidratados..... | 33 |
| Figura 20. Inoculación de la galería API 20E..... | 33 |
| Figura 21. Incubación de la galería API 20E en condiciones de humedad. | 33 |
| Figura 22. Aspecto de la galería API 20E con resultados positivos (48 h de incubación máxima). | 34 |
| Figura 23. Figura utilizada para la captura del número de identificación bioquímica. | 34 |

| | |
|--|----|
| Figura 24. Etapas para la identificación molecular. | 36 |
| Figura 25. La concentración de la biomasa (a) se realiza por centrifugación (b)..... | 37 |
| Figura 26. Las perlas en el tubo (a) en combinación con la aplicación de vortex (b), se utiliza para la lisis mecánica de la pared celular y posibles estructuras de resistencia..... | 37 |
| Figura 27. Cámara de electroforesis y fuente de poder (a), Transluminador de luz UV con gel a fotografiar (b) y cámara fotográfica adaptada al transluminador (c). | 39 |
| Figura 28. Conteo de células en cámara de Neubauer con profundidad de 0.1 mm (a), la rejilla de conteo mide 0.2 X 0.2 mm (b), aumento de 20X, para muestras muy concentradas(c). | 41 |
| Figura 29. Cultivo de las cepas resistentes a Cr (VI) para determinar la CMI. | 41 |
| Figura 30. Cultivo de las cepas resistentes a PM para determinar la CMI. | 41 |
| Figura 31. Reacción de la difenil carbazida en medio ácido. | 42 |
| Figura 32. Reacción por la formación de azul de molibdeno, después de dos minutos de reacción. | 42 |
| Figura 33. Curva de crecimiento bacteriano. | 43 |
| Figura 34. Monitoreo de crecimiento en la etapa de enriquecimiento en agar cuenta estándar. | 47 |
| Figura 35. Monitoreo de crecimiento en la etapa de enriquecimiento en agar EMB | 47 |
| Figura 36. Respuesta de las bacterias expuestas a PM en la etapa de aclimatación. | 48 |
| Figura 37. Monitoreo de crecimiento en la fase de aclimatación. | 48 |
| Figura 38. Selección preliminar de colonias resistentes a PM sobre AMMS modificado. . | 50 |
| Figura 39. Bacilos Gram positivos y negativos en asociación. | 55 |
| Figura 40. Bacilos y vibriones Gram negativos de diferentes especies. | 55 |
| Figura 41. Observación “in vivo” de contaminación por hongos en microscopio de contraste de fases. | 56 |
| Figura 42. Observación de contaminación por hongos con tinción de Gram en microscopio de contraste de fases. | 56 |

| | |
|---|-----|
| Figura 43. Vista sobre el mismo campo en diferentes tiempos (segundos), para observar movilidad de la Cepa 20 ISI 1 | 59 |
| Figura 44. Comparación de medios diferenciales aplicados. (a) Agar urea (AU), (b) Agar tripticaseína y soya (ATS), (c) Agar MacConkey (AMC), (d) Agar hierro y triple azúcar (TSI)..... | 59 |
| Figura 45. Respuestas bioquímicas de algunas cepas analizadas así como su código de 7 cifras..... | 69 |
| Figura 46. Proporción de bacterias resistentes a Cr (VI), PM y concentrado total de las cepas identificadas | 76 |
| Figura 47. Diferencia en la turbidez de la cepa <i>Pseudomonas entomophila</i> L48 sin presencia de contaminante (a) y con contaminante (b), después de 48 horas de incubación. (c) La gráfica corresponde a la cinética de crecimiento de la cepa <i>Pseudomonas entomophila</i> L48 con y sin contaminante con su respectiva ecuación de velocidad de crecimiento en la fase exponencia, así como la concentración de Cr (VI) durante el experimento. | 83 |
| Figura 48. Diagrama de pH-pE para el Cr en agua. La concentración máxima de Cr soluble es 10^{-6} M. | 84 |
| Figura 49. Relación entre Cr total y tratamientos evaluados..... | 85 |
| Figura 50. Ecuación que representa el comportamiento de reducción de Cr (VI) a Cr (III). | 86 |
| Figura 51. La gráfica corresponde a la cinética de crecimiento de la cepa <i>Comamonas testosteroni</i> B con y sin contaminante. | 87 |
| Figura 52. Cinética de liberación de PO_4^{3-} (mg L^{-1}), en <i>Comamonas testosteroni</i> B. | 88 |
| Figura 53. Diagrama de la técnica de extracción de ADN. | 113 |
| Figura 54. Procedimiento para la determinación de Cr (VI) por método colorimétrico (APHA, 1998)..... | 114 |
| Figura 55. Técnica aplicada para la oxidación de Cr (III) a Cr (VI). | 115 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|---|-----|
| Anexo 1. Bacterias encontradas normalmente en cuerpos de agua contaminados con aguas residuales municipales y resistentes a Cr (VI) y PM (según diversos autores). | 106 |
| Anexo 2. Caracterización morfológica colonial de cada lote de las cepas resistentes a Cr (VI)..... | 107 |
| Anexo 3. Caracterización morfológica colonial de cada lote de las cepas resistentes a PM. | 108 |
| Anexo 4. Técnica de tinción de Gram | 110 |
| Anexo 5. Prueba de hidróxido de potasio (KOH) (confirmación de la tinción de Gram).. | 111 |
| Anexo 6. Prueba Oxidasa | 111 |
| Anexo 7. Protocolo de extracción de ADN modificado de MO BIO Laboratories, Inc. Protocolo (para máxima recuperación). Página 2. 12800-50.doc. Versión 10292003. | 112 |
| Anexo 8. Medición de Cr (VI) y Cr total por método colorimétrico..... | 113 |
| Anexo 9. Curva de calibración para la cuantificación de Cr (VI) por método colorimétrico (APHA, 1998) (Figura 54), utilizando un espectrofotómetro UV-Visible, Varian® modelo Cary 1E. | 115 |
| Anexo 10. Resultados de la aplicación del método API 20 E y tamaño celular de las cepas resistentes a Cr (VI) | 116 |
| Anexo 11. Resultados de la aplicación del método API 20 E y tamaño celular de las cepas resistentes a PM | 118 |
| Anexo 12. Preparación de soluciones..... | 121 |
| a) Solución madre de Cr (VI) (0.96 M)..... | 121 |
| b) Solución madre de PM (0.6 M)..... | 121 |
| c) Solución de difenil carbazida. | 121 |
| Anexo 13. Lista de las cepas arrojadas al utilizar el programa de alineación por internet BLAST, por sus siglas en inglés: Basic Local Alignment Search Tool, introduciendo las secuencias corregidas en la variante Blastn (NCBI, 2010), se eligieron porcentajes de similitud entre 100-95%..... | 122 |
| Anexo 14. Identificación molecular de las especies resistentes a Cr (VI), utilizando datos de secuencias de ARN ribosomal 16S..... | 127 |
| Anexo 15. Identificación molecular de las especies resistentes a PM, utilizando datos de secuencias de ARN ribosomal 16S..... | 127 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------------|---|
| ADH | Arginina |
| ADN | Acido desoxirribonucleico |
| AMC | Agar MacConkey |
| AMMS | Agar mínimo de sales libre de fosfatos |
| AMY | Amigdalina |
| ARA | Arabinosa |
| ARNs 16S | Ácidos ribonucleicos de la unidad 16S |
| ATS | Agar de tripticaseína y soya |
| ATS | Agar de tripticaseína y soya |
| AU | Agar urea |
| AVB | Agar verde brillante bilis |
| ChrR | Cr (VI) reductasa |
| chrR | Gen de la enzima ChrR |
| CIT | Citrato |
| CMI | Concentración mínima inhibitoria |
| COPs | Compuestos orgánicos persistentes |
| ACS | Agar cuenta estándar |
| CTN | Crucero Toluca-Naucalpan |
| CTS | Caldo de tripticaseína y soya |
| DQO | Demanda química de oxígeno |
| Dvst | Desviación estándar |
| EMB | Agar eosina azul de metileno |
| EPA | Environmental Protection Agency |
| FDA | Food and Drugs Administration |
| GEL | Gelatina de Kohn |
| GLU | Glucosa |
| IARC | International Agency for Research on Cancer |
| IND | Indol |
| INO | Inositol |
| ISI | Col. Isidro Fabela |
| KOH | Hidróxido de potasio |
| LD₅₀ | dosis letal 50 |
| LDC | Lisina |
| MAN | Manitol |
| MEL | Melibiosa |
| MMS | Medio mínimo de sales |
| MMS modificado | Medio mínimo de sales libre de fosfatos |
| MPD | Enzima organofosfato hidrolasa |
| <i>mph</i> | Gen que codifica la paratión metílico hidrolasa |
| ODC | Ornitina |
| OPH | Enzima organofosforo hidrolasa |
| OX | Citocromo oxidasa |
| PI | Parque industrial.; |
| PM | Paratión metílico |
| PNP | p-nitrofenol |
| PT | Planta de tratamiento de aguas residuales |
| RHA | Ramnosa |
| ROS | Especies de Cr (VI) con oxígeno |
| SAC | Sacarosa |

| | |
|------------|---------------------------------|
| SOR | Sorbitol |
| TDA | Triptófano |
| TSI | Agar hierro triple azúcar |
| TUL | Tultepec |
| UFC | Unidades formadoras de colonias |
| URE | Urea |
| VP | Acetoína |
| WHO | World Health Organization |

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación del agua en el río Lerma es un asunto de salud pública y se han dado diversas propuestas para su saneamiento, entre las que se encuentran el aumentar la cantidad y calidad de plantas de tratamiento para mejorar los influentes que llegan a su cauce. Las características de alta contaminación del río Lerma requieren consideraciones particulares para su remediación, ya que contiene contaminantes no sólo de origen doméstico, sino agrícola e industrial. La compleja composición química del río Lerma presenta un medio específico que dificulta la supervivencia de organismos comunes de medios acuáticos sanos, por lo cual es necesario un estudio sobre la diversidad biológica de organismos que tienen la capacidad de sobrevivir bajo estas condiciones. La finalidad de identificar los organismos sobrevivientes en medios altamente contaminados es aplicar sus propiedades metabólicas y de resistencia para la eliminación de residuos tóxicos del agua.

Las condiciones actuales de contaminación del río Lerma requieren de una acción microbiana especializada, la cual probablemente se pueda encontrar como una forma natural de adaptación biológica en el mismo río. Los microorganismos, particularmente las bacterias, se encuentran entre los organismos biológicamente más exitosos, ya que no han tenido que cambiar mucho su estructura para adaptarse a casi todos los ambientes terrestres; esta adaptabilidad y alta tasa de crecimiento son útiles para su aplicación en actividades humanas, como por ejemplo: la producción de alimentos, el mejoramiento genético o el tratamiento biológico de aguas residuales.

Las bacterias resistentes son aquéllas que pueden desarrollarse bajo condiciones ambientales adversas, en las cuales la mayoría de los organismos no podrían sobrevivir. Este tipo de adaptaciones permiten su aislamiento selectivo en presencia de metales pesados, plaguicidas, radiación, temperaturas elevadas, alta presión, salinidad, acidez, etc. Gracias a esto, se pueden obtener cultivos bacterianos en medios selectivos determinados. Dadas las características fisicoquímicas del río Lerma, debido a las descargas de origen industrial y a la actividad agrícola que se desarrolla en el estado. En este estudio se espera encontrar cepas no sólo resistentes a condiciones de extrema toxicidad, sino probablemente algunas con la capacidad de eliminar, transformar o bioacumular sustancias tóxicas específicas como: Cr (VI) (metal pesado) y paratión metílico (plaguicida organofosforado) con fines de aplicación en tratamiento de aguas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Importancia de la la identificación de bacterias de interés biotecnológico

Los microorganismos están adaptados a un amplio rango de condiciones ambientales existentes debajo y sobre la superficie terrestre. Viven en comunidades que llevan a cabo diversas actividades metabólicas. En microbiología, una forma de abordar el estudio de las comunidades es el entendimiento de sus poblaciones, es decir, el aislamiento y cultivo de microorganismos específicos para su análisis bioquímico y molecular.

Los microorganismos corresponden al grupo más significativo en la transformación de compuestos orgánicos xenobióticos, ya que cuentan con numerosas rutas metabólicas para la degradación. Particularmente, las bacterias, son ampliamente utilizadas en biotecnología debido a que poseen altas tasas reproductivas y de mutación, lo cual resulta en una gran diversidad de subespecies, adaptaciones y sistemas enzimáticos especializados.

El aislamiento de bacterias consiste en obtener colonias puras de una misma especie (cultivo axénico) a partir de una población mixta. En la naturaleza, los microorganismos se encuentran asociados en comunidades, por lo que se recurre a técnicas de separación para purificarlos. Los cultivos puros son útiles para identificar y estudiar las características y funciones de una especie en particular, tal es el caso del estudio de bacterias resistentes a sustancias tóxicas, así como el estudio de la capacidad de transformación de dichas sustancias a formas menos tóxicas. Cabe señalar que la identificación es primordial para cualquier estudio de aplicación biotecnológica, ya que seguramente en la literatura se encuentra información adicional referente al comportamiento biológico y bioquímico de la especie en estudio.

Una correcta identificación bacteriana depende de las herramientas que se utilicen durante el proceso. Una adecuada óptica favorece la observación a detalle de la forma, tamaño, movilidad y asociación de la población bajo proceso de identificación, que se complementa con un adecuado sistema de identificación bioquímico o molecular.

Una muestra microscópica normal puede ser observada porque su densidad varía de unas zonas a otras. Es muy difícil ver los detalles de una muestra completamente transparente con iluminación de campo claro ya que todas las zonas son de la misma densidad. Sin embargo, no todas tienen el mismo índice de refracción. El índice de refracción provoca

alteraciones en la fase de la onda, pero las diferencias debidas a los cambios de fase según las zonas no son perceptibles por el ojo humano. El microscopio de contraste de fases aprovecha las pequeñas diferencias de los índices de refracción en las distintas partes de una célula y en distintas partes de una muestra de tejido. El efecto final es que la imagen formada por el conjunto de haces difractados y los no difractados simula la imagen de una muestra que tuviera variaciones de densidad en lugar de variaciones de índice de refracción. Las partes oscuras de la imagen corresponden a las porciones densas del espécimen; las partes claras de la imagen corresponden a porciones menos densas. Por lo tanto estos microscopios se utilizan para observar células vivas, tejidos vivos y cortes semifinos no coloreados (Leica, 2000).

En cuanto al análisis bioquímico de bacterias existen diferentes técnicas una de ellas es la batería de pruebas API 20E bioMerieux, Inc. [®] que es un sistema bioquímico de identificación rápida que se aplica para la identificación de bacterias tipo bacilar de la familia *Enterobacteriaceae* y otras bacterias Gram (-). Básicamente consta de 20 pruebas bioquímicas estandarizadas y miniaturizadas así como una base de datos. Las combinaciones numéricas resultado de las pruebas bioquímicas generan un código único para cada bacteria, al igual que sus propiedades metabólicas, lo cual permite la identificación hasta nivel especie.

En la investigación clínica el kit API 20E se utiliza para la identificación de especies patógenas, en estudios de caso y resistencia a antibióticos. Por ejemplo; Silva *et al.* (2001) aplicaron el kit para identificar *Klebsiella pneumoniae* en sangre, De Baere y colaboradores (2002) lo utilizaron para la identificación y aislamiento de bacterias provenientes de una muestra clínica y Avison *et al.* (2004) para identificar bacterias entéricas resistentes al antibiótico ceftazidima. En éste tipo de estudio también se ha analizado la eficiencia y limitantes del método API 20E, por ejemplo Liassine *et al.* (1998) concluyeron que al identificar bacterias aisladas de una muestra clínica, el kit presenta errores al identificar la especie *Enterococos gallinarum* al contrastar el resultado con pruebas de PCR en múltiples genes.

En la investigación ambiental ésta técnica se ha utilizado regularmente como comprobación de identidad a nivel especie, junto con otros métodos por ejemplo, la secuenciación de

genes específicos como el gen 16S o aquellos que codifican actividades metabólicas y específicas, entre otras. McLellan *et al.* (2001) utilizaron las pruebas bioquímicas estandarizadas para identificar bacterias termotolerantes junto con la prueba 16S rRNA y la ausencia de actividad β -glucuronidasa en muestras de agua de mar, con la finalidad de determinar el error que existe al cuantificar coliformes fecales termotolerantes aplicando métodos estándar. Carballeira *et al.* (2001) utilizaron el método API 20E tal y como recomienda MacDonell *et al.* (1982) para caracterizar bacterias aisladas de una muestra de agua de mar. Dada la creciente utilización del kit API 20E en la caracterización de bacterias ictioparasitarias, Popovic *et al.* (2007), realizaron una revisión de artículos, señalando la necesidad de adaptar el método a las necesidades de las bacterias acuáticas y rescatando las recomendaciones de algunos autores como: realizar la incubación a 22° C y no a 37° C como indica la técnica (Santos *et al.*, 1993), leer después de 48-72 horas y no después de 24-48 (Grisez *et al.*, 1991), y para bacterias patógenas en peces de aguas marinas, resuspender la muestra en solución salina al 1.5% a diferencia de máximo 1% como indica el manual del proveedor (Grisez *et al.*, 1991).

En la industria de alimentos, ésta técnica es ampliamente utilizada para la identificación de bacterias que pudieran repercutir en la salud humana. Por ejemplo, se ha utilizado para identificar bacterias en alimentos junto a métodos moleculares (Guinebretiere *et al.*, 2001; Magrinya *et al.*, 2009). Dodd *et al.* (2003) aplicaron el kit API 20E para la búsqueda de una cepa específica de *Echerichia coli* (cepa 0157) en un lote de alimento para ganado, se complementó con pruebas adicionales como PCR sobre un gen específico y presencia de toxinas Shiga.

En la investigación biotecnológica éste kit se ha utilizado ampliamente como herramienta de identificación, por ejemplo: para la identificación de bacterias con miras a aplicaciones en biorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos y confirmada con secuenciación del gen 16S (Gieg *et al.*, 1999). Carballeira *et al.* (2000) aplicaron el kit API 20E como herramienta de identificación para bacterias utilizadas en la obtención de subproductos metabólicos. Zhu *et al.* (2010) aplicaron éste sistema para evaluar las diferencias entre el perfil bioquímico de dos cepas de la misma especie, una modificada genéticamente y otra no. Friedrich *et al.* (2005) aplicaron el kit API 20E para observar la

actividad ureasa específicamente.

La identificación molecular se utiliza en los casos en los cuales la cepa en estudio es no cultivable, por ejemplo: especies cuyas características bioquímicas no se adaptan a las de ningún género o especie reconocido, como patógenos nuevos o cepas que exhiben un perfil bioquímico ambiguo, caracterización fenotípica deficiente, bacterias fastidiosas a consecuencia de sus requerimientos nutricionales y bacterias de crecimiento lento que retrasan considerablemente la identificación convencional.

La comparación molecular de las secuencias de los diferentes ácidos ribonucleicos de la unidad 16S (ARNs 16S) permite establecer las relaciones filogenéticas entre especies del grupo procariota. Este hecho ha dado lugar al sistema de identificación molecular vía secuenciación del gen 16S. El fundamento de ésta técnica consiste en la secuenciación del gen 16S que es una molécula muy antigua presente en todas las bacterias actuales y que ha mantenido su función. Además, los cambios de éste gen ocurren de manera suficientemente lenta para aportar información acerca de todos los procariotas, y a la vez, contiene suficiente variabilidad para diferenciar no sólo los organismos más alejados sino también los más próximos, mediante la presencia de una o más secuencias características que se denominan oligonucleótidos firma. Éstos últimos son secuencias específicas cortas que aparecen en la mayor parte de los miembros de un determinado grupo filogenético, y que nunca o que raramente están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos. Por ello, los oligonucleótidos permiten la clasificación filogenética de las bacterias, y adicionalmente, relacionarlas con su respectiva especie, cumpliendo la doble función de clasificar a las bacterias por su filogenia y taxonomía (Rodicio, 2004).

2.2 Mezcla variable de contaminantes en medios acuáticos

La contaminación de origen humano por metales pesados y compuestos orgánicos se ha convertido en un problema a escala mundial debido a su impacto en las funciones ecológicas naturales de océanos, ríos y lagos. Asimismo, los sedimentos se han convertido en un gran almacén de metales pesados y compuestos orgánicos pues es donde se precipitan y acumulan la mayoría de los contaminantes de ambientes acuáticos.

La descarga de productos químicos de origen antropogénico, en especial aquéllos conocidos como sustancias tóxicas persistentes, tienen un alto impacto en la salud humana

y el ambiente. De particular importancia son los compuestos orgánicos persistentes (COPs), que logran permanecer tiempos largos en el ambiente, resisten la degradación y pueden producir efectos tóxicos agudos y crónicos en los organismos. Entre los efectos adversos que pueden ocasionar a la salud humana están: cáncer, desórdenes reproductivos, defectos congénitos, dificultades en el aprendizaje, intoxicaciones y en algunos casos la muerte (López, 1998).

Una vez descargados en el agua, los compuestos xenobióticos están sujetos a procesos físicos, químicos y biológicos que van a definir su destino en el medio. Esos procesos incluyen transporte, sorción, volatilización, difusión, hidrólisis, fotólisis, biodegradación, bioacumulación, etc.

Los compuestos persistentes son generalmente sorbidos y bioacumulados debido a su carácter hidrofóbico pronunciado. Las sustancias orgánicas tóxicas, al igual que los metales, se encuentran asociadas principalmente a los sólidos suspendidos y a los sedimentos en los medios acuáticos (Colombo *et al.*, 1990). Es importante señalar que debido a la mayor cantidad de materia orgánica, la sedimentación de estructuras bacterianas de resistencia y la presencia de medios de soporte en el fondo de los cuerpos de agua, hacen que la comunidad bacteriana sea más diversa en el sedimento que en la columna de agua.

2.3 Zona de estudio

La composición química del río Lerma es compleja debido al origen variable de las aguas residuales que lo contaminan: industria química, petroquímica, destiladora, textil, peletera, alimenticia, maderera, metalurgia, metal-mecánica, minera y cantera, así como escurrimientos proveniente de tierras de uso agrícola y vertidos de agua residual doméstica. El río Lerma funciona como un colector público de aguas residuales municipales, industriales y agrícolas, reduciendo así sus signos de vida (Fall *et al.*, 2007), a excepción de especies altamente resistentes, como son bacterias anaerobias (debido a la falta de oxígeno que impera a lo largo del año), lirio acuático y larvas de insectos. Los metales pesados y los compuestos orgánicos persistentes que son utilizados en los procesos industriales y agrícolas, han alterado los sistemas acuáticos en los que son atrapados y se acumulan debido a la dinámica de sedimentación y es más probable encontrarlos en sedimentos finos de aguas tranquilas como embalses (Ávila *et al.*, 1999; Rodríguez y Ávila, 1997).

Principalmente en la cuenca alta del río Lerma y en época de estiaje (meses de febrero a mayo), es cuando se han encontrado condiciones de alta contaminación por la concentración de los sedimentos en el fondo del río (Zarazúa, 2008). Existen dos zonas en particular, con extrema contaminación: la descarga proveniente del municipio de Tenango y zonas aledañas, así como la de la empresa Reciclagua, que presentan condiciones elevadas de conductividad, demanda química de oxígeno (DQO) y toxicidad (medidos con Microtox) (Fall *et al.*, 2007). Otras zonas que han presentado condiciones elevadas de contaminación en el río son la sección correspondiente a Totoltepec y la del puente de la carretera Toluca-Naucaalpan.

La zona que presentó mayor cantidad de metales fue la de México-Toluca y Totoltepec, en donde se encontró la máxima acumulación de metales en sedimento. Totoltepec es una zona que por su contenido de DBO₅ (149 mg L⁻¹) y DQO (652 mg L⁻¹), se clasifica como fuertemente contaminada, según los criterios de la CNA (2007). La relación DBO₅/DQO es de 0.23 y debido a que las aportaciones inorgánicas son de hasta 1,100 mg L⁻¹ promedio, se considera que la contaminación es principalmente industrial (Fall *et al.*, 2007). En el sedimento de esta zona se encontraron las mayores concentraciones de Cr (479-661 mg kg⁻¹) en los meses de febrero y mayo del 2003. Totoltepec se considera la principal zona de acumulación de Cu, Zn, Cr y Pb, además de Fe y Mn en sedimentos (Zarazúa, 2008), por lo que es ideal para el aislamiento de bacterias resistentes a Cr.

En lo que respecta a compuestos orgánicos persistentes, los municipios de Calimaya, Chapultepec, Temoaya, Tenango del Valle, Toluca e Ixtlahuaca, están considerados como zonas de uso indiscriminado de agroquímicos (GEM, 1997). En la sección del río correspondiente al puente Toluca-Naucaalpan presenta una relación DBO₅/DQO de 0.34, lo cual es indicativo de la presencia de materia difícil de biodegradarse, además de la presencia de metales (Zarazúa, 2008).

2.3.1 El cromo en el río Lerma

El cromo es un metal pesado ampliamente utilizado en la industria, que incluye curtido de pieles, electrogalvanizado, manufactura de pinturas y pigmentos e industria de fertilizantes. Estas industrias descargan el cromo en sus efluentes hacia aguas superficiales como Cr (III) y Cr (VI). La concentración de Cr (VI) en aguas residuales de tenería se encuentran entre

85.7 y 180.8 mg L⁻¹, con una media de 118.2 mg L⁻¹ (Oke *et al.*, 2006). En el tratamiento biológico de agua residual la concentración umbral inhibitoria sobre organismos heterotróficos para Cr total es de 10 mg L⁻¹ y para Cr (VI) 1 mg L⁻¹ (Tchobanoglous *et al.*, 2003).

El Cr (III) es un ion no tóxico, esencial para la nutrición de los mamíferos como un componente traza, es relativamente poco móvil en sistemas acuáticos debido a su baja solubilidad en agua. Por otra parte, el Cr (VI) es altamente soluble y tóxico para muchas plantas, animales y bacterias que habitan sistemas acuáticos. La distribución de especies de Cr en cuerpos de agua depende directamente de las características fisicoquímicas y biológicas del medio, por ejemplo a pH arriba de 5.5 todas las formas solubles de Cr están como Cr (VI) (McGrath y Smith, 1990).

Bajo condiciones fisiológicas el Cr (VI) entra por los canales de sulfato, reacciona espontáneamente con reductantes intracelulares (Ohta *et al.*, 1971; Ohtake *et al.*, 1987; Cervantes y Silver, 1992; Silver *et al.*, 2001), y produce especies de Cr (VI) con oxígeno (ROS) que fácilmente se combinan con el ADN, entonces se enlaza al material celular, deteriorando las funciones fisiológicas normales (Pesti *et al.*, 2000; Cervantes *et al.*, 2001). Los efectos en humanos son: irritación nasal y ulceración, irritación de la piel, perforación de la membrana timpánica y cáncer de pulmón (Gibb *et al.*, 2000 a,b), además, el Cr (VI) puede acumularse en la placenta y generar deterioro en el desarrollo fetal en mamíferos. La dosis letal 50 (LD₅₀) en ratones es de 137-177 mg kg⁻¹ de peso corporal (Saxena *et al.*, 1990). Dado su peligrosidad, diversas agencias regulatorias como: International Agency for Research on Cancer (IARC), World Health Organization (WHO), Environmental Protection Agency (EPA), Food and Drugs Administration (FDA), clasifican al Cr (VI) como un tóxico prioritario (IARC, 2008; WHO, 2000, 2004; EPA, 2008; FDA, 2007, 2008).

En el suelo, la contaminación por Cromo (VI) altera la estructura de las comunidades microbianas del suelo (Zhou *et al.*, 2002; Turpeinen *et al.*, 2004), como resultado de la reducción del crecimiento bacteriano y por ende en las actividades de degradación, el Cr (VI) se acumula en la materia orgánica del suelo (Mazierski, 1994; Shi *et al.*, 2002).

Debido a la detección de metales en el río Lerma en estudios previos (Zarazúa, 2008;

Tejeda, 2006), en éste trabajo se espera encontrar bacterias resistentes a Cr. Los metales pesados que son introducidos en un sistema acuático, generalmente son precipitados en la capa de sedimento en donde es más probable encontrarlos en la fracción fina en aguas tranquilas como embalses. En un estudio reciente elaborado por Tejeda (2006) en el curso alto del río Lerma identificó Cr, entre otros metales.

Zarazúa (2008) determinó que las zonas de mayor contribución y/o acumulación de Cr son: Totoltepec, Mezapa y el puente de la carretera México-Toluca, en los meses de febrero y mayo. La concentración de metales está controlada principalmente por las variaciones de caudales en el río, por los arrastres de suelos aledaños y sedimentos de ríos tributarios, así como aportes antropogénicos. La concentración promedio de Cr en sedimento de la cuenca alta del río Lerma fue de 297 mg kg⁻¹.

2.3.2 Paratión metílico en el río Lerma

Una de las clases de plaguicidas mayormente usada en México son los organofosforados. Los plaguicidas organofosforados varían de sumamente tóxicos a relativamente tóxicos. En general no son persistentes, su periodo de vida es menor a un mes antes de degradarse como sustancias no tóxicas. Ejemplos de plaguicidas organofosforados incluyen el malation, fenitrothion, diazinon y paratión metílico (Andrews, 1995).

El paratión metílico (O,O-dimetil O-4-nitrofenilfosforotioato) es un insecticida organofosforado no selectivo, utilizado ampliamente en la agricultura en México. En el Estado de México, el paratión metílico se encuentra entre los de mayor consumo junto con: antrazina, 2,4-D amina, bentazon, oxiclورو de cobre, malatión, carbofuran y bantazon (SE, 2000). Las importaciones de paratión metílico provenientes de Dinamarca (que es el mayor proveedor en México de paratión metílico concentrado) se incrementaron de 117,000 kilogramos en 2000 a 135,500 kilogramos en 2004 (DOF, 2006).

El paratión metílico (PM) se encuentra disponible en solución generalmente disuelto con solventes inertes de petróleo. En general es poco persistente y su degradación en el medio (sin considerar el factor biológico) es más rápida en el suelo que en un sistema acuático (Crossland *et al.*, 1986). El PM en suelo puede ser oxidado totalmente por radiación ultravioleta o luz solar en alrededor de 40 h, sin embargo, en sistemas acuáticos la fotólisis total ha sido estimada únicamente en un 4% en las mismas horas de exposición. La tasa de

transformación del PM bajo la luz de lámparas fluorescentes es baja comparada con la hidrólisis (Holm *et al.*, 1983). La vida media del PM en solución acuosa (20° C, pH 1-5) es de 175 días (Melnikov, 1971).

El PM es rápidamente absorbido vía oral, dermal y por inhalación, además se distribuye rápidamente en los tejidos del cuerpo humano. El hígado es el principal órgano de desintoxicación del PM. Puede causar dolor de cabeza, mareos, ansiedad, confusión mental, convulsiones y coma, además de depresión del centro respiratorio (WHO, 1986). Un incremento en aberraciones cromosomales ha sido reportado en casos de intoxicación intensa. La dosis letal 50 (LD₅₀) en ratones es de 23 mg kg⁻¹ de peso corporal y en ratas de 14 mg kg⁻¹ (RTECS, 1991 en EPA, 1993).

En cuanto a estudios directos de la presencia de PM en el río Lerma, en 1999 De La Vega-Salazar *et al.*, analizaron muestras de agua, sedimentos e invertebrados de la presa Ignacio Ramírez que es uno de los abastecedores de agua del río Lerma, con el objetivo de determinar la acumulación y persistencia del PM en agua, sedimento y organismos bénticos. Se encontró PM en agua y en mayor concentración en sedimento. Se determinó que la mayor bioconcentración ocurre en época de lluvias y que es un contaminante hepatotóxico. La concentración analizada en diversos puntos de muestreo en sedimentos está entre 0.013 y 0.001 mg kg⁻¹ de PM en época de secas y la acumulación en *Acolostoma sp.* (invertebrado) fue entre 0.00062 y 2.45 mg kg⁻¹.

2.4 Estudios previos sobre bacterias resistentes a xenobióticos

La contaminación de aguas naturales con aguas residuales municipales, incluye la entrada a los sistemas acuáticos de una gran cantidad de microorganismos, de los cuales algunos son capaces de sobrevivir bajo condiciones anóxicas, microaerófilas y aerobias (heterótrofos facultativos), lo que les permite fácilmente adaptarse y vivir en forma libre. Estos tipos de microorganismos, particularmente las bacterias, han sido ampliamente estudiados como material para aplicaciones biotecnológicas. Entre las bacterias que sobreviven en la columna de agua y son vertidas en ríos y lagos por medio de descargas de aguas no tratadas, se encuentran bacterias de los géneros del grupo *Enterobacteriaceae*, *Citrobacter* y *Klebsiella* (APHA, 1998; Tallon *et al.*, 2005). Dentro de este grupo de organismos, se ha encontrado algunas especies resistentes y capaces de transformar: Cr (VI) y PM, entre otros

contaminantes y dada su resistencia, adaptabilidad y fácil cultivo son ampliamente utilizadas en sistemas de biorremediación y como fuente de enzimas.

2.4.1 Bacterias resistentes a Cr (VI)

El Cr (VI) inhibe la actividad enzimática bacteriana e induce mutaciones (Ehlich, 1986). Sin embargo, algunas especies de bacterias han sido encontradas sobreviviendo en sitios contaminados con Cr (VI): *Pseudomonas fluorescens* (Bopp y Ehrlich, 1988), *P. aeruginosa* (Cervantes y Ohtake, 1988; en Bader, 1999), *Enterobacter cloacae* (Wang *et al.*, 1989), *Bacillus licheniformis* (Bader *et al.* 1999) y *Staphylococcus cohnii* (Donmez y Kocberber, 2004). En *Pseudomonas aeruginosa*, la resistencia tiene que ver con mecanismos de transporte en la membrana celular (Bopp *et al.*, 1983; Ohtake *et al.*, 1987; Alvarez *et al.*, 1999; Aguilera *et al.*, 2004).

Algunas bacterias cromato-resistentes son capaces de reducir Cr (VI) a Cr (III) usando una variedad de donadores de electrones (Wang y Shen, 1995). La reducción de cromato ocurre bajo sistemas aerobios y anaerobios (Ohtake y Silver, 1994; Wang y Shen, 1995), la identificación del primer microorganismo capaz de reducir Cr (VI) a Cr (III) fue en 1970 (Romanenko y Korenkov, 1977), posteriormente otras especies han sido identificadas, por ejemplo: *Alcaligenes eutrophus* (recientemente re-clasificada como *Waustersia eutropha*) y *Pseudomonas synxantha* (Nies y Silver, 1989; Valls *et al.*, 2000; Gopalan y Veeramani, 1994; McLean *et al.*, 2000; Vaneechoutte *et al.*, 2004). Otros géneros que se han detectado con capacidades reductoras de Cr (VI) son *Bacillus spp.*, *E. coli ATCC 33456*, *Shewanella alga BrY-MT* (Shen y Wang, 1994; Wang y Xiao, 1995; Shakoori *et al.*, 1999, 2000; Guha *et al.*, 2001; Camargo *et al.*, 2003), *Pseudomonas maltophilia O-2* y *Bacillus megaterium TKW3* (Blake II *et al.*, 1993; Cheung *et al.*, 2006, en Donmez y Kocberber, 2004), *Pseudomonas ambigua* (Cervantes y Silver, 1992), *Bacillus subtilis* (Beveridge, 1978), *Zooglea ramigera*, *Klebsiella aerogenes*, *Arthobacter viscosus* y *Pseudomonas sp.* (Volesky, 1990; Gadd y White, 1993; Srinath *et al.*, 2002).

En lo que respecta a aplicaciones biotecnológicas, de la bacteria *Pseudomonas putida* PRS2000 se obtuvo una reductasa de Cr (VI) (Ishibashi *et al.*, 1990). Suzuki *et al.* (1992) reportaron una reductasa de Cr (VI) para *Pseudomonas ambigua* G-1. En una investigación más reciente, el gen que codifica esta reductasa tiene un 58% de homología con una

nitroreductasa de *Vibrio harveyi* KCTC 2720 la cual también está dotada con actividad para reducir Cr (VI) (Kwak *et al.*, 2003). Park *et al.* (2000) purificaron una Cr (VI) reductasa (ChrR) de *Pseudomonas putida* MK1, el gen de la enzima ChrR (chrR) fue codificado identificando segmentos conocidos de secuencias de aminoácidos N-terminal y segmentos internos de la parte ácida de la enzima pura. Dos enzimas Cr (VI) reductasas han sido estudiadas y purificadas de *Pseudomonas putida* MK1 y *Escherichia coli* (Cheung y Gu, 2007).

Por otro lado, la resistencia al Cr (VI) en *Pseudomonas fluorescens* no depende de la reducción de Cr (VI) sino a sistemas de transporte membranar (Bopp y Ehrlich, 1988). Otras *Pseudomonas sp.* capaces de reducir Cr (VI) incluyen una cepa cercana a *Pseudomonas synxantha* y otras especies no definidas (Gopalan y Veeramani, 1994; McLean *et al.*, 2000).

En 1999, Bader *et al.* realizaron un estudio en un sitio contaminado con Cr (VI), se analizaron las poblaciones de bacterias resistentes y se comparó su presencia en suelos contaminados y no contaminados. Para este estudio en particular, los resultados comparativos entre sitios contaminados y no contaminados, no mostraron una correlación positiva entre la contaminación con Cr (VI) y la resistencia de las bacterias endémicas. Fue muy importante una aclimatación de las cepas a condiciones de laboratorio antes de la exposición a Cr (VI), ya que cuando se sembró directamente la muestra, no se encontraron colonias de bacterias resistentes a Cr (VI). Sin embargo, después de las condiciones de enriquecimiento, se encontraron colonias tolerantes a concentraciones de hasta 500 mg L⁻¹ de Cr (VI). Únicamente la especie *Bacillus licheniformis* pudo ser identificada utilizando análisis de perfil de ácidos grasos.

En el 2004, Donmez y Kocberber reportaron el aislamiento de microorganismos capaces de resistir y bioacumular Cr (VI) bajo altas concentraciones de Cr y iones de sal. Además se probaron tres distintos medios de cultivo, encontrando que la composición del medio influye sobre la tasa de crecimiento y consumo de Cr (VI). La máxima bioacumulación de Cr fue mayor en medio de melaza de betabel (medio M) que utiliza ésta, como fuente de carbono y el menos productivo fue uno compuesto únicamente con sales inorgánicas. En otro estudio referenciado en este artículo, Zoubolis *et al.* (2004) encontraron que

Staphylococcus cohnii presenta la máxima bioacumulación de Cr (VI) en una concentración inicial de 1000 ppm de Cr (VI) utilizando medio M.

Además de la reducción de Cr (VI) a Cr (III), otro tipo de mecanismo de remoción de Cr es la bioabsorción, Srinath *et al.* (2002) realizaron un estudio en donde se aislaron bacterias resistentes a Cr (VI) provenientes de una planta de tratamiento de aguas industriales de una tenería. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) en las cepas aisladas, cuyo resultado fue: <51 mg L⁻¹ en el 7% de los aislados, 51-100 en 77%, 101-150 en 3% y mayor a 151 mg L⁻¹ en 13%. Se identificaron tres cepas: *Bacillus megaterium*, *Bacillus circulans* y *Bacillus coagulans*. Finalmente probaron la capacidad de bioabsorción de Cr (VI) de dos cepas: *Bacillus circulans* y *Bacillus megaterium* que fueron capaces de bioacumular 34.5 y 32.0 mg Cr g⁻¹ de peso seco, respectivamente. También se probó la capacidad de bioabsorber Cr (VI) en células vivas y muertas de *B. coagulans* que bioabsorbió 23.8 y 39.9 mg Cr g⁻¹ peso seco, respectivamente. Mientras que en células vivas y muertas de *B. megaterium* bioabsorbieron 15.7 y 30.7 mg Cr g⁻¹ peso seco, respectivamente.

2.4.2 Bacterias resistentes a paratión metílico

Los microorganismos pueden utilizar PM como única fuente de carbono, y en bioensayos sobre comunidades naturales, se ha detectado que, a concentraciones mayores a 5 mg L⁻¹, aumenta la actividad reproductiva, por lo tanto, la cantidad de biomasa. Esta reacción positiva es observada sólo en bacterias y actinomicetes (hongos filamentosos). En ensayos con comunidades bacterianas extraídas de suelo, se determinó que éstas pueden utilizar paratión y PM como única fuente de carbono. Para el caso de *Pseudomonas sp.*, éstas son capaces de hidrolizar PM y paratión a p-nitrofenol (PNP), sin embargo, es necesaria otra fuente de carbono para su crecimiento (Chaudhry *et al.*, 1988).

Flavobacterium sp. es capaz de degradar p-nitrofenol a nitritos y aprovecharlos para su crecimiento. En los estudios de ADN realizados para *Pseudomonas* y un cultivo mixto se muestra homología con el gen de degradación de compuestos organofosfatídicos, previamente reportado para una bacteria degradadora de paratión. Por otra parte, *Bacillus sp.*, es capaz de degradar totalmente PM a CO₂ y H₂O (Chaudhry *et al.*, 1988).

Un estudio realizado por Ortíz-Hernández *et al.* en 2001, reporta la actividad

biodegradadora de doce especies bacterianas sobre PM aisladas de suelo agrícola contaminado con plaguicidas, de las cuales, sólo se observó actividad en cinco cepas. También se evaluó la capacidad de degradación obteniéndose de mayor a menor actividad en las siguientes cepas: *Pseudomonas aeruginosa* > *Klebsiella pneumoniae* > *Burkholderia cepacia* > *Enterobacter sakazakii* > *Citribacter freundii*.

En 1994, Rani y Lalithakumari estudiaron la ruta que utiliza *P. putida* para degradar PM, encontrando que *P. putida*, puede hidrolizarlo y utilizar p-nitrofenol como única fuente de carbono. *Pseudomonas sp.* WBC-3 es una cepa degradadora de PM aislada de un suelo contaminado cerca de una compañía de plaguicidas en Hubei, China. La bacteria es capaz de utilizar PM como única fuente de C/N y también degradar p-nitrofenol producto del PM (Chen, 2002). La bacteria produce una enzima PM hidrolasa por sus siglas en inglés MPH, que descompone paratión metílico en p-nitrofenol y fosfato. El gen que codifica la paratión metílico hidrolasa (*mph*) de *Pseudomonas sp.* WBC-3 ha sido determinado y secuenciado (disponible en GenBank número de acceso: AY251554). Las secuencias de aminoácidos deducidas de esta secuencia, presentan un 93 y 92% de identidad con la enzima organofosforo hidrolasa (OPH) aislada e identificada en *Pseudomonas putida* (Rani y Lalithakumari, 1994) y *Pleisomonas M6* (Zhongli, 2001), respectivamente, sin embargo, *mph* pierde homología con la secuencia de la enzima paratión-hidrolasa de *P. diminuta* (Dumas *et al.*, 1989) y *Flavobacterium sp.* (Mulbry *et al.*, 1989).

Una bacteria capaz de hidrolizar PM a p-nitrofenol fue aislada y presuntamente identificada como *Pleisomonas sp.* cepa M6. Se seleccionó una enzima organofosfato hidrolasa (MPD) para su identificación, obteniéndose la secuencia de nucleótidos del gen *mpd* útil para la identificación molecular de bacterias resistentes a PM. En la cepa M6, se logró la descomposición a p-nitrofenol en menos de 15 min., cuando se agregan 200 mg de PM. El p-nitrofenol es uno de los mayores productos hidrolíticos generado cuando el PM es sujeto a degradación microbiana (Chaudhry *et al.*, 1988; Munnecke y Hsieh, 1974; Rani y Lalithakumari, 1994).

Pakala *et al.* (2006), aisló una bacteria capaz de utilizar PM como única fuente de carbono y energía, esta bacteria fue *Serratia* (bacteria Gram positiva) identificada con la secuencia completa del gen 16S rARN cepa DS001, que utiliza p-nitrofenol, 4-nitrocatechol y a

2,4-bencenotriol. La cepa de *Serratia* aislada fue capaz de crecer hasta 2.25 mM de PM y el máximo crecimiento observado ocurrió a 0.75 mM. Durante el crecimiento el medio viró a amarillo por la hidrólisis del PM y la formación de p-nitrofenol. La intensidad del color amarillo aumentó proporcionalmente con el crecimiento del cultivo.

Ochrobactrum sp. B2 fue capaz de degradar p-nitrofenol a la concentración máxima de 100 mg L⁻¹ bajo las siguientes condiciones de crecimiento: temperatura 30° C, pH alcalino (9-10). A pH 6 no hubo degradación. La adición de fuentes inorgánicas de nitrógeno (cloruro de amonio o sulfato de amonio) inhibieron la degradación, mientras que fuentes orgánicas de nitrógeno (peptona, extracto de levadura, urea) aceleraron la degradación (Qiu *et al.*, 2007).

2.5 Bacterias identificadas en el río Lerma

En un análisis bacteriológico realizado recientemente en el río Lerma en las zonas correspondientes a las poblaciones de Lerma y Atlacomulco, se han encontrado e identificado las siguientes especies de bacterias en la columna de agua: *Enterococcus sp.*, *Enterococcus faecium*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aureginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli* en Lerma; y *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter Iwoffii*, en Atlacomulco (Lima, 2007), de las cuales la mayoría corresponden a especies identificadas como resistentes a Cr (VI) y PM. No se encontraron referencias sobre la calidad bacteriológica del sedimento del río Lerma, por lo tanto, es posible encontrar una mayor diversidad bacteriológica en el bentos.

3. JUSTIFICACIÓN

La contaminación por metales pesados y compuestos orgánicos de origen humano, se ha convertido en un problema a escala mundial debido a su impacto negativo en las funciones naturales de océanos, ríos y lagos. Los sedimentos se han vuelto el almacén de estos metales y compuestos orgánicos, y desempeñan un papel importante en las transformaciones de estas sustancias (Peng *et al.* 2008). Sin embargo, los metales no permanecen atrapados en el sedimento por siempre, ya que por las características físico-químicas del agua, pueden resuspenderse e interactuar con la biota y/o biomagnificarse (Theofanis *et al.*, 2001). Por otra parte, los compuestos orgánicos, en particular los persistentes, requieren de años para su degradación natural.

Las descargas de aguas residuales de diversos sectores económicos en la cuenca Lerma-Chapala, así como, el uso indiscriminado de plaguicidas que propicia la contaminación del agua por infiltración, escurrimiento y arrastre de los contaminantes del suelo, han sobrepasado la capacidad de dilución del río Lerma y, por consecuencia, generan un estado alto de contaminación difícil de tratar con sistemas biológicos debido a que una elevada concentración de ciertos contaminantes puede inhibir el crecimiento de los microorganismos encargados de la depuración del agua en sistemas de tratamiento convencionales. En años recientes se ha planteado la investigación para el desarrollo de tecnologías baratas y económicamente sustentables, como lo es el uso de la biotecnología como solución a diversos problemas de impacto ambiental.

En este sentido, las descargas de diferentes orígenes que alimentan el cauce del río Lerma, proveen de un medio propicio para el desarrollo de bacterias resistentes por medio de la inhibición de las poblaciones sensibles. Por otro lado, los sedimentos almacenan metales y compuestos orgánicos, además de ser un sustrato que favorece la formación y mantenimiento de comunidades microbianas. Además, en la caracterización bacteriológica en la columna de agua del río Lerma (Lima, 2007) se han identificado especies de bacterias que diversos autores clasifican como resistentes a diversas sustancias tóxicas. Sin embargo, no se tiene hasta el momento conocimiento de algún estudio de bioprospección anterior en los sedimentos del río Lerma. Con esta investigación se pretende obtener e identificar bacterias capaces de sobrevivir en condiciones de alta contaminación por Cr (VI) y PM, así como probar si hay o no transformación de dichos contaminantes.

4. HIPÓTESIS

Dadas las características físico-químicas del río Lerma, se espera encontrar bacterias resistentes a concentraciones elevadas de Cr (VI) y paratión metílico (PM). Algunas de estas bacterias pueden ser capaces de transformar dichas sustancias.

5. OBJETIVO

5.1 Objetivo general

Cultivar, aislar y seleccionar bacterias resistentes a las sustancias tóxicas Cr (VI) y PM.

5.2 Objetivos específicos

- Diseñar un medio de cultivo adecuado para la selección, cultivo y aislamiento de bacterias resistentes a Cr (VI).
- Diseñar un medio de cultivo adecuado para la selección, cultivo y aislamiento de bacterias resistentes a PM.
- Aislar bacterias potencialmente resistentes a Cr y PM.
- Identificar mediante métodos bioquímicos, morfológicos y moleculares las bacterias aisladas y purificadas.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) para cada cepa aislada.
- Determinar si las bacterias resistentes seleccionadas son capaces de transformar el Cr (VI) y PM.
- Realizar la cinética de degradación y crecimiento de la cepa con mayor capacidad de transformación de Cr (VI) y PM.
- Preservar un banco de cepas aisladas e identificadas para futuras aplicaciones.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

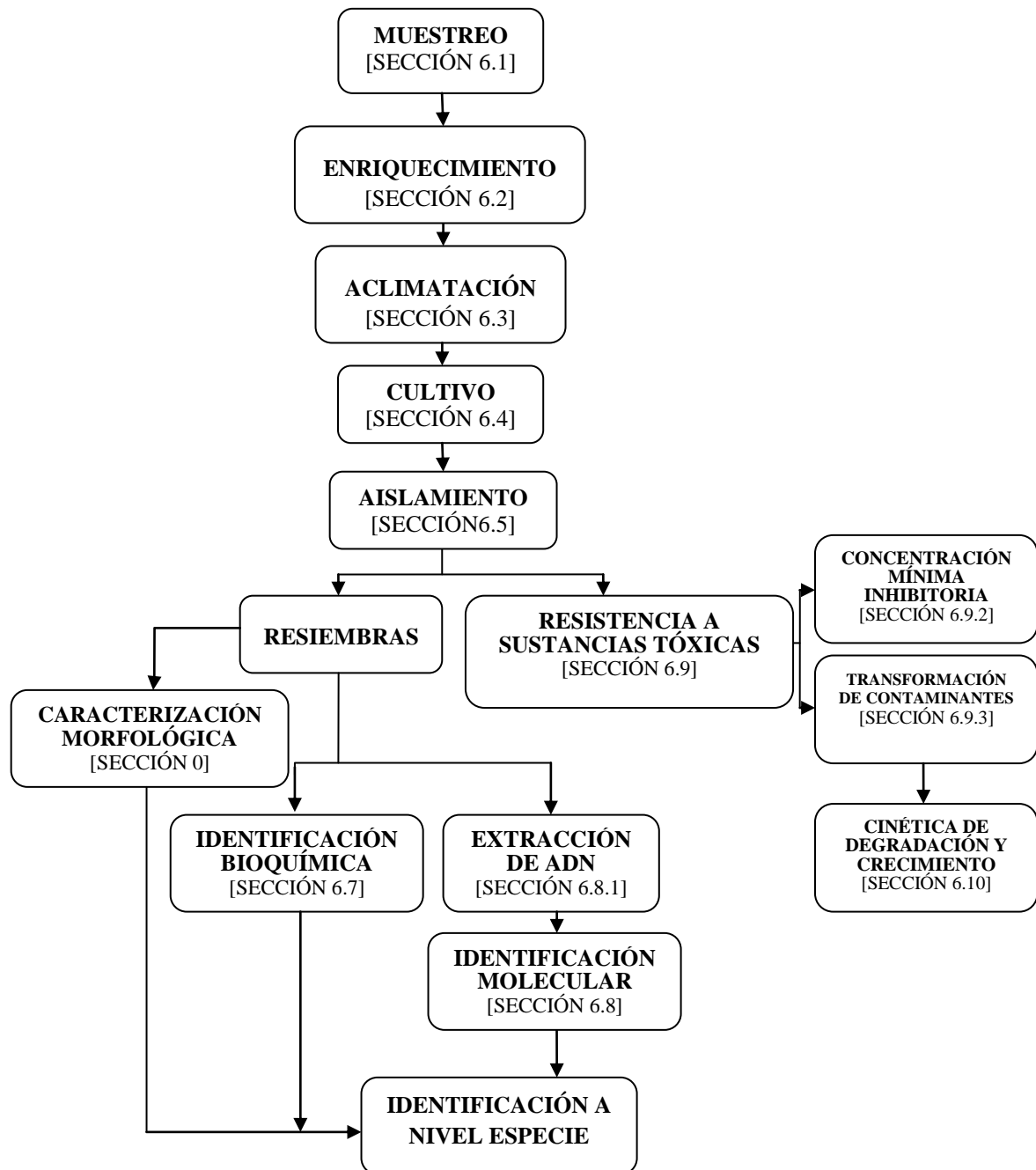


Figura 1. Diagrama general de actividades realizadas.

6.1 Selección de puntos de muestreo

El muestreo se llevó a cabo en época de estiaje en abril del 2009. El muestreo fue no probabilístico (Cochran, 1977), ya que se buscaron condiciones propicias para el establecimiento de bacterias resistentes a concentraciones altas de contaminantes. Se

tomaron cuatro consideraciones para la selección de los sitios: i) zonas de poca turbulencia, que facilitarían la acumulación de sedimento, ii) altas concentraciones de contaminantes: con base en estudios anteriores realizados en la cuenca alta del río Lerma, iii) concentración de sedimento debido a la topografía del lugar y a la aportación en zonas de descarga, iv) accesibilidad al sitio. Se seleccionaron tres sitios por el origen de sus descargas (Tabla 1) y por su clasificación como altamente contaminados según diversos autores (Arzate *et al.*, 1992; GEM, 1997; Ávila *et al.*, 1999; Tejeda, 2006; Fall *et al.*, 2007, Carreño, 2008; Zarazúa, 2008).

Tabla 1. Aportes municipales e industriales en las zonas más contaminadas del río Lerma.

| ZONA | PRINCIPALES DESCARGAS MUNICIPALES | PRINCIPALES DESCARGAS INDUSTRIALES |
|-----------------------------------|--|---|
| Puente carretera México-Toluca | Capulhuac, San Mateo Atenco, Zinacantepec, Barrio de Guadalupe, Tancuitlapan, San Pedro Tlatizapan, Ocoyoacac, Santiago Tiaguistenco, Metepec, Mexicalcingo. | PI de Ocoyoacac, Mexicalcingo, Metepec, San Mateo Atenco, Capulhuac, Guadalupe Atenco, Colector II Sur. |
| Totaltepec | Lerma, San Mateo Atarasquillo, Santa María Atarasquillo, Los Encinos | PI El Cerrillo I y II, PI Lerma, PI El Coecillo, Colector II Norte, PT Reciclagua. |
| Puente Carretera Toluca-Naucalpan | San Pedro Totaltepec. Santa María Totaltepec, San Mateo Otzatlapan | PI Exportec I y II, PI San Antonio Buenavista, Zona industrial de Toluca, PT Toluca Norte |

PI: Parque industrial.; PT: Planta de tratamiento de aguas residuales.

(Zarazúa, 2008).

Las secciones del río muestreadas se ubicaron en: a) Tultepec (zona carretera México-Toluca), b) colonia Isidro Fabela (Totaltepec) y c) el puente de la carretera Toluca-Naucalpan, cuya ubicación se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Sitios de muestreo de sedimento del río Lerma.

| Ubicación del sitio de muestreo | Coordenadas | | | |
|---|-------------|--------|-------------|-------------|
| | UTM | | Geográficas | |
| | X | Y | LATITUD | LONGITUD |
| (a) Sitio: calle Alfredo del Mazo y Villa Mar, Puente peatonal Tultepec. | 2117578 | 448303 | 19°9'.044" | 99°29'.044" |
| (b) Puente peatonal, col. Isidro Fabela, 500 m aguas arriba de la empresa Reciclagua. | 2132630 | 431052 | 19°17'.174" | 99°39'.373" |
| (c) Puente sobre el río Lerma, a lo largo de la carretera Toluca-Naucalpan. | 2142669 | 441678 | 19°22'.637" | 99°33'.323" |

De cada punto se tomó una muestra compuesta de tres sitios a lo ancho del río (centro, lateral derecho e izquierdo), utilizando los puentes peatonales de cada zona para tener

acceso a dichos puntos de muestreo y asegurar la draga (Figura 2).

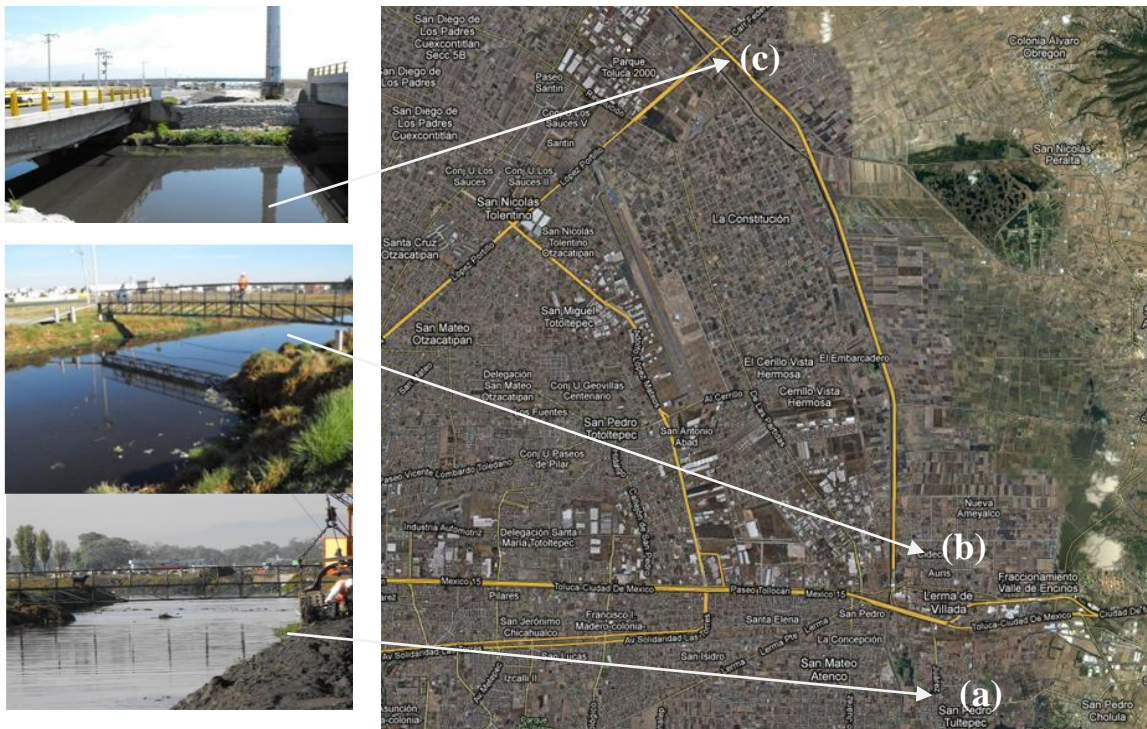


Figura 2. Ubicación de los tres sitios de muestreo.

6.1.1 *Parámetros evaluados*

En cada sitio, se registraron los datos siguientes: ubicación con geoposicionador (GPS), temperatura, conductividad y pH del agua utilizando un potenciómetro de campo HANNA HI991300.

6.1.2 *Manejo de muestras de sedimentos, homogenización, transporte y almacenamiento*

Las muestras de sedimento se tomaron utilizando una draga tipo ponar, sujetándola con una cuerda de los puentes peatonales de cada sitio (Figura 3). En cada punto a lo ancho del río (como se especificó anteriormente), se tomó una muestra de sedimento y se fue colocando en una bandeja de plástico (Figura 4). Una vez colocadas las tres muestras, se mezclaron con una pala de plástico, para formar una muestra compuesta, una vez homogénea se tomó una alícuota de aproximadamente 3 kg y se colocó dentro de una bolsa con cierre estéril, debidamente etiquetada. Posteriormente se colocó cada muestra en una hielera con hielo, para su traslado al laboratorio.

Una vez en laboratorio las muestras fueron inóculadas durante las primeras 4 horas después de la colecta. El resto se conservó a 4°C por seis meses, como reserva de cepas, en caso de

imprevistos.



Figura 3. Draga tipo ponar utilizada en el muestreo de sedimento.



Figura 4. Conformación de la muestra compuesta.

6.2 Enriquecimiento de la comunidad bacteriana del sedimento

Cuando se trabaja con microorganismos obtenidos de fuentes ambientales, es necesario adaptarlos a las condiciones de trabajo en laboratorio, con este fin se planteó para este estudio la etapa de enriquecimiento de la comunidad del sedimento muestreado. Los objetivos de la etapa de enriquecimiento fueron: (i) adaptar a la comunidad microbiana a las condiciones de trabajo (aerobiosis, medio líquido, agitación), (ii) aumentar la biomasa, (iii) recuperar células dañadas y estructuras de resistencia, (iv) eliminar las partículas de sedimento mediante resiembras, y (v) permitir una primera selección al no incluir fuentes de carbono en el medio de resiembra. De esta forma se seleccionaron a las bacterias con capacidades metabólicas complejas para utilizar la materia disuelta proveniente del sedimento.

El mismo día de la inoculación del sedimento en el medio de enriquecimiento, se realizó una evaluación de la cantidad de bacterias presentes en el sedimento cuantificando las unidades formadoras de colonias (UFC), con el objetivo de determinar si se contaría con suficientes bacterias para trabajar, para lo cual se realizó una serie de diluciones partiendo de una solución de 1 g de sedimento peso húmedo en 10 mL de agua de dilución estéril, realizando 6 diluciones sucesivas 1 a 10. De cada tubo se tomó 1 mL y se colocó en una placa de petri estéril, posteriormente se le agregó agar nutritivo estéril a 35° C y se dejó solidificar, se incubó a temperatura ambiente. Para el cálculo se aplicó la siguiente

ecuación:

$$\frac{\text{UFC}}{\text{g sedimento}} = \frac{\text{UFC X placa}}{1 \text{g sedimento inicial}} \cdot \frac{10 \text{ mL dilución}}{1 \text{ mL X placa}} \cdot \text{Factor de dilución} \quad \text{Ecuación (1)}$$

Después de llevar a cabo la recolección de las muestras y una vez en el laboratorio, se realizó la inoculación del sedimento (20% peso húmedo/vol) por duplicado en el medio de cultivo correspondiente a la fase de enriquecimiento donde se utilizó un medio mínimo de sales (MMS) (composición mg L⁻¹: 11, MgSO₄·7H₂O; 14, CaCl₂; 340, KH₂PO₄; 670, Na₂HPO₄·7H₂O; 22, FeCl₃·6H₂O; 500, NH₄Cl) libre de fuente de carbono, durante esta etapa se incubó a la comunidad bacteriana bajo las siguientes condiciones: medio de cultivo líquido, condiciones aerobias por agitación a 100 rpm y temperatura ambiente (20-23 °C) (Figura 5). A la par, se sembró un control negativo y un blanco como control de esterilidad. Como blanco se estableció 20% de buffer de fosfato a pH 7.4 estéril en MMS líquido y como control negativo 20% de sedimento estéril en MMS líquido.



Figura 5. Condiciones de incubación en la etapa de enriquecimiento.



Figura 6. Aspecto de la dilución de sedimento por diluciones consecutivas.

Se realizaron un total de 5 resiembras al 20% de inóculo (volumen:volumen) en MMS estéril, bajo condiciones asépticas, las dos primeras resiembras se realizaron después de tres semanas de incubación, la tercera resiembra dos semanas después y las restantes después de una semana de incubación. El tiempo entre cada resiembra se estableció con base en el monitoreo de crecimiento, realizado cada semana sobre agar cuenta estándar mediante la técnica de estriado abierto (Figura 7 y Figura 8). Se establecieron 5 resiembras ya que en

este punto el medio de cultivo se observó claro sin presencia aparente de sedimento, resultado de las diluciones entre cada resiembra (Figura 6).

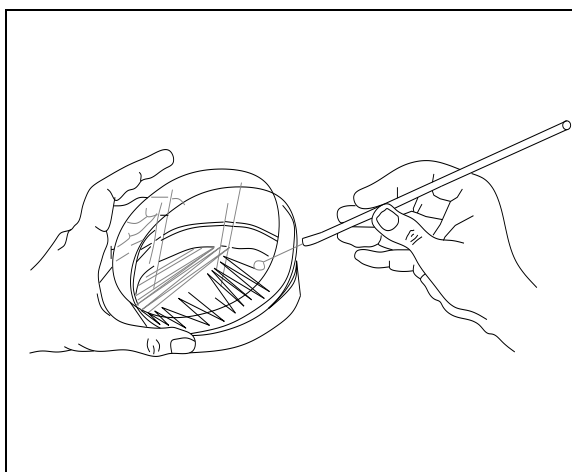


Figura 7. Técnica de estriado abierto utilizada para aislar colonias bacterianas.



Figura 8. Monitoreo de crecimiento sobre agar cuenta estándar.

Las resiembras se realizaron dejando reposar el matraz de cultivo 20 minutos, para permitir la sedimentación de partículas mayores, con una pipeta estéril se tomó en condiciones asepticas 10 mL de cultivo de la superficie y se inoculó en un matraz Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de MSM estéril.

En esta etapa también se realizó una prueba de resistencia directa (sin la aplicación de medios selectivos) mediante la técnica de antibiograma (Figura 9), para detectar células potenciales para su aislamiento directo. Para seleccionar estas primeras cepas se montó el siguiente experimento: en placas de petri estériles se colocó por duplicado, 1 mL de cada muestra de cultivo. La muestra se obtuvo del cultivo de enriquecimiento previa incubación y antes de realizar la primera resiembra. Después de la inoculación se vació agar cuenta estándar (CS) a 35° C sobre la muestra. En una repetición de la serie para cada placa petri se colocaron 4 discos de papel filtro estériles de 0.5 cm de diámetro, impregnados de una solución de 0.34 M de Cr (VI) para buscar bacterias resistentes a Cr (VI). Para bacterias resistentes a PM se utilizaron discos sumergidos en una solución de PM 0.065 M. Las placas de petri fueron incubadas a temperatura ambiente por 48 h. Una vez observado crecimiento, se tomaron las colonias más cercanas a la zona de difusión del papel filtro impregnado con cada contaminante (menos de 1 cm).

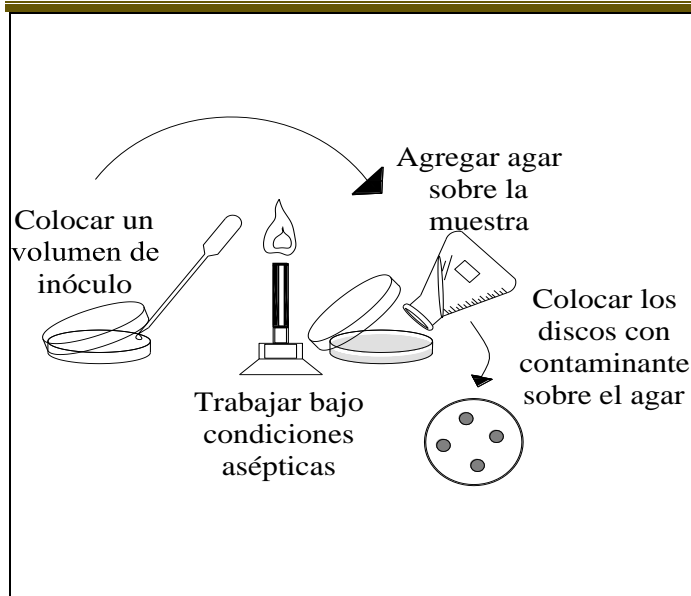
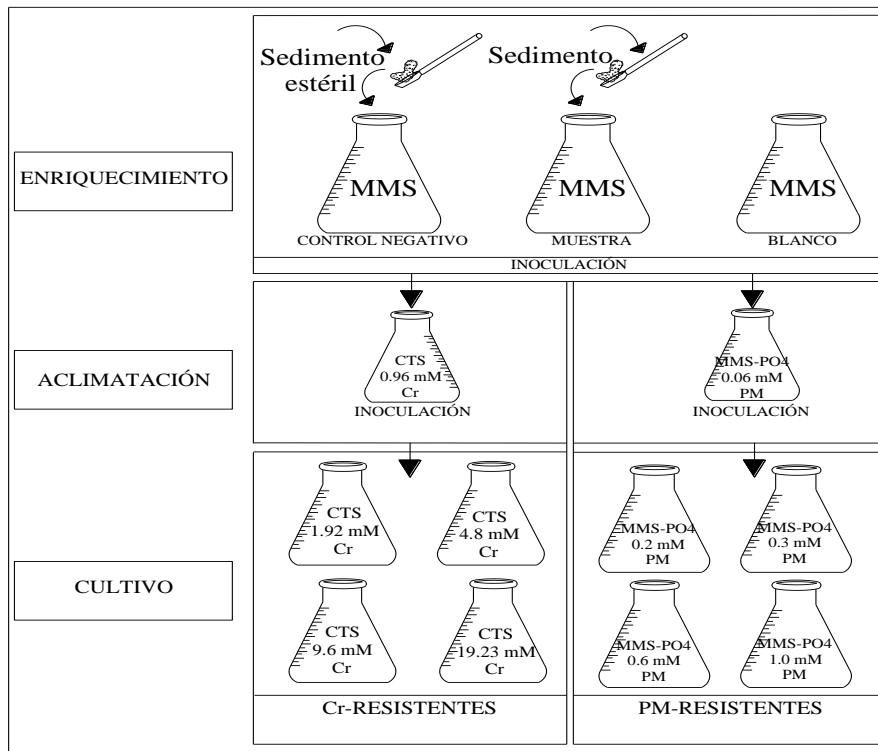


Figura 9. Técnica de inoculación para antibiograma.

En la Figura 10 se presentan los medios utilizados en las fases de enriquecimiento, aclimatación y cultivo.



MMS: medio mínimo de sales.
TS: medio tripticaseína y soya.

MMS-PO₄: medio mínimo de sales libre de fosfato
PM: paratión metílico

Figura 10. Principales fases para el cultivo de bacterias resistentes a Cr (VI) y PM, así como sus respectivos medios de cultivo.

6.3 Aclimatación con Cr (VI) y PM

En esta etapa se sometió a la comunidad bacteriana a concentraciones bajas de los contaminantes de interés y un medio de cultivo que favoreciera el crecimiento y selección de bacterias resistentes, así como la inhibición de aquellas cepas altamente sensibles. Las concentraciones de contaminante que se manejaron en esta etapa se obtuvieron de Donmez y Kocberber (2004), y Ortíz-Hernández *et al.* (2001) estas concentraciones fueron bajas para evitar la muerte súbita de las comunidades bacterianas, debido al choque tóxico. El medio para bacterias resistentes a Cr (VI) fue el caldo de tripticaseína y soya (CTS) (composición g L^{-1} : 15, peptona de caseína; 5, peptona de soya; 5, NaCl), se agregó solución de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ para lograr una concentración de Cr de 0.96 mM ($\pm 50 \text{ mg L}^{-1}$). Para bacterias resistentes al paratión metílico (PM), se utilizó el medio MMS modificado (libre de fosfatos) (composición mg L^{-1} : 11, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 187, KCl; 320, NaCl; 14, CaCl_2 ; 22, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 500, peptona), para paulatinamente ir eliminando el fosfato adicionado. Se enriqueció con paratión metílico (PM) hasta obtener una concentración 0.06 mM ($\pm 17.6 \text{ mg L}^{-1}$). Una vez preparados los medios de cultivo con el contaminante, se inocularon 20% (volumen:volumen) de las siembras provenientes de la etapa de enriquecimiento incluyendo el control negativo. Se preparó un nuevo tubo con el mismo lote de medio de cultivo como blanco y control de esterilidad.

Se realizaron 2 resiembras con dos semanas de incubación, después se realizaron 3 resiembras más, esta vez con 10% de inóculo con una semana de incubación. Se monitoreó el crecimiento por estriado en placa sobre agar cuenta estándar (CS) una vez por semana antes de llevar a cabo cada resiembra.

6.4 Cultivo selectivo de bacterias resistentes a Cr (VI) y PM

Todas las series se realizaron por triplicado y los controles de esterilidad se prepararon conteniendo únicamente medio de cultivo con las concentraciones de contaminante correspondiente. La cantidad de inóculo correspondió al 10% del medio de siembra.

Para seleccionar las bacterias resistentes al Cr, se utilizó el medio CTS y se incubó a temperatura ambiente en agitación a 100 rpm. Las concentraciones de Cr que se manejaron fueron: 1.92, 4.8, 9.6 y 19.23 mM ($\pm 100, 250, 500$ y $1,000 \text{ mg L}^{-1}$) (Donmez y Kocberber, 2004). Para las bacterias resistentes al PM se utilizó el medio MMS modificado (libre de

fosfatos) con concentraciones de 0.2, 0.3, 0.6 y 1 mM (58.6, 88, 176 y 293.2 mg L⁻¹) de PM, también se incubaron a temperatura ambiente y en agitación a 100 rpm (Figura 11) (Ortíz-Hernández, 2001). Una asada de muestra de cada comunidad fue inoculada en agar inclinado para su conservación (Figura 12).



Figura 11. Bacterias incubadas en medio líquido selectivo de Cr (VI) y PM.

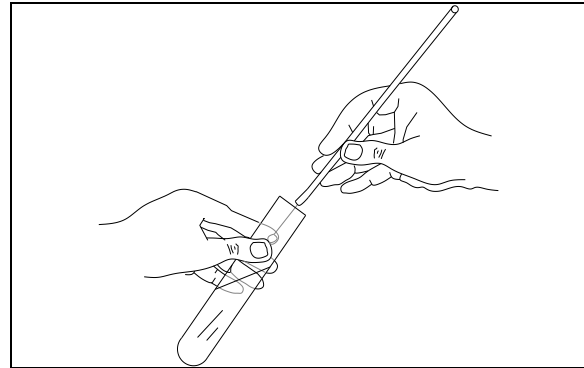


Figura 12. Técnica de inoculación en agar inclinado.

Una de las muestras de cada sitio, provenientes de la fase de aclimatación, fueron sometidas por triplicado a diferentes concentraciones de contaminante; para Cr-resistentes se aplicaron concentraciones de 1.92, 4.8, 9.6 y 19.23 mM de Cr (VI) en medio líquido, se revisaron los tubos a los 2 días y una semana de incubación para evaluar la aparición de turbidez.

Para observar la calidad de las colonias resistentes a los contaminantes de interés, se realizaron siembras en medio sólido por asada, utilizando ATS enriquecido con 0.96 mM (50 mg L⁻¹) de Cr VI para bacterias resistentes a éste y AMMS modificado enriquecido con 0.03 mM (8.8 mg L⁻¹) de PM para cepas resistentes a PM.

Una vez observado el crecimiento de biomasa durante la etapa de cultivo, se inoculó por estría abierta en tubos de agar inclinado de 15 mL con 8 mL de ACS, se incubaron a temperatura ambiente (20-23° C) por 24 horas. Estas cepas fueron conservadas de forma permanente en viales con glicerol al 30% en nitrógeno líquido a -80° C para futuras aplicaciones.

6.5 Aislamiento de bacterias resistentes a Cr (VI) y PM

Para la obtención de cepas puras en la etapa de aislamiento, se utilizaron los cultivos de mayor concentración de contaminante en los que se observó crecimiento. Se inoculó con asa por la técnica de estriado abierto en placa: con agar de tripticaseína y soya (ATS)

(composición g L⁻¹: 15, peptona de caseína; 5, peptona de soya; 5, NaCl; 15, agar) adicionado con 1.92 mM de Cr (VI), para bacterias resistentes al Cr, y agar mínimo de sales modificado (AMSM) (composición mg L⁻¹: 11, MgSO₄·7H₂O; 187, KCl; 320, NaCl; 14, CaCl₂; 22, FeCl₃·6H₂O; 500, peptona; 15,000, agar) adicionado con 0.2 mM PM para las bacterias resistentes a este último compuesto.

De las placas anteriores y con la ayuda de una aguja bacteriológica, se aislaron colonias con diferentes características morfológicas como tamaño, color, elevación y textura, y se traspararon a tubos con CTS para bacterias resistentes a Cr, y MMS modificado adicionado con 0.2 mM de PM para bacterias resistentes a este contaminante. Para purificar las colonias aisladas, los tubos inoculados fueron incubados por dos días, y posteriormente se resembraron en placa por estriado abierto en ATS adicionado con 1.92 mM de Cr (VI) para bacterias resistentes al Cr y en AMMS modificado adicionado con 0.2 mM de PM para bacterias resistentes a este contaminante. Se realizaron un total de 5 ciclos de resiembras de medio líquido a sólido (Figura 13).

Al finalizar la última purificación, y para comprobar que las cepas eran uniespecíficas, se observaron bajo un microscopio de contraste de fases, posteriormente fueron inoculadas por asada abierta en tubos con agar inclinado y se incubaron por 24 h a 21±1 °C. Finalmente las cepas, se colocaron a -80 °C en glicerol 30% y nitrógeno líquido. Una buena parte de las cepas aisladas, después de ser observadas bajo el microscopio, resultaron ser consorcios bacterianos, las cuales, se sometieron nuevamente a técnicas de aislamiento.

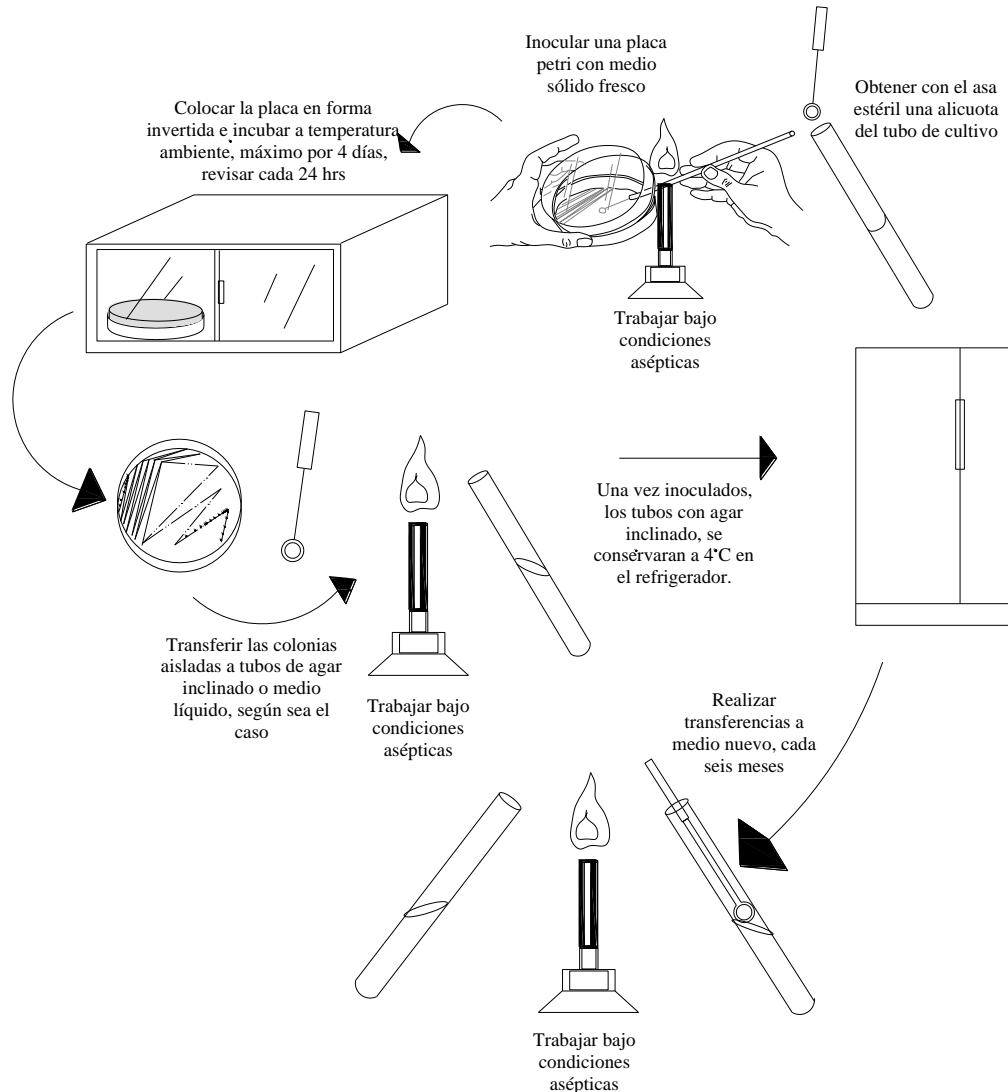


Figura 13. Técnica para realizar las resiembras de medio sólido a líquido.

Durante esta etapa se sometió a diversos ciclos de aislamiento a cada una de las cepas preseleccionadas de la etapa de cultivo (Figura 13 y Figura 14). Cada colonia fue sembrada en medio sólido, seleccionada (Figura 14) y transferida a medio líquido. Después de tres ciclos de aislamiento, se le denominó y numeró como “lote #”. Durante los distintos ciclos de aislamiento de las colonias se encontraron algunos casos de difícil manipulación (Figura 15), dado el tamaño o la falta de color de la colonia, por lo tanto, no todas las cepas aisladas fueron seleccionada para seguir el proceso de aislamiento, sin embargo, estas colonias fueron conservadas para su aplicación futura.



Figura 14. Aspecto de colonias de fácil aislamiento.

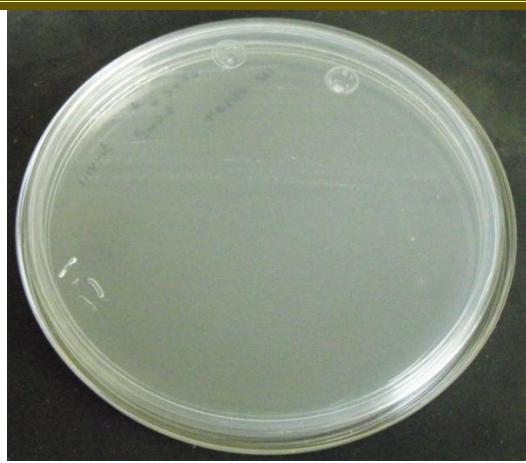


Figura 15. Aspecto de colonias difíciles de aislar.

6.6 Caracterización morfológica

Para la observación morfológica de las células y de las colonias se realizaron un total de 12 resiembras alternando medio sólido (agar CS) y caldo (CTS para Cr-resistentes y CTS al 10% para PM-resistentes). En la placa de la decimosegunda resiembra y cada tercer resiembra, se registraron las características de cada colonia (utilizando los números y características presentadas en la Tabla 3), se catalogó la información obtenida durante la observación macroscópica, microscópica y la aplicación de medios diferenciales en una lista, asignando un código numérico según sus características. Posteriormente se analizaron los códigos de las cepas para eliminar dualidades (Sección 6.6).





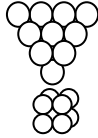









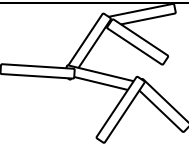
Tabla 3. Clasificación numérica de las características morfológicas coloniales evaluadas.

| Forma | | Elevación | | Borde | |
|------------|-------------|-----------|--------------|---------------|---------------|
| 1 | Puntiforme | 1 | Lisa o plana | 1 | Entero |
| 2 | Circular | 2 | Elevada | 2 | Ondulado |
| 3 | Filamentosa | 3 | Convexa | 3 | Lobado |
| 4 | Irregular | 4 | Pulvinada | 4 | Recortado |
| 5 | Rizoide | 5 | Acuminada | 5 | Filamentoso |
| 6 | Fusiforme | 6 | Crateriforme | 6 | Rizado |
| Superficie | | Color | | Transparencia | |
| 0 | Lisa | 1 | Blanco | 0 | Opaca |
| 1 | Rugosa | 2 | Rosa | 1 | Transparente |
| | | 3 | Beige | | Brillo |

| | | |
|--|-------------------|---|
| | 4 Amarillo | 0 Presencia 1 Ausencia |
|--|-------------------|---|

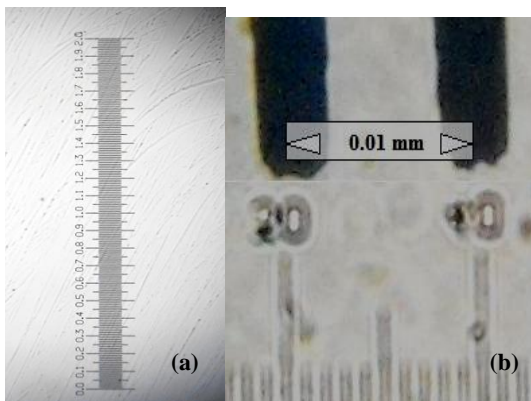
De esta misma placa se tomaron muestras para llevar a cabo la observación microscópica que consistió en la observación de una preparación en fresco y una fija aplicando tinción de Gram (Anexo 4). La preparación en fresco se utilizó para la observación “*in vivo*” de la forma celular, tipo de agrupación, movilidad, observación de cápsulas o esporas utilizando el microscopio de contraste de fases. La preparación fija se utilizó además de la caracterización como Gram (+) o Gram (-), para determinar el tamaño celular. Una vez obtenidas las láminas, se observaron bajo un microscopio óptico a 40X y un microscopio de contraste de fases hasta inmersión 100X, registrándose las características morfológicas celulares de acuerdo a la clasificación de la Tabla 4.

Tabla 4. Clasificación numérica de las principales características celulares de las cepas bacterianas.

| Forma celular | | Agrupación | |
|-----------------------------|---|---------------------------|---|
| 1 Cocos |  | 1 Diplococos |  |
| | | 2 Tetracocos |  |
| | | 3 Estreptococos |  |
| | | 4 Estafilococos |  |
| | | 5 Sarcina |  |
| 2 Bacilos |  | 7 Sin orden |  |
| | | 8 Diplobacillus |  |
| 3 Coco-bacilos |  | | |
| 5 Vibriones |  | 9 Estreptobacillus |  |
| | | |  |
| 6 Bacilos miceliares |  | 12 Miceliar |  |
| Movilidad | | Tinción de GRAM | KOH |
| 0 Células inmóviles | | 0 Gram (-) | 0 Viscosidad |
| 1 Células móviles | | 1 Gram (+) | 1 No viscosidad |

También se realizó la prueba de hidróxido de potasio (KOH) (confirmación de tinción de Gram, ver Anexo 5), el fundamento de ésta técnica se basa en la diferencia bioquímica entre las paredes celulares de las bacterias Gram (+) y Gram (-), ya que una solución acuosa de KOH al 3% disuelve la pared y la membrana celular de las bacterias Gram (-) lo cual libera el ADN, que al mezclarse con el citoplasma y la solución de KOH genera la viscosidad en la reacción.

El tamaño celular se midió en la Facultad de Ciencias de la UAEM, utilizando un microscopio óptico Leica CME® con un ocular adaptado a una retícula micrométrica Cambridge instruments® de 5 mm dividida en 50 unidades, calibrado con un micrómetro Reichert-Jung® de 2 mm dividido en unidades de 0.01 mm.



a) Aspecto del micrómetro observado a 10 X, donde se observan los 2 mm divididos en 200 unidades de 0.01 mm cada una.

b) Las líneas más gruesas corresponden a las divisiones del micrómetro observado con un aumento a 100 X. Las líneas más tenues observadas corresponden a la retícula a calibrar, con la cual se midieron directamente las bacterias. Para este caso 10 unidades de retícula corresponden a 0.01 mm, y cada unidad de retícula a 0.001 mm (1µm).

Figura 16. Calibración de la retícula micrométrica.

Con el cultivo líquido, se inocularon por técnica de picadura (Figura 17) placas con medios diferenciales: agar urea (AU), agar verde brillante bilis (AVB), agar eosina azul de metileno (EMB), agar de tripticaseína y soya (ATS), agar MacConkey (AMC) y agar hierro triple azúcar (TSI), para identificar grupos característicos (Tabla 5).

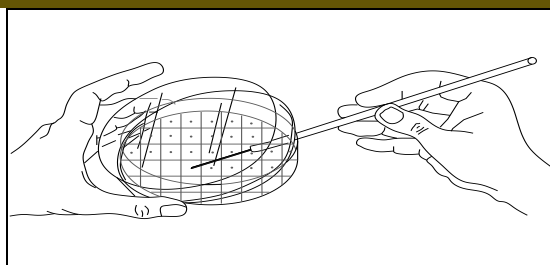


Figura 17. Técnica de inoculación por picadura.

Se catalogó la información obtenida durante la observación macroscópica, microscópica y la aplicación de medios diferenciales en una lista, asignando un código numérico según sus características. Posteriormente, se analizaron los códigos de las cepas para evitar dualidades (Sección 6.6). Aquellas cepas difíciles de identificar fueron conservadas en agar inclinado.

Tabla 5. Clasificación numérica de los grupos bacterianos representativos para cada medio diferencial.

| Reacción ante los medios diferenciales aplicados | |
|--|--|
| Agar Urea | 0 No característica: no crecimiento. |
| | 1 Bacterias entéricas no auregenes excepto: <i>Salmonella sp.</i> y <i>Shigela sp.</i> crecimiento |
| Agar verde brillante bilis | 0 No característica: otras. |
| | 1 Fermentadoras de lactosa: colonias (C) amarillas. |
| | 2 <i>Proteus sp.</i> : C. rojas |
| | 3 <i>Salmonella sp.</i> : C. blanco rosácea con halo rojo brillante. |
| Agar eosina y azul de metileno | 0 No característica: otras. |
| | 1 <i>Salmonella sp.</i> , <i>Shigela sp.</i> : ± 2 mm, C. incoloras a amarillo. |
| | 2 Fermentadoras de lactosa y sacarosa: C. rosa opaco. |
| | 3 Coliformes: C. oscuras, rosa pálido mucoide grisáceo. |
| | 4 <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella sp.</i> : C. verde violeta oscuro metálico. |
| 5 <i>Enterobacter sp.</i> : C. azul purpura brillo metálico. | |
| Agar tripticaseína y soya | 0 No característica: indol negativa. |
| | 1 <i>E. coli</i> : indol positiva. |
| Agar Mac Conkey | 0 No característica: No crecimiento. |
| | 1 Fermentadores de lactosa: C. rosas. |
| | 2 No fermentadoras de lactosa: C. incoloras. |
| 3 <i>Salmonella sp.</i> : C. incoloras centro oscuro. | |
| Agar hierro y triple azúcar | 0 No característica: no crecimiento. |
| | 1 <i>Salmonella sp.</i> : fondo amarillo y superficie roja. |

6.7 Identificación bioquímica

De las bacterias identificadas morfológicamente, y una vez establecida su resistencia a cada contaminante, se tomaron aquellas que cumplieron con los requerimientos del kit API 20E (bacterias entéricas, Gram (-), para su identificación por este medio, aplicando las

Rocío Bojorquez Aguilar.

instrucciones del fabricante. Esta técnica estandarizada y patentada se utilizó como un método de identificación rápido y económico para obtener una identificación preliminar de la mayoría de las cepas aisladas. Aquellas bacterias que no cumplieron con dichos requisitos o que presentaron perfiles bioquímicos no concluyentes, se identificaron vía molecular secuenciando el gen 16S rARN de cada cepa aislada.

El API 20E consta de una galería con 20 microtubos cada una, que contienen substratos deshidratados (Figura 18). Éstos se hidratan inoculando una suspensión bacteriana de la cepa a identificar (Figura 19). Una vez realizada la inoculación de la galería con el cultivo axénico (Figura 20), se colocan a incubar bajo condiciones de humedad, para evitar la deshidratación de los medios de cultivo (Figura 21). Las condiciones de humedad se logran aplicando aproximadamente 5 mL de agua destilada en el fondo de la cámara incluida en el kit, se coloca cuidadosamente la galería ya inoculada dentro de la cámara y se coloca la cubierta (ésta no debe sellarse para permitir el paso de aire).

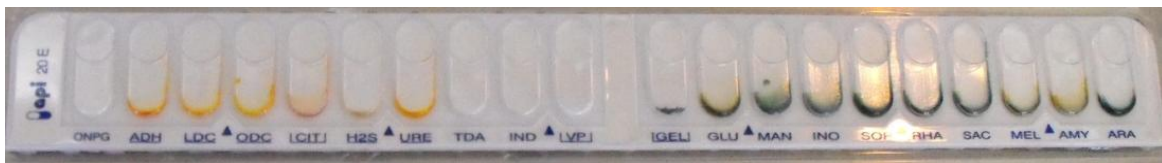


Figura 18. Galería API 20E sin inocular con medios deshidratados.



Figura 19. Aspecto de la galería API 20E inoculada con medios hidratados.

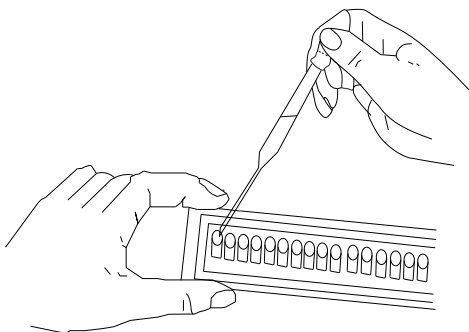


Figura 20. Inoculación de la galería API 20E.



Figura 21. Incubación de la galería API 20E en condiciones de humedad.

Las reacciones bioquímicas a evaluar son:

1. Utilización de sustratos: arginina (ADH), lisina (LDC), ornitina (ODC), citrato (CIT), urea (URE), triptófano (TDA), gelatina de Kohn (GEL), glucosa (GLU), manitol (MAN), inositol (INO), sorbitol (SOR), ramnosa (RHA), sacarosa (SAC), melibiosa (MEL), amigdalina (AMY), arabinosa (ARA).
2. Producción de sustancias: H₂S, indol (IND), acetoina (VP), citocromo oxidasa (OX).

Durante la incubación se producen cambios de color espontáneos o con la adición de reactivos, los cuales dependen de la utilización del sustrato evaluado o la producción de ciertas sustancias. La identificación se lleva a cabo aplicando los resultados de 21 pruebas bioquímicas incluyendo el test oxidasa que no está en el kit API 20E (Ver procedimiento Anexo 6). Los resultados se ordenan del 1 al 21 y se separan en tríos, dependiendo de la ubicación de la prueba y si el resultado es positivo (Figura 22) se suma en el triplete el valor asignado, cuando el resultado es negativo corresponde a 0 (Figura 23), se obtiene un código numérico de siete cifras. El código es buscado en una base de datos, para obtener la especie que cumple con este perfil bioquímico.



Figura 22. Aspecto de la galería API 20E con resultados positivos (48 h de incubación máxima).

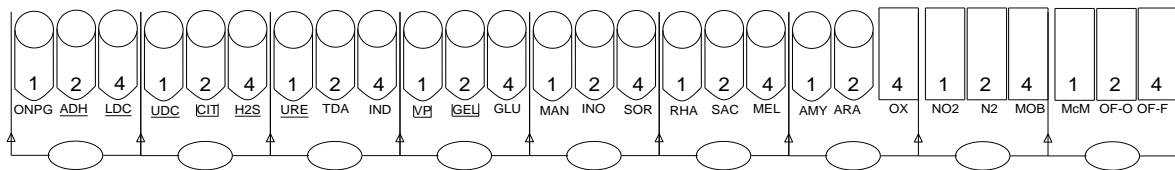


Figura 23. Figura utilizada para la captura del número de identificación bioquímica.

En algunos casos el perfil de 7 cifras no discrimina lo suficiente, debiendo realizarse pruebas complementarias:

- Reducción de nitritos a nitratos (NO₃).
- Reducción de nitratos a nitrógeno (N₂).
- Movilidad.

- Cultivo en medio MacConkey.
- Oxidación de la glucosa.
- Fermentación de la glucosa.

Con estas pruebas complementarias y el kit principal, se obtiene un código de 9 cifras, el cual también puede ser buscado en la base de datos incluida en el kit. Las especies identificadas van acompañadas de un porcentaje de certeza, el cual fue obtenido al probar el kit con 7,900 cepas pertenecientes a las 102 especies incluidas en la base de datos.

6.8 Análisis molecular de cepas resistentes a Cr (VI) y PM

Para identificar cada cepa vía molecular, se tomó una muestra y se realizaron resiembras en medio líquido (correspondiente al utilizado en la etapa de cultivo), pero sin adicionar contaminante, para evitar cambios en la morfología celular o interferencias durante la extracción de ADN. Una vez obtenido el ADN de cada cepa, se procedió a amplificar el gen 16S, aplicando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se enviaron las secuencias para su identificación a la empresa estadounidense Macrogen Corp. (Figura 24).

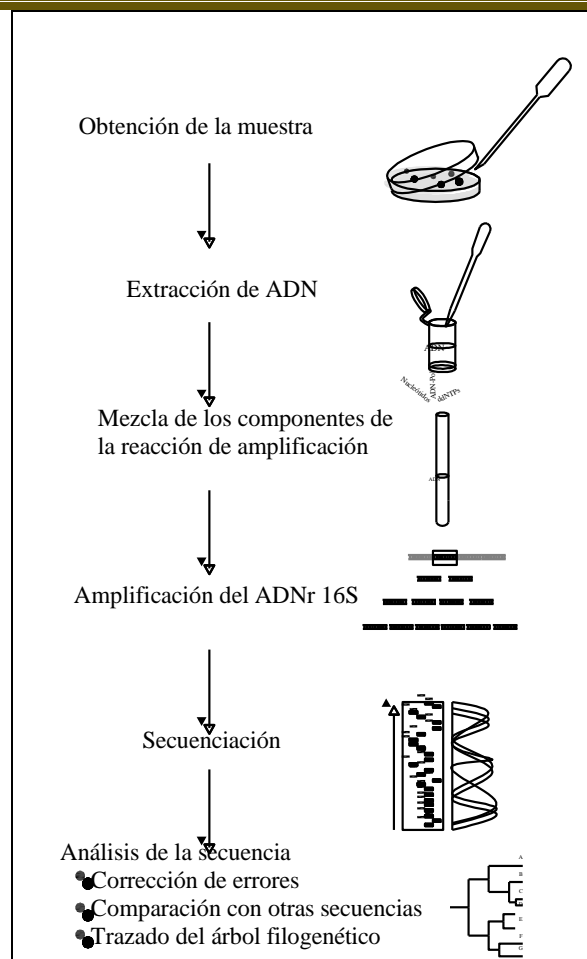


Figura 24. Etapas para la identificación molecular.

6.8.1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN, primero se realizó un cultivo reciente (no más de 72 h) de la cepa de interés, se centrifugó a 6,000 rpm por 10 min para concentrar la biomasa (Figura 25), y se resuspendió el pellet en 500 μ L de agua destilada. La extracción de ADN se llevó a cabo por medio de un kit de extracción de alta recuperación (Ultraclean Soil DNA isolation, Mo Bio Laboratories, Inc), de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

El principio de la técnica de extracción es separar el ADN de otras moléculas presentes en la célula bacteriana. La mayoría de las técnicas se basan en las mismas reacciones químicas para lograr este objetivo, variando en algunos casos las sustancias utilizadas para las reacciones. El primer paso es la destrucción de la pared y membrana celular, esto se logra con la aplicación de un detergente, se puede combinar con lisis mecánica (Figura 26), para

favorecer la destrucción de la pared bacteriana o dado el caso, la ruptura de estructuras de resistencia. Para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en las muestras de ADN, se aplicó una sustancia para precipitar sustancias inhibidoras de PCR. Después de centrifugar la mezcla anterior, los componentes de la membrana y paredes celulares precipitaron y se recuperó el sobrenadante. El siguiente paso fue precipitar las proteínas que se encuentran íntimamente ligadas al ADN, para lo cual se agregó una sustancia precipitante, después de centrifugar se recupera el sobrenadante, en donde se encuentra el ADN.



Figura 25. La concentración de la biomasa (a) se realiza por centrifugación (b).



Figura 26. Las perlas en el tubo (a) en combinación con la aplicación de vortex (b), se utiliza para la lisis mecánica de la pared celular y posibles estructuras de resistencia.

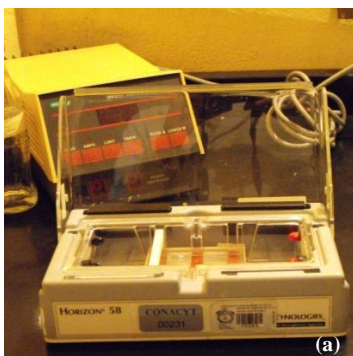
El kit de extracción de alta recuperación utilizado, contiene un filtro especial, al cual el ADN se une, lo que permite un mínimo de pérdidas en el último lavado, en donde se eliminan los últimos remanentes de sustancias celulares. Al final el filtro se lava con una solución buffer de recuperación en donde el ADN queda diluido y listo para su utilización (en el Anexo 7 se incluyó el protocolo de extracción aplicado).

6.8.2 Evaluación del ADN mediante electroforesis

Para la evaluación de la calidad y cantidad del ADN extraído, se utilizó la técnica de electroforesis, el término electroforesis se usa para describir la migración de una partícula

cargada bajo la influencia de un campo eléctrico. Se aplicó electroforesis de zona, en la cual la muestra se desplaza sobre un soporte sólido, como papel de filtro, celulosa o gel (agarosa o acrilamida) y los componentes de la muestra migran en forma de pequeñas bandas, también llamadas zonas. Para ADN se utilizan geles de agarosa a diferentes concentraciones. Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Debido a que el ADN tiene carga negativa, moléculas de diferente tamaño van a emigrar de polo positivo a negativo. Además, si en dicha electroforesis se aplican marcadores de peso molecular (fragmentos de DNA de tamaño conocido) se puede calcular el tamaño aproximado del DNA en estudio.

Para éste estudio se utilizó un gel de agarosa al 0.8% adicionada con 2 μL de bromuro de etidio (10 mg mL^{-1}) que es una sustancia que se intercala entre las bases del ADN y es fluorescente cuando se ilumina con luz ultravioleta, lo cual hace posible observar las bandas de ADN. Para determinar el tamaño aproximado y cantidad de ADN se utilizó un marcador de peso molecular (MPM) ®. Se colocaron en cada uno de los pozos del gel 1 μL de ADN y 1 μl de bufer de carga con bromofenol como colorante, y se colocó en cada extremo del gel 2.5 mL de MPM. El voltaje de trabajo fue 1 minuto a 157 V y 1 hora a 70 V. Una vez finalizado el tiempo de corrida, se colocó el gel sobre un transluminador de luz UV y se fotografió con una cámara Kodak® (Figura 27), se trabajó en el laboratorio de Biología molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, de la Universidad Autónoma del Estado de México.



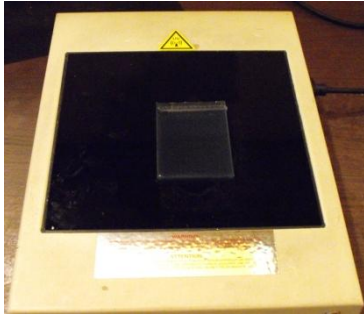


Figura 27. Cámara de electroforesis y fuente de poder (a), Transluminador de luz UV con gel a fotografiar (b) y cámara fotográfica adaptada al transluminador (c).

6.8.3 *Reacción en cadena de la polimerasa*

Los iniciadores específicos utilizados para amplificar el gen 16S fueron: iniciador sentido 63F (5'-3': CAGGCCTAACACATGCAAGTC) y contrasentido 1389R (5'-3': ACGGCGGTGTGTACAAG) Sigma®. La reacción y secuenciación del producto de PCR se llevó a cabo por la empresa estadounidense MacroGen Corp.

6.8.1 *Análisis de las secuencias*

El producto de PCR fue secuenciado adecuadamente por la empresa MacroGen Corp. y enviado vía internet. Las secuencias recibidas fueron alineadas y analizadas con el software libre: Mega 4 © 1993-2008, Koichiro Tamura, Joel Dudley, Masatoshi Nei, Sudhir Kumar.

Las secuencias corregidas fueron ingresadas en la base de datos del GenBank (NCBI, 2010), para obtener los porcentajes de similitud entre la secuencia corregida y las secuencias del gen ARN 16S de la base de datos. Las especies obtenidas fueron comparadas con las características morfológicas y coloniales de las cepas aisladas para la identificación final (Anexo 13).

6.9 Capacidad de degradación y/o transformación de Cr (VI) y PM

6.9.1 *Selección de porcentaje de inóculo y concentración de Cr (VI)*

Para la preparación de las pruebas de transformación de Cr (VI), se diseñaron dos pruebas de resistencia, una para establecer la cantidad mínima de inóculo y otra para establecer concentración adecuada de contaminante a manejar. Se trabajaron con concentraciones de

2.88, 5.77, 11.53 y 23 mM (150, 300, 600 y 1,196 mg L⁻¹) de Cr (VI) en tubos de 15 mL con 10 mL de CTS, y con: 0.5, 1 y 5% de inóculo, procurando colonias en fase estacionaria de crecimiento (48 h de incubación, respecto a las etapas previas de cultivo) que aseguran la mayor cantidad de biomasa, los tubos se mantuvieron bajo condiciones de incubación (ver sección 6.2).

Se monitoreó la presencia o ausencia de turbidez en los tubos diariamente, y se registró el primer día en que se presentó crecimiento. Después del periodo de incubación (7 días), se observó la biomasa “*in vivo*” bajo el microscopio de contraste de fases, para establecer si existían mecanismos físicos de defensa ante la presencia de Cr como formación de estructuras en estado vegetativo o formación de colonias.

Para bacterias resistentes a PM no se realizó esta prueba, ya que durante la etapa de aislamiento se comprobó que un inóculo menor al 5% retrasa el crecimiento, por lo tanto se definió utilizar un 10% de inóculo y 0.75 mM (220 mg L⁻¹) de PM, de acuerdo con varios estudios (Pakala *et al.*, 2006; Chaudry *et al.*, 1988; Munnecke y Hsieh 1976; Rani y Lalithakumari 1994).

6.9.2 *Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de Cr (VI) y PM*

La concentración mínima inhibitoria (CMI), es la concentración mínima de cierta sustancia en la cual no hay crecimiento microbiano. Para la determinación de la CMI, se realizó la siembra de las bacterias aisladas en medio líquido enriquecido con cuatro concentraciones distintas del contaminante de interés.

Para las bacterias resistentes a Cr (VI), se utilizaron tubos de 15 mL conteniendo CTS, utilizando un 1% de inóculo. Para las bacterias resistentes a PM se utilizó MMS modificado (libre de fosfatos), utilizando un 5% de inóculo. Las muestras de los tubos de cultivo fueron homogenizadas y se tomó una alícuota mediante una pipeta estéril para ser cuantificada en cámara de Neubauer (Figura 28).

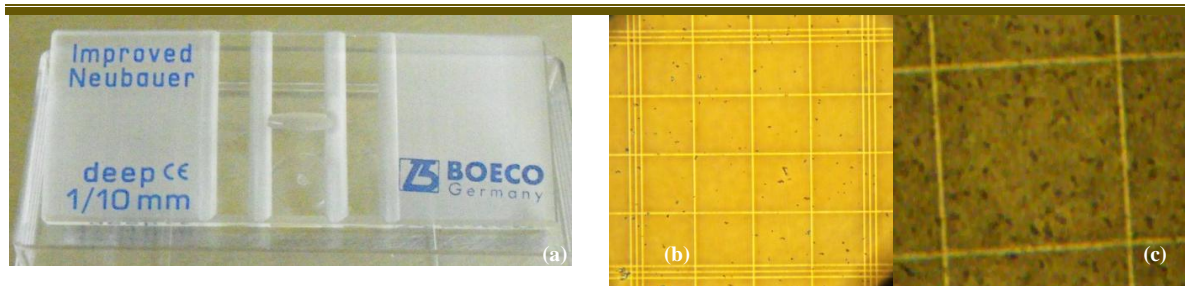


Figura 28. Conteo de células en cámara de Neubauer con profundidad de 0.1 mm (a), la rejilla de conteo mide 0.2 X 0.2 mm (b), aumento de 20X, para muestras muy concentradas(c).

Una vez realizado el conteo celular inicial se agregó, gota a gota y agitando suavemente, la cantidad de contaminante necesaria para obtener concentraciones de: 4.8, 5.8, 9.6, 14.4 y 19.2 mM (250, 500, 750, 1,000 mg L⁻¹) de Cr (VI) y 0.75, 1, 1.25 y 1.5 mM (220, 366 y 440 mg L⁻¹) de PM. Después de este punto los tubos fueron incubados bajo las condiciones descritas en el apartado 6.2 por 8 días (Figura 29 y Figura 30). Una vez finalizado el periodo de incubación, se volvió a tomar una alícuota para cuantificar el número de bacterias y establecer la concentración mínima en la cual no hubo crecimiento bacteriano.



Figura 29. Cultivo de las cepas resistentes a Cr (VI) para determinar la CMI.



Figura 30. Cultivo de las cepas resistentes a PM para determinar la CMI.

6.9.3 Pruebas de transformación de Cr (VI) y PM

Para la determinación de la presencia o no de degradación de los contaminantes de interés, se montó el siguiente experimento: para bacterias resistentes a Cr (VI) se utilizó CTS adicionado con 3.8 mM de Cr (VI) y para bacterias resistentes a PM se realizó el cultivo con MMS modificado adicionado con 0.75 mM de PM, se inoculó por triplicado cada cepa uniespecífica a evaluar, además se utilizaron dos controles positivos (medio adicionado con la misma concentración de contaminante, libre de inóculo y agua desionizada con

contaminante, libre de inóculo) y un blanco (medio de cultivo únicamente). Se sometieron incubaron por 8 días, para posteriormente medir la concentración remanente de cada contaminante en la fase líquida, previa centrifugación de las muestras a 6,000 rpm por 10 minutos.

Para determinar si hubo transformación de los contaminantes, se analizaron por colorimetría la reducción del Cr (VI) por reacción con difenil-carbazida en medio ácido (Figura 31), y por medición de fosfatos para la degradación de PM. Para éste último se utilizó el sistema HACH® aplicando el método colorimétrico de azul de molibdeno (Figura 32). Para estas determinaciones se aplicaron los fundamentos de los métodos estándar según la APHA (1998).



Figura 31. Reacción de la difenil carbazida en medio ácido.



Figura 32. Reacción por la formación de azul de molibdeno, después de dos minutos de reacción.

El porcentaje de transformación de contaminante se calculó con las siguientes ecuaciones para Cr (VI) y PM respectivamente:

$$\% \text{Transformación de Cr (VI)} = \frac{\left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \text{Cr(VI)}_{\text{inicial}} \right) - \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \text{Cr(VI)}_{\text{final}} \right)}{\frac{\text{mg}}{\text{L}} \text{Cr(VI)}_{\text{inicial}}} \times 100\% \quad \text{Ecuación (2)}$$

$$\% \text{ Transformación de PM} = \frac{\left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \text{PO}_4^{3-} \text{ final}\right) - \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \text{PO}_4^{3-} \text{ inicial}\right)}{\frac{\text{mg}}{\text{L}} \text{PO}_4^{3-} \text{ teórico}} \times 100\% \quad \text{Ecuación (3)}$$

De esta prueba se eligió la cepa que presentó el porcentaje de transformación mayor para cada contaminante, y se realizó su cinética de crecimiento y transformación.

6.10 Cinética de crecimiento y transformación de contaminantes

Para realizar la cinética de crecimiento de las cepas, es necesario conocer la curva de crecimiento general que representa el crecimiento bacteriano, se caracteriza por cuatro fases distintas:

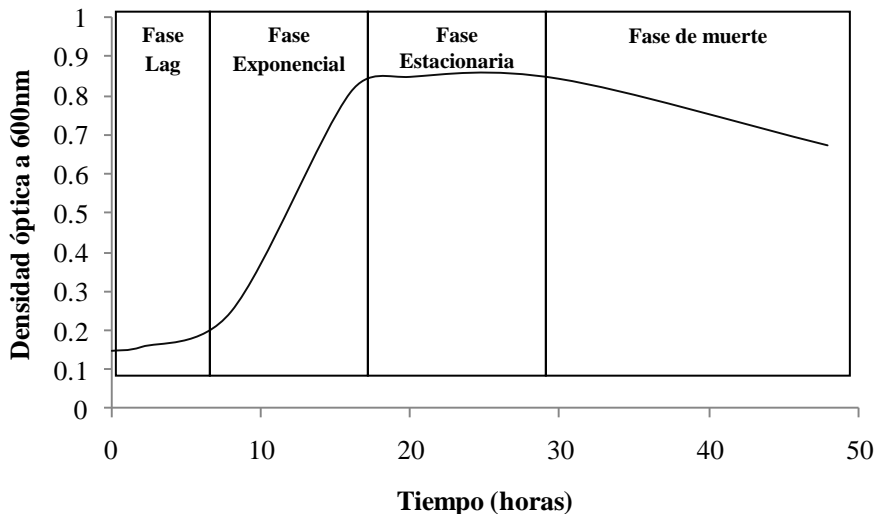


Figura 33. Curva de crecimiento bacteriano.

La gráfica anterior representa la curva de crecimiento característica de un cultivo en un recipiente cerrado con nutrientes limitados.

En la curva se distinguen las siguientes fases:

1. Fase de latencia. Fase de adaptación de las células a las nuevas condiciones del medio de incubación al que han sido transferidas. Las células no crecen inmediatamente sino después de este tiempo de latencia. Las células son metabólicamente activas, se adaptan al medio y eventualmente lo modifican. Para un mismo inóculo, esta fase de latencia varía

dependiendo del medio al que se transfieren y de las condiciones de incubación.

2. Fase de crecimiento exponencial. Fase en la que las células se están dividiendo regularmente a ritmo constante. En condiciones apropiadas durante esta fase, el grado de desarrollo es máximo (Tchobanoglous *et al.*, 2003). Esta fase presenta un comportamiento lineal y es en este periodo donde puede calcularse el tiempo de generación de un microorganismo (Frioni, 1999).

3. Fase estacionaria. El número de células no se incrementa más porque los nutrientes del medio se van agotando y posibles sustancias tóxicas pueden ir acumulándose. No hay incremento neto del número de células (Tchobanoglous *et al.*, 2003).

6.10.1 *Cinética de crecimiento y transformación de Cr (VI)*

Para la cinética de crecimiento y transformación de Cr (VI), se utilizó CTS adicionado con 3.8 mM de Cr (VI) y 1% de inóculo. Se utilizaron matraces erlenmeyer de 125 mL con 80 mL de medio, bajo condiciones de incubación (sección 6.2). Se inocularon las muestras, dos controles positivos: uno con medio de cultivo + contaminante y otro con agua destilada y contaminante y un blanco (medio de cultivo sin contaminante), cada uno por triplicado. Se tomaron submuestras a diferentes tiempos (h): 0, 48, 56, 72, 80, 96, 104, 120, 128, 144, 152, 168, 176, 192, 216, 240, 264 y 288. Se tomó aseptícamente una alícuota de 4 mL de cada tubo en cada tiempo de muestreo

Para cuantificar el crecimiento bacteriano y posteriormente compararlo contra la degradación del contaminante, se determinó la densidad óptica y se comparó con el número de células mediante conteo directo en cámara de Neubauer. Para medir densidad óptica se ajustó el espectrofotómetro a 600 nm y se llenó una celda de cuarzo para medir la absorbancia, este procedimiento se aplicó en todas las submuestras.

Para determinar la cantidad de Cr (VI) en el sobrenadante, se centrifugó una alícuota de 2 mL de muestra a 12,000g por 10 minutos, para separar la biomasa y trabajar con el sobrenadante. Debido a que la curva de calibración del método de cuantificación de Cr (VI) se estableció en un rango de 0.02 a 1 mg L⁻¹ (ver Anexo 9), y la concentración inicial del ensayo fue de 3.8 mM (197.6 mg L⁻¹), se diluyó la cantidad de muestra necesaria para

medir una concentración máxima de 0.02 mM (1 mg L⁻¹). Para medir el Cr (VI) se colocó la cantidad adecuada de muestra en un matraz aforado de 10 mL, se añadieron 200 µL de solución de difenil carbazida (ver Anexo 12), y una gota de H₂SO₄ concentrado y se aforó con agua destilada, se mezcló suavemente por inversión y se midió en celda de cuarzo a 543 nm (Figura 31). Al finalizar el tiempo de incubación se midió el Cr total, realizando una oxidación con dicromato de potasio, aplicando los fundamentos del APHA (1998) (Ver Anexos Figura 55).

6.10.1 *Cinética de crecimiento y transformación de PM*

Para la cinética de crecimiento y transformación de PM, se utilizó MMS adicionado con 0.75 mM de PM y 10% de inóculo. Se utilizaron matraces erlenmeyer de 125 mL con 80 mL de medio, bajo condiciones de incubación (sección 6.2). Se inoculó la muestra como se indica al inicio de este apartado más tres controles positivos: uno con medio de cultivo + contaminante, uno con medio de cultivo + contaminante + 10% de CTS estéril y otro con medio de cultivo + inóculo y un blanco (medio de cultivo sin contaminante), cada uno por triplicado. Se tomaron submuestras a diferentes tiempos (h): 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 264, 288, 312, 336 y 672. Se tomó aseptícamente una alícuota de 4 mL de cada matraz en cada tiempo de muestreo.

Para cuantificar el crecimiento bacteriano y posteriormente compararlo contra la degradación del contaminante, se determinó la densidad óptica y se comparó con el número de células mediante conteo directo en cámara de Neubauer. Para medir densidad óptica se ajustó el espectrofotómetro a 600 nm y se llenó una celda de cuarzo para medir la absorbancia, este procedimiento se realizó en todas las submuestras.

Para determinar la cantidad de PM en el sobrenadante, se centrifugó una alícuota de 2 mL de muestra a 12,000g por 10 minutos, para separar la biomasa y trabajar con el sobrenadante. El rango de cuantificación de fosfatos por éste método va de 0.0 a 2.5 mg L⁻¹ de PO₄³⁻, y la concentración inicial del ensayo fue de 0.5 mM (49 mg L⁻¹), se diluyó la cantidad de muestra necesaria para medir una concentración máxima de 0.03 mM (2.5 mg L⁻¹). Para medir el PO₄³⁻, se colocó la cantidad adecuada de muestra en un vial HACH® de 25 mL, se añadió agua destilada hasta 25 mL y un sobre de reactivo para la reacción azul de

molibdeno, se mezcló vigorosamente por inversión, después de 2 minutos de reacción se midió la absorbancia en un espectrofotómetro HACH® modelo DR 2000 a 890 nm (Figura 32).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Cuantificación de la comunidad bacteriana inicial

Para evaluar la presencia de bacterias aerobias en el sedimento colectado se evaluó la presencia de biomasa como unidades formadoras de colonias (UFC) utilizando siembra en placa por dilución y se eligieron las placas con un rango de colonias entre 20 y 200 UFC, para calcular una concentración aproximada de UFC/g peso húmedo de sedimento, aplicando la Ecuación (1).

Tabla 6. Número de UFC/g de sedimento

| Muestra | ID laboratorio | UFC/g sedimento |
|--------------------------|----------------|-----------------|
| Tultepec | TUL | 294,118 |
| Col. Isidro Fabela | ISI | 2'857,143 |
| Crucero Toluca-Naucaipan | CTN | 1'904,762 |

Dado la alta cantidad de células que fueron capaces de crecer en medio sólido y bajo condiciones aerobias (Tabla 6), se concluyó que las muestras contaban con suficiente número de bacterias para selección y cultivo.

7.2 Comunidades bacterianas resistentes al Cr (VI) y PM en la fase de enriquecimiento

Durante los monitoreos de crecimiento en esta etapa se encontraron una gran variedad morfológica de colonias bacterianas y de hongos (Figura 34 y Figura 35). En esta investigación, los hongos fueron considerados un inconveniente, debido a que no eran el objeto de estudio, por lo tanto, éstos se eliminaron aplicando cicloheximida (antimicótico, $2.8 \mu\text{g mL}^{-1}$).



Figura 34. Monitoreo de crecimiento en la etapa de enriquecimiento en agar cuenta estándar.

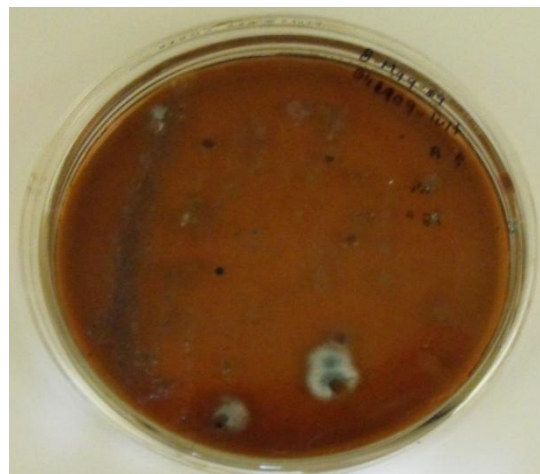


Figura 35. Monitoreo de crecimiento en la etapa de enriquecimiento en agar EMB

Como se planteó en la metodología, en esta etapa también se buscaron colonias resistentes sin aclimatación previa. Se encontraron un total de 6 colonias distintas para cada contaminante, las cuales se eligieron porque crecieron cerca del diámetro de difusión del contaminante. Las colonias se mantuvieron en refrigeración a 4° C hasta su uso en la etapa de aislamiento. Las muestras obtenidas en esta etapa fueron identificadas de acuerdo con la Tabla 7:

Tabla 7. Colonias aisladas de la prueba de resistencia directa (sin aclimatación)

| Colonias resistentes a Cr (VI) | Colonias resistentes a PM |
|--------------------------------|---------------------------|
| TUL 1 a | TUL 1 |
| TUL 1 b | TUL 2 |
| TUL 2 | ISI 1 |
| ISI 1 | ISI 2 |
| ISI 2 a | CTN 1 |
| ISI 2 b | CTN 6 |

TUL: Tultepec; ISI: Col. Isidro Fabela; CTN: Crucero Toluca-Naucaupan.

7.3 Comunidades bacterianas resistentes al Cr (VI) y PM en la fase de aclimatación

En esta etapa se observó que el crecimiento en placa redujo la diversidad considerablemente, lo cual podemos observar comparando las figuras Figura 34, Figura 35 y Figura 37. Otro dato importante fue la respuesta de la comunidad microbiana expuesta a PM (Figura 36), después de una semana de incubación se desarrolló un color amarillo de diferente intensidad en los tubos de cultivo, lo cual se debe a la transformación de PM a p-nitrofenol (Chaudhry *et al.*, 1988; Munnecke y Hsieh, 1974; Rani y Lalithakumari, 1994; Chen, 2002; Chaudhry *et al.*, 1988; Pakala *et al.*, 2006).

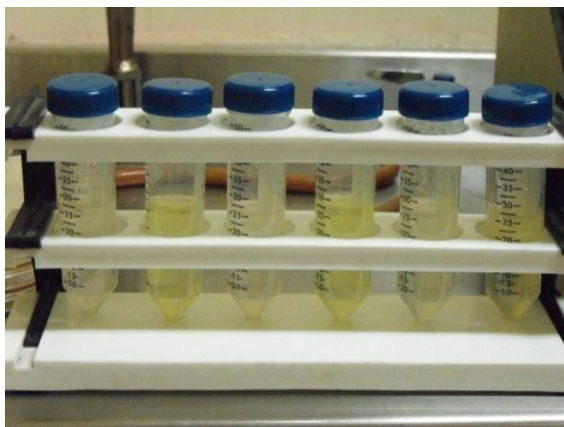


Figura 36. Respuesta de las bacterias expuestas a PM en la etapa de aclimatación.



Figura 37. Monitoreo de crecimiento en la fase de aclimatación.

7.4 Comunidades bacterianas resistentes a diferentes concentraciones de Cr (VI) y PM

En este ensayo se observó turbidez en al menos una de todas las concentraciones y repeticiones (n=3) después de 7 días de incubación (Figura 36). Sin embargo, no todas respondieron rápidamente a la presencia de contaminante en el medio y no presentaron crecimiento durante las primeras 48 horas de cultivo. Este parámetro fue clave en la selección de colonias para la siguiente etapa (Tabla 8).

Tabla 8. Comunidades bacterianas resistentes a Cr (VI) de la etapa de cultivo selectivo en medio líquido.

| | | Concentración: | | 1.92 mM | | 4.8 mM | | 9.6 mM | | 19.23 mM | |
|--------------------------|-------|---------------------|---|---------|----|--------|----|--------|----|----------|----|
| | | Días de incubación: | | 2d | 7d | 2d | 7d | 2d | 7d | 2d | 7d |
| Sítios: | | | | | | | | | | | |
| Tultepec | TUL 1 | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - |
| | TUL 2 | + | + | + | + | + | + | - | + | - | + |
| | TUL 3 | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - |
| Col. Isidro Fabela | ISI 1 | + | + | + | + | + | + | - | + | - | + |
| | ISI 2 | + | + | + | + | + | + | - | + | - | + |
| | ISI 3 | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - |
| Crucero Toluca-Naucalpan | CTN 1 | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| | CTN 2 | + | + | + | + | + | + | - | + | - | + |
| | CTN 3 | + | + | - | + | - | - | - | - | - | - |

-: Ausencia de turbidez.

+: Presencia de turbidez.

Para las bacterias resistentes a PM, se utilizaron las siguientes concentraciones: 0.2, 0.3, 0.6 y 1 mM de PM. Se encontró desarrollo de biomasa en todas las concentraciones desde el día 2 de incubación, a excepción de la muestra TUL 2 0.6 y 1.0 mM (Tabla 9).

Tabla 9. Comunidades bacterianas resistentes a PM de la etapa de cultivo selectivo en medio líquido.

| | | Concentración: | | 0.2mM | | 0.3 mM | | 0.6 mM | | 1 mM | |
|--------------------------|-------|---------------------|---|-------|----|--------|----|--------|----|------|----|
| | | Días de incubación: | | 2d | 7d | 2d | 7d | 2d | 7d | 2d | 7d |
| Sítios: | | | | | | | | | | | |
| Tultepec | TUL 1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | TUL 2 | + | + | + | + | - | + | - | + | - | + |
| | TUL 3 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Col. Isidro Fabela | ISI 1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | ISI 2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | ISI 3 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Crucero Toluca-Naucalpan | CTN 1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | CTN 2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | CTN 3 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

-: Ausencia de turbidez.

+: Presencia de turbidez.

De los resultados anteriores, se tomaron todos los tubos que presentaron desarrollo de turbidez el día 2 de incubación, posteriormente, se estriaron en placa e incubaron por 48 h para observar la calidad de las colonias y elegir aquellas adecuadas para la etapa de aislamiento.

Se buscaron colonias morfológicamente distintas y fáciles de recuperar por medio del asa, además de aquellas en tubos con mayor concentración de contaminante (Figura 38), para posteriormente ser sometidas a los ciclos de aislamiento.



Figura 38. Selección preliminar de colonias resistentes a PM sobre AMMS modificado.

En la Tabla 10, se muestran las características generales de las comunidades observadas, así como la cantidad de colonias preseleccionadas para la etapa de aislamiento para bacterias resistentes a Cr (VI). Las colonias fueron elegidas con base en sus diferencias morfológicas procurando que todas fueran distintas.

Tabla 10. Comunidades bacterianas preseleccionadas de la etapa de cultivo selectivo para bacterias resistentes a Cr (VI).

| Muestra | Formas coloniales | Cantidad | Tamaño | Número de colonias preseleccionadas |
|----------------|------------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------------------|
| TUL 2-19.23 mM | Definidas ^a | Abundantes ^b | Adecuado ^c | 1 |
| ISI 1-4.8 mM | Definidas | Abundantes | Adecuado | 1 |
| ISI 1-19.23 mM | Definidas | Abundantes | Adecuado | 1 |
| ISI 2-4.8 mM | Definidas | Abundantes | Adecuado | 0 |
| ISI 2-9.6 mM | Definidas | Abundantes | Adecuado | 0 |
| ISI 2-19.23 mM | Definidas | Abundantes | Adecuado | 1 |
| CTN 1-4.8 mM | Definidas | Abundantes | Adecuado | 1 |
| CTN 1-9.6 mM | Definidas | Abundantes | Adecuado | 0 |
| CTN 1-19.23 mM | Definidas | Abundantes | Adecuado | 2 |
| CTN 2-4.8 mM | Definidas | Abundantes | Adecuado | 0 |
| CTN 2-9.6mM | Definidas | Abundantes | Adecuado | 0 |
| CTN 2-19.23 mM | Definidas | Abundantes | Adecuado | 6 |

a) **Formas coloniales definidas:** formas regulares y distinguibles. b) **Cantidad abundante:** Cantidades entre 20 y 200 UFC. c) **Tamaño adecuado:** mayor a 1 mm de diámetro.

En la Tabla 11, se muestran las características generales de las comunidades de bacterias resistentes a PM, de igual forma que para bacterias resistentes a Cr (VI), se eligieron colonias morfológicamente diferentes entre sí.

Tabla 11. Comunidades bacterianas de la etapa de cultivo selectivo para bacterias resistentes a PM.

| Muestra | Formas coloniales | Cantidad | Tamaño | Número de colonias preseleccionadas |
|--------------|-------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------------------|
| TUL 1-0.3 mM | Definidas | Abundante | Adecuado | 1 |
| TUL 1-0.6 mM | Definidas | Abundante | Adecuado | 0 |
| TUL 1-1mM | Definidas | Abundante | Adecuado | 1 |
| TUL 2-0.3 mM | Definidas | Abundante | Pequeño ^d | 0 |
| TUL 2-0.6 mM | Definidas | Abundante | Adecuado | 3 |
| TUL 2-1mM | Definidas | Suficiente ^e | Adecuado | 0 |
| ISI 1-0.3 mM | Definidas | Abundante | Adecuado | 0 |
| ISI 1-0.6 mM | Definidas | Abundante | Adecuado | 1 |
| ISI 1-1 mM | Definidas | Abundante | Adecuado | 1 |
| ISI 2-0.3 mM | Definidas | Abundante | Pequeño | 1 |
| ISI 2-0.6 mM | Definidas | Abundante | Pequeño | 1 |
| ISI 2-1 mM | Definidas | Abundante | Adecuado | 1 |
| CTN 1-0.3 mM | Definidas | Abundante | Pequeño | 1 |
| CTN 1-0.6 mM | Definidas | Abundante | Adecuado | 1 |
| CTN 1-1 mM | Definidas | Abundante | Adecuado | 1 |
| CTN 2-0.3 mM | Definidas | Abundante | Pequeño | 1 |
| CTN 2-0.6 mM | Definidas | Abundante | Adecuado | 1 |
| CTN 2-1 mM | Definidas | Abundante | Adecuado | 1 |

d) Tamaño pequeño: menores a 1 mm de diámetro. **e) Cantidad suficiente:** menos de 20 UFC.

Las colonias seleccionadas hasta este punto fueron morfológicamente distintas y definidas, sin embargo fueron sometidas a varios ciclos de aislamiento para asegurar que las características se mantuvieran en las distintas resiembras y para considerarlas como uniespecíficas.

7.5 Cepas puras resistentes al Cr (VI) y PM

El medio MMS modificado resultó poco eficiente para aislar bacterias resistentes al PM, ya que el tiempo de incubación duró 7 días comparado con el de las resistentes a Cr (48 horas), además en ciertos tubos no se observó crecimiento. Este último resultado concuerda con algunos trabajos donde se indica la necesidad de agregar una cantidad adecuada de inóculo o, en su defecto, una fuente adicional de carbono que favorezca el crecimiento de la comunidad en las primeras fases de desarrollo (Chaudry *et al.*, 1988; Qiu *et al.*, 2007). Debido a esto, se repitió el proceso desde la fase de selección de colonias directamente de la comunidad, esta vez utilizando CTS diluido (1:10) y el aislamiento se llevó a cabo en placas con agar MMS modificado enriquecido con 0.2 mM de PM. El crecimiento en las placas fue lento (3 a 5 días) en comparación con las bacterias resistentes a Cr (VI) (1 a 2 días), sin embargo, esto la formación de colonias fue adecuada. Se continuaron las resiembras y selección de cepas en cada lote (Tabla 12 y Tabla 13), para continuar con el proceso de aislamiento y caracterización detallada, que se expone más adelante.

En algunos casos después de la selección y resiembra no hubo crecimiento, lo cual indica que la resistencia al contaminante se deba a la presencia de una asociación de especies bacterianas. Las características morfológicas coloniales de cada lote se presentan en el Anexo 2 para bacterias resistentes a Cr (VI) y en el Anexo 3 para bacterias resistentes a PM. Por otro lado, después de las resiembras algunas colonias variaron sus características morfológicas, esto se debió a la presencia de comunidades que durante la selección van variando su composición de especies, sin embargo, después de varias resiembras las colonias fueron aisladas satisfactoriamente. Para el caso de las bacterias resistentes a Cr (VI) no se encontraron muchas asociaciones de colonias, por lo tanto fueron mas fáciles de aislar (Tabla 12).

Tabla 12. Cepas bacterianas resistentes a Cr (VI) obtenidas durante la fase de aislamiento.

| Lote 1 | Lote 2 | Lote 3 | Lote 4 |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1 TUL 2-19.23 mM | | | |
| 2 ISI 1-4.8 mM | 1 ISI 1-4.8 mM | 1 ISI 1-4.8 mM | 1 ISI 1-4.8 mM |
| 3 ISI 1-19.23 mM | 2 ISI 1-19.23 mM | 2 ISI 1-19.23 mM | 2 ISI 1-19.23 mM |
| | 3 ISI 1-19.23 mM | 3 ISI 1-19.23 mM | 3 ISI 1-19.23 mM |
| | 4 ISI 1-19.23 mM | 4 ISI 1-19.23 mM | 4 ISI 1-19.23 mM |
| | 5 ISI 1-19.23 mM | 5 ISI 1-19.23 mM | 5 ISI 1-19.23 mM |
| 4 ISI 2-19.23 mM | 6 ISI 2-19.23 mM | 6 ISI 2-19.23 mM | 6 ISI 2-19.23 mM |
| | 7 ISI 2-19.23 mM | 7 ISI 2-19.23 mM | 7 ISI 2-19.23 mM |
| 5 CTN 1-4.8 mM | | | |
| 6 CTN 1-19.23 mM | 8 CTN 1-19.23 mM | 8 CTN 1-19.23 mM | 8 CTN 1-19.23 mM |
| 7 CTN 1-19.23 mM | 9 CTN 1-19.23 mM | 9 CTN 1-19.23 mM | 9 CTN 1-19.23 mM |
| 8 CTN 2-19.23 mM | 10 CTN 2-19.23 mM | 10 CTN 2-19.23 mM | 10 CTN 2-19.23 mM |
| 9 CTN 2-19.23 mM | 11 CTN 2-19.23 mM | 11 CTN 2-19.23 mM | 11 CTN 2-19.23 mM |
| 10 CTN 2-19.23 mM | 12 CTN 2-19.23 mM | 12 CTN 2-19.23 mM | 12 CTN 2-19.23 mM |
| 11 CTN 2-19.23 mM | 13 CTN 2-19.23 mM | 13 CTN 2-19.23 mM | 13 CTN 2-19.23 mM |
| 12 CTN 2-19.23 mM | | | |
| 13 CTN 2-19.23 mM | | | |
| 14 TUL 2 a | 14 TUL 2 a | 14 TUL 2 a | 14 TUL 2 a |
| 15 TUL 2 b | 15 TUL 2 b | 15 TUL 2 b | 15 TUL 2 b |
| 16 TUL 2 c | 16 TUL 2 c | 16 TUL 2 c | 16 TUL 2 c |
| 17 TUL 2 d | 17 TUL 2 d | 17 TUL 2 d | 17 TUL 2 d |
| 18 TUL 2 e | 18 TUL 2 e | 18 TUL 2 e | 18 TUL 2 e |
| 19 TUL 2 f | 19 TUL 2 f | 19 TUL 2 d | 19 TUL 2 e |
| 20 ISI 1 | 20 ISI 1 | 20 ISI 1 | 20 ISI 1 |
| 21 CTN 1 | 21 CTN 1 | 21 CTN 1 | 21 CTN 1 |

A diferencia de las cepas resistentes a Cr (VI) las cepas resistentes a PM, presentaron una mayor cantidad de colonias, y requirieron de varias series de separación de colonias., finalmente se tomaron las colonias del Lote 4 para ser caracterizadas y sembradas para la siguiente etapa (Tabla 13), de igual manera algunas colonias al ser separadas, ya no crecieron, esto resulta cuando la resistencia es producto de cometabolismo entre dos o más especies, lo cual ocurrió con la cepa 2-2 TUL 1-1mM en el lote 3.

Tabla 13. Cepas bacterianas resistentes a PM obtenidas durante la fase de aislamiento.

| Lote 1 | Lote 2 | Lote 3 | Lote 4 |
|-----------------|-----------------|--|--|
| 1 TUL 1-0.3 mM | 1 TUL 1-0.3 mM | 1-1 TUL 1-0.3 mM 1-2 TUL 1-0.3 mM 1-3 TUL 1-0.3 mM | 1-1a TUL 1-0.3 mM 1-1b TUL 1-0.3 mM 1-3a TUL 1-0.3 mM 1-3b TUL 1-0.3 mM |
| 2 TUL 1-1mM | 2 TUL 1-1mM | 2-1 TUL 1-1mM 2-2 TUL 1-1mM 2-3 TUL 1-1mM | 2-1 TUL 1-1mM 2-3 TUL 1-1mM |
| 3 TUL 2-0.6 mM | 3 TUL 2-0.6 mM | 3-1 TUL 2-0.6 mM 3-2 TUL 2-0.6 mM | 3-1 TUL 2-0.6 mM 3-2 TUL 2-0.6 mM |
| 4 TUL 2-0.6 mM | 4 TUL 2-0.6 mM | 4-1 TUL 2-0.6 mM | 4-1a TUL 2-0.6 mM 4-1b TUL 2-0.6 mM |
| 4 TUL 2-0.6 mM | 5 TUL 2-0.6 mM | 5-1 TUL 2-0.6 mM 5-2 TUL 2-0.6 mM | 5-1 TUL 2-0.6 mM 5-2 TUL 2-0.6 mM |
| 6 TUL 2-1 mM | 6 TUL 2-1 mM | 6-1 TUL 2-1 mM 6-2 TUL 2-1 mM | 6-1 TUL 2-1 mM 6-2 TUL 2-1 mM |
| 7 ISI 1-0.6 mM | 7 ISI 1-0.6 mM | 7-1 ISI 1-0.6 mM 7-2 ISI 1-0.6 mM 7-3 ISI 1-0.6 mM 7-4 ISI 1-0.6 mM | 7-1 ISI 1-0.6 mM 7-3 ISI 1-0.6 mM 7-4 ISI 1-0.6 mM |
| | 8 ISI 1-0.6 mM | 8-1 ISI 1-0.6 mM 8-2 ISI 1-0.6 mM | 8-2 ISI 1-0.6 mM |
| 8 ISI 1-1 mM | 9 ISI 1-1 mM | 9-1 ISI 1-1 mM 9-2 ISI 1-1 mM | 9-1 ISI 1-1 mM 9-2 ISI 1-1 mM |
| 9 ISI 2-0.3 mM | 10 ISI 2-0.3 mM | 10-1 ISI 2-0.3 mM 10-2 ISI 2-0.3 mM | 10-1 ISI 2-0.3 mM 10-2a ISI 2-0.3 mM 10-2b ISI 2-0.3 mM |
| 10 ISI 2-0.6 mM | 11 ISI 2-0.6 mM | 11-1 ISI 2-0.6 mM 11-2 ISI 2-0.6 mM 11-3 ISI 2-0.6 mM 11-4 ISI 2-0.6 mM | 11-1 ISI 2-0.6 mM 11-3 ISI 2-0.6 mM 11-4 ISI 2-0.6 mM |
| 11 ISI 2-1 mM | 12 ISI 2-1 mM | 12-1 ISI 2-1 mM 12-2 ISI 2-1 mM 12-3 ISI 2-1 mM | 12-1a ISI 2-1 mM 12-1b ISI 2-1 mM 12-2a ISI 2-1 mM 12-2b ISI 2-1 mM 12-3a ISI 2-1 mM 12-3b ISI 2-1 mM |
| 12 CTN 1-0.3 mM | 13 CTN 1-0.3 mM | 13-1 CTN 1-0.3 mM 13-2 CTN 1-0.3 mM 13-3 CTN 1-0.3 mM | 13-1 CTN 1-0.3 mM 13-2 CTN 1-0.3 mM 13-3 CTN 1-0.3 mM |
| 13 CTN 1-0.6 mM | 14 CTN 1-0.6 mM | 14-1 CTN 1-0.6 mM 14-2 CTN 1-0.6 mM | 14-1a CTN 1-0.6 mM 14-1b CTN 1-0.6 mM 14-2a CTN 1-0.6 mM 14-2b CTN 1-0.6 mM |
| 14 CTN 1-1 mM | 15 CTN 1-1 mM | 15-1 CTN 1-1 mM | 15-1 CTN 1-1 mM |
| 15 CTN 2-0.3 mM | 16 CTN 2-0.3 mM | 16-1 CTN 2-0.3 mM | 16-1 CTN 2-0.3 mM |
| 16 CTN 2-0.6 mM | 17 CTN 2-0.6 mM | 17-1 CTN 2-0.6 mM 17-2 CTN 2-0.6 mM | 17-1a CTN 2-0.6 mM 17-1b CTN 2-0.6 mM 17-2 CTN 2-0.6 mM |
| 17 CTN 2-1 mM | 18 CTN 2-1 mM | 18-1 CTN 2-1 mM | 18-1 CTN 2-1 mM |
| 18 TUL 1 | 19 TUL 1 | 19-1 TUL 1 | 19-1 TUL 1 |
| 19 TUL 2 | 20 TUL 2 | 20-1 TUL 2 | 20-1 TUL 2 |
| 20 ISI 1 | 21 ISI 1 | 21-1 ISI 1 | 21-1 ISI 1 |
| 21 ISI 2 a | 22 ISI 2 a | | |

| | | | |
|------------|------------|--------------|----------------------------|
| 22 ISI 2 b | 23 ISI 2 b | 23-1 ISI 2 b | 23-1 ISI 2 b |
| 23 CTN 1 | 24 CTN 1 | 24-1 CTN 1 | 24-1 CTN 1 |
| 24 CTN 2 | 25 CTN 2 | 25-1 CTN 2 | 25-1a CTN 2 25-1b CTN 2 |

Durante la observación y caracterización de los lotes bacterianos, algunas muestras tuvieron que ser eliminadas por su difícil separación (Figura 39 y Figura 40), ya que después de varios aislamientos aun seguían presentándose en asociación multiespecífica. Durante ésta etapa se observó contaminación por hongos (Figura 41 y Figura 42) los cuales fueron eliminados aplicando cicloheximida.

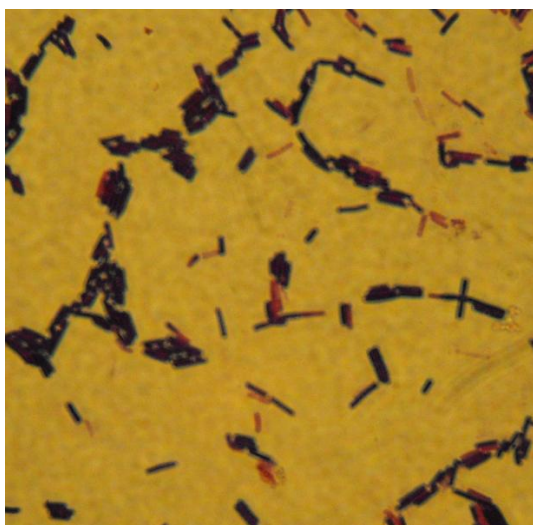


Figura 39. Bacilos Gram positivos y negativos en asociación.

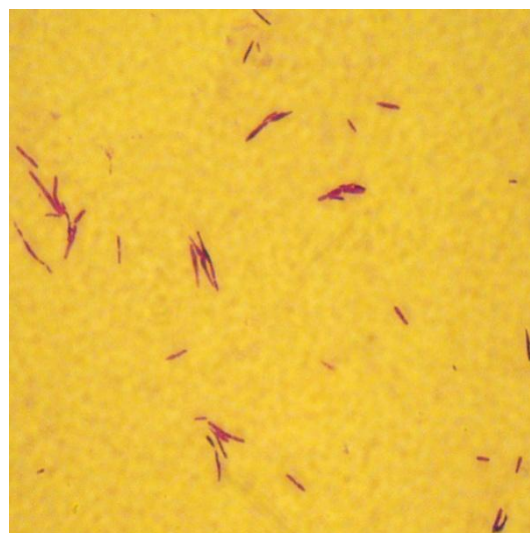


Figura 40. Bacilos y vibrios Gram negativos de diferentes especies.

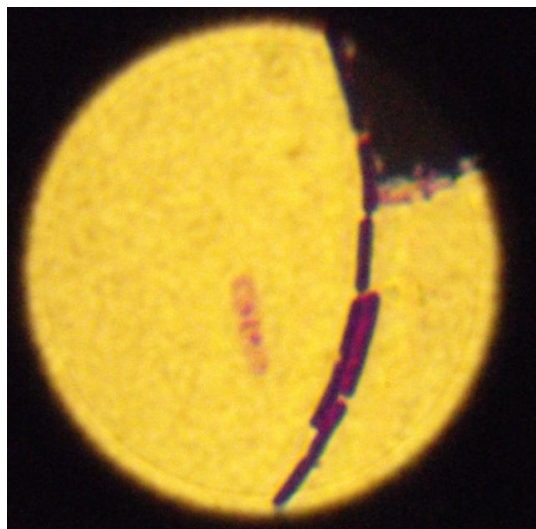
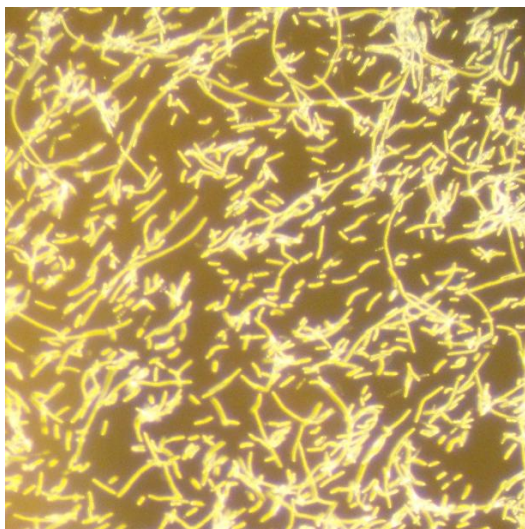


Figura 41. Observación “in vivo” de contaminación por hongos en microscopio de contraste de fases.

Figura 42. Observación de contaminación por hongos con tinción de Gram en microscopio de contraste de fases.

Las colonias del cuarto lote (Tabla 12 y Tabla 13) fueron caracterizadas morfológicamente, para descartar dualidades y seleccionar aquellas colonias que posteriormente fueron observadas a detalle bajo el microscopio. En la Figura 41 y Figura 42 se encuentra la caracterización de las cepas resistentes a Cr (VI) y PM, respectivamente, cuya nomenclatura se explica en la metodología (sección 0). Dadas sus características únicas, algunas colonias que presentaban múltiples especies (M) fueron seleccionadas para otro ciclo de aislamiento.

En la Tabla 14 se muestran las colonias resistentes a Cr (VI) caracterizadas morfológicamente, en esta fase se realizó una primera depuración de cepas descartando aquellas difíciles de aislar (C), también se eligieron cepas multiespecíficas (M) para otro ciclo de aislamiento.

Tabla 14. Características morfológicas de las colonias aisladas resistentes a Cr (VI).

| ID* cepas Cr-resistentes | | | | | | | | RESULTADO |
|--------------------------|---------------------|-----------|-------|------------|-------|---------------|--------|------------------|
| | Forma de la colonia | Elevación | Borde | Superficie | Color | Transparencia | Brillo | |
| 1 ISI 1-4.8 mM | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | C |
| 2 ISI 1-19.23 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 0 | 1 | M |
| 3 ISI 1-19.23 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 0 | 1 | √ |
| 4 ISI 1-19.23 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 0 | 1 | √ |
| 5 ISI 1-19.23 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 0 | 1 | √ |
| 6 ISI 2-19.23 mM | 5 | 3 | 3 | 0 | 3 | 0 | 1 | √ |
| 7 ISI 2-19.23 mM | 2 | 3 | 6 | 0 | 1 | 0 | 1 | √ |
| 8 CTN 1-19.23 mM | 2 | 3 | 6 | 0 | 3 | 0 | 1 | √ |
| 9 CTN 1-19.23 mM | 2 | 1 | 1 | 0 | 3 | 0 | 1 | M |
| 10 CTN 2-19.23 mM | 2 | 3 | 5 | 0 | 3 | 0 | 1 | √ |
| 11 CTN 2-19.23 mM | 2 | 1 | 5 | 1 | 1 | 0 | 1 | √ |
| 12 CTN 2-19.23 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 0 | 1 | M |
| 13 CTN 2-19.23 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 0 | 1 | M |
| 14 TUL 2 a | 1 | 1 | 5 | 1 | 1 | 0 | 1 | √ |
| 15 TUL 2 b | 2 | 3 | 6 | 0 | 3 | 0 | 1 | C |
| 16 TUL 2 c | 2 | 3 | 5 | 1 | 1 | 0 | 1 | √ |
| 17 TUL 2 d | 4 | 1 | 3 | 1 | 1 | 0 | 1 | √ |
| 18 TUL 2 e | 2 | 3 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | √ |
| 19 TUL 2 f | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 0 | 1 | √ |

| | | | | | | | | |
|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 20 ISI 1 | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 0 | 1 | √ |
| 21 CTN 1 | 1 | 1 | 5 | 1 | 1 | 0 | 1 | √ |

√: Cepa seleccionada para observación microscópica. **C**: Cepas seleccionadas para conservación en agar inclinado, dado su difícil manejo. **M**: Cepas con múltiples especies sometidas a otro ciclo de aislamiento.

Para el caso de las colonias bacterianas resistentes a PM, muchas de las colonias fueron descartadas para continuar el proceso de aislamiento dado su difícil manejo, esta gran diferencia respecto a las bacterias resistentes a Cr (VI), se debió, además de la variabilidad de especies, al tipo de medio bajo en nutrientes que utilizaron, lo cual afectó el crecimiento de las bacterias.

Tabla 15. Características morfológicas de las colonias aisladas resistentes a PM.

| ID* cepas PM-resistentes | Forma de la colonia | Elevación | Borde | Superficie | Color | Transparencia | Brillo | RESULTADO |
|--------------------------|---------------------|-----------|-------|------------|-------|---------------|--------|-----------|
| 1-1a TUL 1-0.3 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 0 | 1 | √ |
| 1-2 TUL 1-0.3 mM | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | √ |
| 1-3a TUL 1-0.3 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | C |
| 1-3b TUL 1-0.3 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 0 | 1 | √ |
| 2-1 TUL 1-1mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 0 | 1 | C |
| 2-3 TUL 1-1mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 0 | 1 | √ |
| 3-1 TUL 2-0.6 mM | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | √ |
| 3-2 TUL 2-0.6 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | C |
| 4-1a TUL 2-0.6 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | C |
| 4-1b TUL 2-0.6 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 0 | 1 | √ |
| 5-1 TUL 2-0.6 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 0 | 1 | C |
| 5-2 TUL 2-0.6 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | C |
| 6-1 TUL 2-1 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 0 | 1 | C |
| 6-2 TUL 2-1 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 0 | 1 | √ |
| 7-1 ISI 1-0.6 mM | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | √ |
| 7-3 ISI 1-0.6 mM | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | √ |
| 7-4 ISI 1-0.6 mM | 2 | 3 | 3 | 0 | 3 | 0 | 1 | C |
| 8-1 ISI 1-0.6 mM | 5 | 3 | 3 | 0 | 3 | 0 | 1 | √ |
| 8-2 ISI 1-0.6 mM | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | C |
| 9-1 ISI 1-1 mM | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | C |
| 9-2 ISI 1-1 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | C |
| 10-1 ISI 2-0.3 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | √ |
| 10-2a ISI 2-0.3 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | C |
| 10-2b ISI 2-0.3 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | C |
| 10-3 ISI 2-0.3 mM | 5 | 3 | 3 | 0 | 1 | 0 | 1 | √ |

| | | | | | | | | |
|--------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 11-1 ISI 2-0.6 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | C |
| 11-3 ISI 2-0.6 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | C |
| 11-4 ISI 2-0.6 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | √ |
| 12-1b ISI 2-1 mM | 4 | 1 | 5 | 1 | 1 | 0 | 1 | √ |
| 12-2b ISI 2-1 mM | 5 | 3 | 3 | 0 | 3 | 0 | 1 | C |
| 12-3a ISI 2-1 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | √ |
| 12-3b ISI 2-1 mM | 1 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | √ |
| 13-1 CTN 1-0.3 mM | 2 | 3 | 3 | 0 | 1 | 0 | 1 | √ |
| 13-2 CTN 1-0.3 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | C |
| 13-3 CTN 1-0.3 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | C |
| 14-1a CTN 1-0.6 mM | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 | C |
| 14-1b CTN 1-0.6 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | √ |
| 14-2a CTN 1-0.6 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | C |
| 14-2b CTN 1-0.6 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | C |
| 15-1 CTN 1-1 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | C |
| 16-1 CTN 2-0.3 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | C |
| 17-1a CTN 2-0.6 mM | 3 | 5 | 5 | 0 | 3 | 0 | 1 | M |
| 17-1b CTN 2-0.6 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | C |
| 17-2 CTN 2-0.6 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | C |
| 18-1a CTN 2-1 mM | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | C |
| 18-1b CTN 2-1 Mm | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | C |
| 18-2 CTN 2-1 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | C |
| 19-1 TUL 1 | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 0 | 1 | C |
| 20-1 TUL 2 | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 0 | 1 | √ |
| 21-1 ISI 1 | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 0 | 1 | C |
| 23-1 ISI 2 b | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | √ |
| 24-1 CTN 1 | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | C |
| 25-1a CTN 2 | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | √ |
| 25-1b CTN 2 | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | C |

Una vez caracterizadas las colonias a nivel macroscópico, se seleccionaron aquellas de fácil manipulación para su caracterización celular. Un dato importante de valoración en microbiología es la movilidad celular, en este estudio se evaluó por observación directa en microscopio (Figura 43).

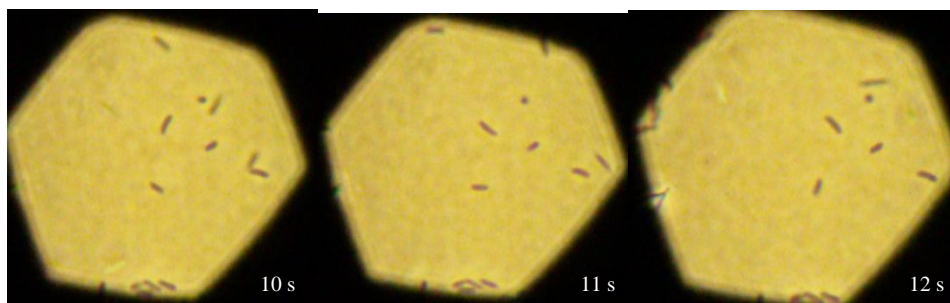


Figura 43. Vista microscópica sobre el mismo campo en diferentes tiempos (segundos), para observar movilidad de la Cepa 20 ISI 1.

Además de la caracterización morfológica colonial y celular, se realizaron siembras por picadura en medios diferenciales, para obtener una caracterización bioquímica.

Tabla 16. Caracterización de las cepas resistentes a Cr (VI) en la última etapa de aislamiento.

| ID* cepas Cr (VI)-resistentes | Forma de la colonia | Elevación | Borde | Superficie | Color | Brillo | Forma celular | Movilidad | Agrupación | Gram | KOH | ABV | ASS | EMB | AU | ATS | AMC | TSI |
|-------------------------------|---------------------|-----------|-------|------------|-------|--------|---------------|-----------|------------|------|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|
| 2a ISI 1-19.23 mM | 2 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 8 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| 2b ISI 1-19.23 mM | 2 | 1 | 6 | 0 | 1 | 1 | 3 | 0 | 8 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| 3 ISI 1-19.23 mM | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 2 | 0 | 8 | 1 | 1 | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| 4 ISI 1-19.23 mM | NC | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 ISI 1-19.23 mM | M | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 ISI 2-19.23 mM | M | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 ISI 2-19.23 mM | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 2 | 0 | 8 | 1 | 1 | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| 8 CTN 1-19.23 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 3 | 0 | 8 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| 9a CTN 1-19.23 mM | 2 | 1 | 6 | 0 | 1 | 1 | 3 | 0 | 8 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| 9b CTN 1-19.23 mM | 2 | 1 | 6 | 0 | 1 | 1 | 2 | 1 | 8 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 9c CTN 1-19.23 mM | M | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 CTN 2-19.23 mM | NC | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 11 CTN 2-19.23 mM | C | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12 CTN 2-19.23 mM | 2 | 1 | 6 | 0 | 1 | 1 | 3 | 0 | 8 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| 13a CTN 2-19.23 mM | M | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 13b CTN 2-19.23 mM | 2 | 1 | 6 | 0 | 1 | 1 | 2 | 1 | 8 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| 14 TUL 2 a | C | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 16 TUL 2 c | 2 | 1 | 6 | 0 | 1 | 1 | 2 | 1 | 8 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 | 3 | 0 |
| 17 TUL 2 d | 4 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 | 9 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 18 TUL 2 e | M | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 19 TUL 2 f | M | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 20 ISI 1 | 2 | 1 | 6 | 0 | 1 | 1 | 2 | 1 | 8 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| 21 CTN 1 | M | | | | | | | | | | | | | | | | | |

NC: No crecimiento. **C:** Cepas seleccionadas para conservación en agar inclinado, dado su difícil manejo. **M:** Cepas con múltiples especies.

Se obtuvieron un total de 43 cepas resistentes a PM, de las cuales se eligieron 11 con características distintas para su identificación. El resto de las cepas se congelaron a -80° C en glicerol (60%), las características se presentan en la Tabla 17.

Tabla 17. Caracterización de las cepas resistentes a PM en la última etapa de aislamiento.

| ID* cepas PM-resistentes | Forma de la colonia | Elevación | Borde | Superficie | Color | Brillo | Forma celular | Movilidad | Agrupación | Gram | KOH | ABV | ASS | EMB | AU | ATS | AMC | TSI |
|--------------------------|---------------------|-----------|-------|------------|-------|--------|---------------|-----------|------------|------|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|
| 1-1a TUL 1-0.3 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 1 | 2 | 0 | 7 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| 1-2 TUL 1-0.3 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 1 | 2 | 0 | 7 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| 1-3b TUL 1-0.3 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 1 | 2 | 0 | 7 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| 2-3a TUL 1-1mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 1 | 2 | 0 | 7 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| 2-3b TUL 1-1mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 1 | 2 | 0 | 8 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 3-1 TUL 2-0.6 mM | NC | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4-1b TUL 2-0.6 mM | 1 | 3 | 1 | 0 | 1 | 1 | 2 | 0 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 6-2 TUL 2-1 mM | 2 | 3 | 5 | 0 | 1 | 1 | 2 | 1 | 8 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| 7-1 ISI 1-0.6 mM | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 2 | 1 | 8 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 7-3 ISI 1-0.6 mM | NC | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8-1 ISI 1-0.6 mM | NC | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10-1 ISI 2-0.3 mM | 2 | 1 | 6 | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 | 8 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| 10-3 ISI 2-0.3 mM | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 2 | 1 | 8 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| 11-4 ISI 2-0.6 mM | H | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12-1b ISI 2-1 mM | 2 | 3 | 5 | 0 | 1 | 1 | 2 | 1 | 9 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| 12-3a ISI 2-1 mM | C | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12-3b ISI 2-1 mM | C | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 13-1 CTN 1-0.3 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 1 | 2 | 0 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| 14-1b CTN 1-0.6 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 1 | 2 | 0 | 7 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| 17-1a CTN 2-0.6 mM | M | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 17-1b CTN 2-0.6 mM | M | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 20-1 TUL 2 | M | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 23-1 ISI 2 b | C | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 25-1a CTN 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 2 | 0 | 8 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 0 |

7.6 Medios de cultivo aplicados en el proceso de obtención y aislamiento de bacterias resistentes a Cr (VI) y PM.

Después de la etapa de aislamiento se presentan los tiempos de incubación, los medios de cultivo, la concentración de Cr (VI) y PM, y el porcentaje de inóculo utilizados en cada etapa para la obtención de cepas resistentes a Cr (VI) y PM (Tabla 18 y Tabla 19).

Tabla 18. Medios de cultivo aplicados para bacterias resistentes a Cr (VI).

| Etapas | Medio Utilizado | Concentración de contaminante | % inóculo | Tiempo de incubación |
|-------------------|---|--------------------------------------|--|--|
| Enriquecimiento | MMS (mg L ⁻¹): 11, MgSO ₄ ·7H ₂ O; 14, CaCl ₂ ; 340, KH ₂ PO ₄ ; 670, Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O ; 22, FeCl ₃ ·6H ₂ O; 500, NH ₄ Cl. | 0 | 20% | 2 resiembras de tres semanas. 1 resiembra de dos semanas. 2 resiembras de una semana. |
| Aclimatación | CTS (g L ⁻¹): 15, peptona de caseína; 5, peptona de soya; 5, NaCl. | 0.96 mM | 20% 10% | 2 resiembras de dos semanas. 3 resiembras de 1 semana. |
| Cultivo selectivo | CTS | 1.92, 4.8, 9.6 y 19.23 mM | 10% | Dos resiembras de 1 semana. |
| Aislamiento | ATS: CTS+15 g L ⁻¹ de agar-agar. CTS | 0.96 mM 0 | 1 asada sobre medio sólido. 1 colonia con asa estéril. | 48 horas. 48 horas (la cantidad de resiembras depende de la pureza de las colonias). |

En varios estudios, las bacterias identificadas capaces de resistir altas concentraciones de Cr (VI) pertenecen al grupo de Enterobacterias con temperaturas óptimas de crecimiento de 37° C, en estas condiciones la biomasa se obtiene después de 24 h de incubación (Cheung y Gu, 2007; Aguilera *et al.*, 2004; Camargo *et al.*, 2003; Guha *et al.*, 2001; Shakoory *et al.*, 1999, 2000; Alvarez *et al.*, 1999; Cervantes y Ohtake, 1988; en Bader, 1999; Wang y Xiao, 1995; Shen y Wang, 1994; Cervantes y Silver, 1992; Wang *et al.*, 1989; Bopp y Ehrlich, 1988; Ohtake *et al.*, 1987; Bopp *et al.*, 1983). En el presente estudio se trabajó a temperatura ambiente (20° C) y al igual que Donmez y Kocberber (2004) que

trabajaron a esta temperatura, se logró el mayor crecimiento a las 48 h de incubación.

Tabla 19. Medios de cultivo aplicados para bacterias resistentes a PM.

| Etapa | Medio Utilizado | Concentración de contaminante | % inóculo | Tiempo de incubación |
|-------------------|---|-------------------------------|--|---|
| Enriquecimiento | MMS (mg L ⁻¹): 11, MgSO ₄ ·7H ₂ O; 14, CaCl ₂ ; 340, KH ₂ PO ₄ ; 670, Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O; 22, FeCl ₃ ·6H ₂ O; 500, NH ₄ Cl. | 0 | 20% | 2 resiembras de tres semanas. 1 resiembra de dos semanas. 2 resiembras de una semana. |
| Aclimatación | MMS modificado (libre de fosfatos) (mg L ⁻¹): 11, MgSO ₄ ·7H ₂ O; 187, KCl; 320, NaCl; 14, CaCl ₂ ; 22, FeCl ₃ ·6H ₂ O; 500, peptona. | 0.06 mM | 20% 10% | 2 resiembras de dos semanas. 3 resiembras de 1 semana. |
| Cultivo selectivo | MMS modificado. | 0.2, 0.3, 0.6 y 1 mM | 10% | Dos resiembras de 1 semana. |
| Aislamiento | AMSM: MMS modificado+ 15 g L ⁻¹ de agar-agar. CTS 1:10 | 0.2 mM 0 | 1 asada sobre medio sólido. 1 colonia con asa estéril. | Entre 3 y 5 días. 48 horas (la cantidad de resiembras depende de la pureza de las colonias). |

Durante la incubación de bacterias se trabajó a 20° C, a diferencia de otros autores que aplicaron un rango de temperaturas entre 30 y 35° C (Zhongli, 2001; Pakala *et al.*, 2006; Qiu *et al.*, 2007), esta diferencia de temperatura puede ser la razón de tiempos más largos de incubación durante la fase de aislamiento (48 h) ya que la mayoría de las cepas resistentes a PM reportadas logran el máximo crecimiento durante las primeras 24 h.

7.7 Colonias aisladas

Utilizando los datos de las tablas anteriores (Tabla 18 y Tabla 19), las cepas se clasificaron en grupos con características iguales, posteriormente, se analizaron las imágenes capturadas durante la observación microscópica para determinar, una cepa representativa de cada grupo. En la Tabla 20 se enumeran las cepas aisladas sometidas a procesos de


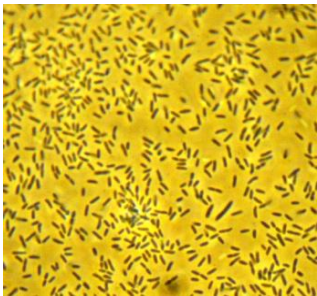
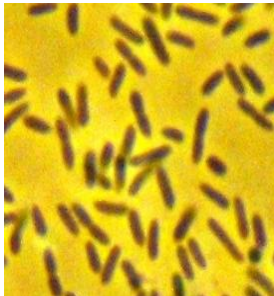

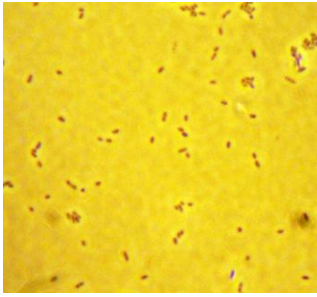
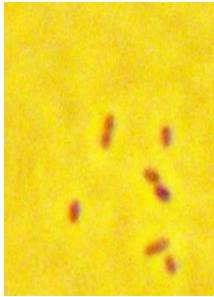
identificación así como el tamaño celular. Los resultados de la observación macroscópica y microscópica se presentan en

Tabla 21 y Tabla 22.

Tabla 20. Cepas seleccionadas para identificación.

| No. | ID* cepas Cr-resistentes | Tamaño celular | No. | ID cepas PM-resistentes | Tamaño celular |
|-----|--------------------------|---------------------|-----|-------------------------|--------------------|
| 1 | 2a ISI 1-19.23 mM | 1 X 0.75 μ m | 1 | 1-1a TUL 1-0.3 Mm | 2.5 X 0.5 μ m |
| 2 | 2b ISI 1-19.23 mM | 1.25 X 0.5 μ m | 2 | 1-3b TUL 1-0.3 Mm | 2 X 0.5 μ m |
| 3 | 7 ISI 2-19.23 mM | 1.75 X 0.75 μ m | 3 | 2-3b TUL 1-1mM | 2 X 0.75 μ m |
| 4 | 8 CTN 1-19.23 mM | 2 X 0.75 μ m | 4 | 4-1b TUL 2-0.6 mM | 5 X 0.75 μ m |
| 5 | 16 TUL 2 c | 1.5 X 1 μ m | 5 | 6-2 TUL 2-1 mM | 2.5 X 0.75 μ m |
| 6 | 17 TUL 2 d | 1 X 0.5 μ m | 6 | 7-1 ISI 1-0.6 mM | 1.5 X 0.5 μ m |
| 7 | 20 ISI 1 | 1 X 0.5 μ m | 7 | 10-1 ISI 2-0.3 mM | 3 X 0.5 μ m |
| | | | 8 | 10-3 ISI 2-0.3 mM | 2 X 0.75 μ m |
| | | | 9 | 12-1b ISI 2-1 mM | 1.5 X 0.5 μ m |
| | | | 10 | 13-1 CTN 1-0.3 mM | 2.5 X 0.75 μ m |
| | | | 11 | 25-1a CTN 2 | 1.5 X 0.5 μ m |

Tabla 21. Características morfológicas coloniales y celulares de las cepas aisladas, resistentes a Cr (VI).

| ID | Aspecto colonial | Vista microscópica | |
|-------------------|---|--|---|
| 2a ISI 1-19.23 mM |  |  |  |
| 2b ISI 1-19.23 mM |  |  |  |

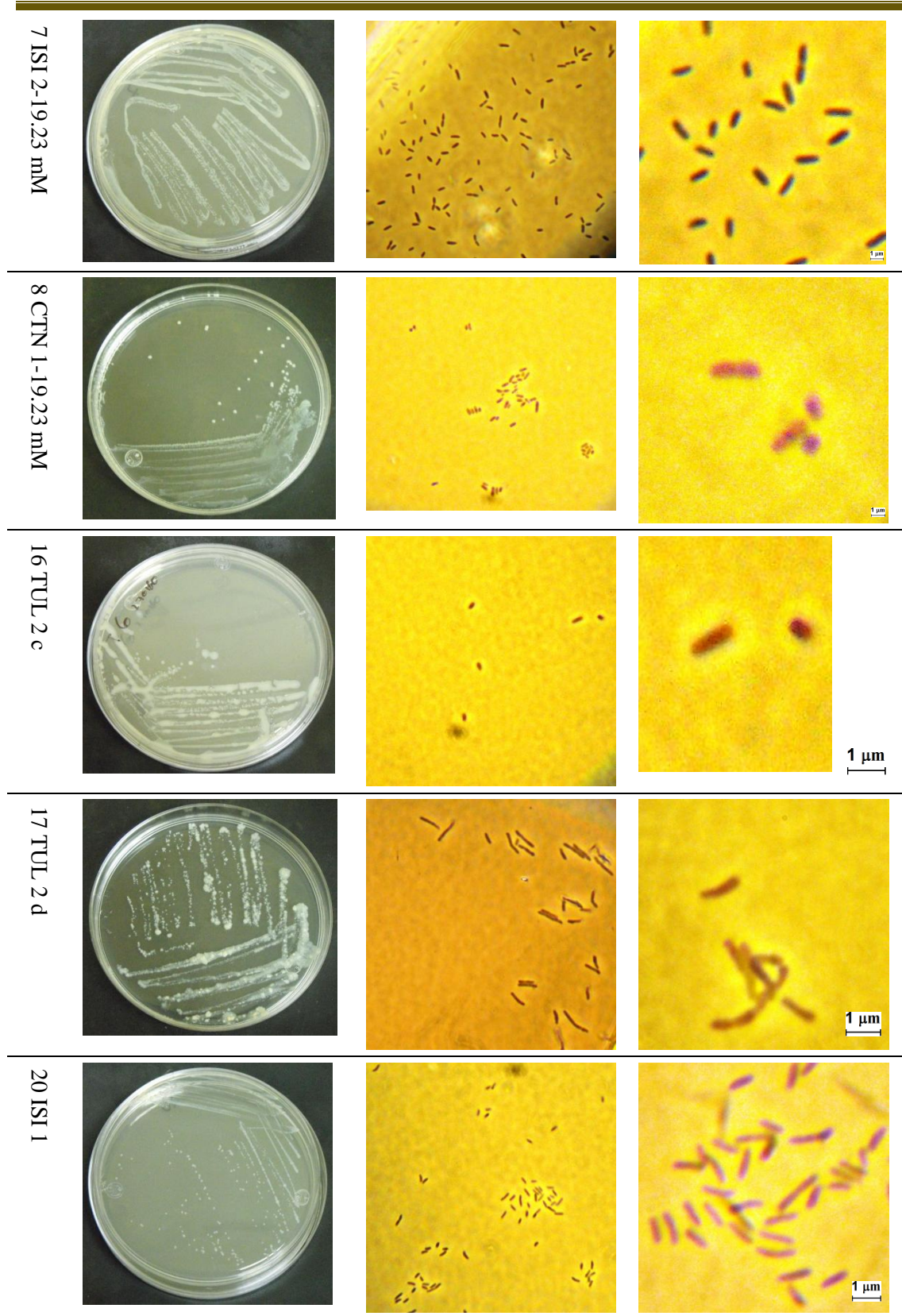


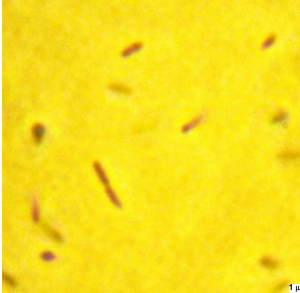


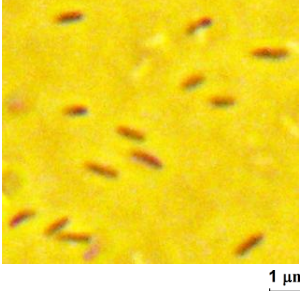

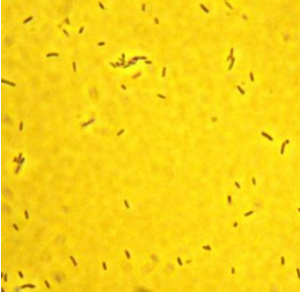
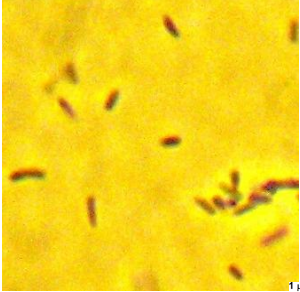




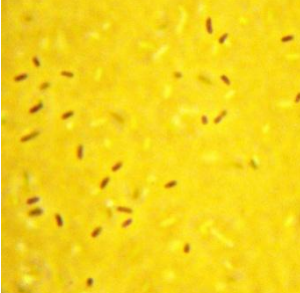
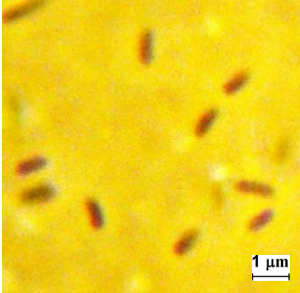
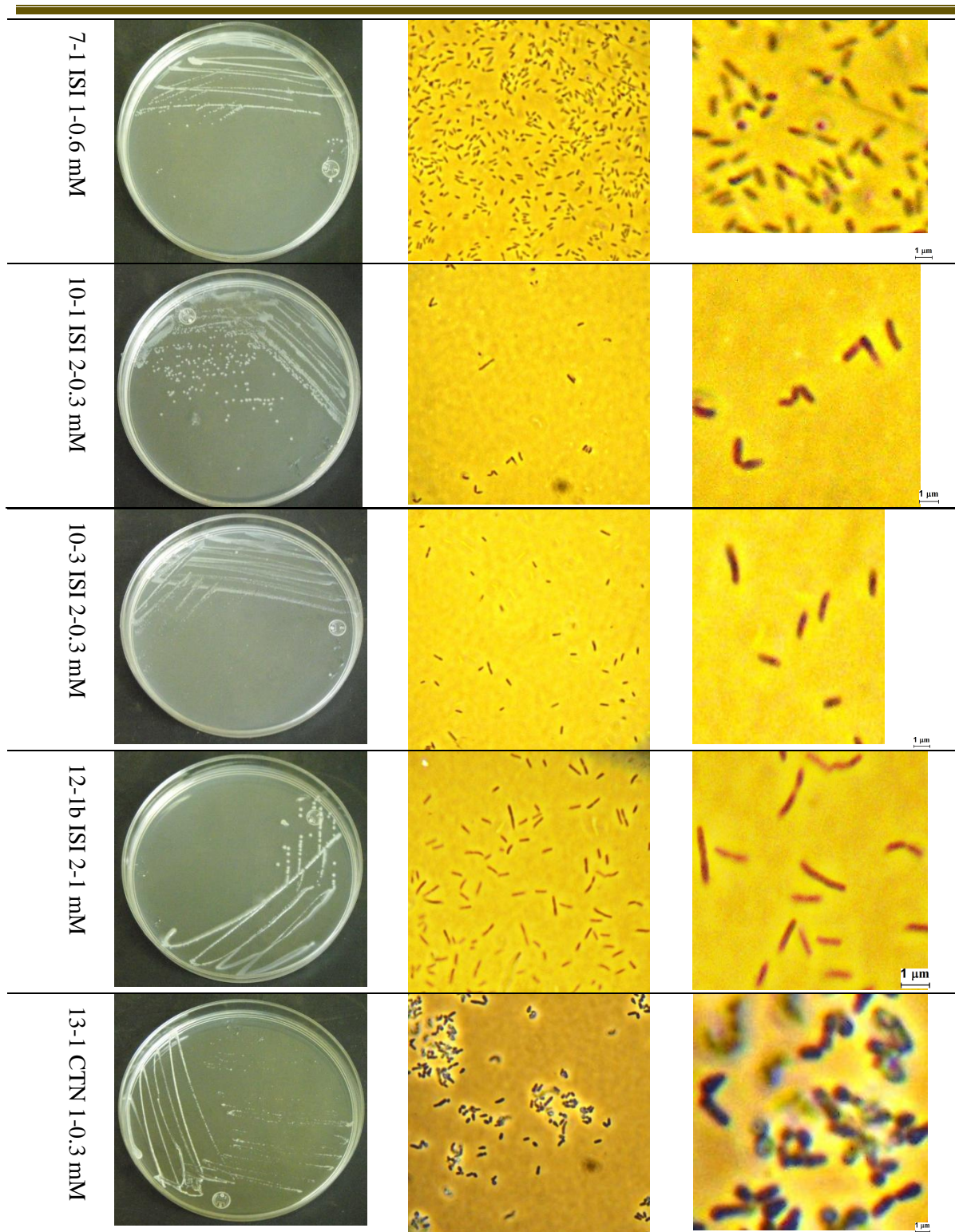
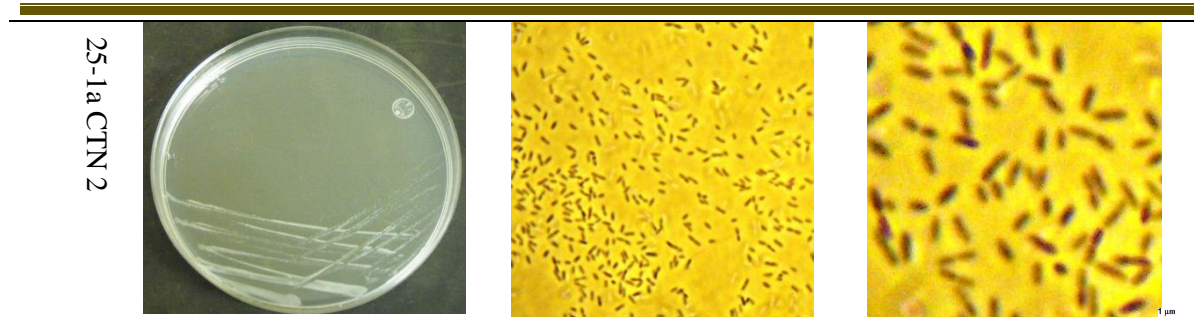


Tabla 22. Características morfológicas coloniales y celulares de las cepas aisladas, resistentes a PM.

| ID | Aspecto colonial | Vista microscopica | |
|-------------------|---|--|---|
| 1-1a TUL 1-0.3 Mm |  |  |  |
| 1-3b TUL 1-0.3 Mm |  |  |  |
| 2-3b TUL 1-1mm |  |  |  |
| 4-1b TUL 2-0.6 mM |  |  |  |
| 6-2 TUL 2-1 mM |  |  |  |





Aplicando los resultados de las Tabla 21 y Tabla 22, para las cepas elegidas para identificación y de acuerdo a las especificaciones de aplicación del kit API 20E, se concluyó que todas las cepas, a excepción de 4-1b TUL 2-0.6 mM y 13-1 CTN 1-0.3 mM, por ser Gram +, fueron candidatas a identificación vía bioquímica, las cuales fueron sometidas a las pruebas API 20E aplicando las especificaciones del fabricante. Es importante señalar que al igual que las cepas reportadas en varios estudios como resistentes a Cr (VI) (Nies y Silver, 1989; Valls *et al.*, 2000; Gopalan y Veeramani, 1994; McLean *et al.*, 2000; Vaneechoutte *et al.*, 2004 Romanenko y Korenkov, 1977; Bopp y Ehrlich, 1988; Donmez y Kocberber, 2004; Bopp *et al.*, 1983; Ohtake *et al.*, 1987; Alvarez *et al.*, 1999; Aguilera *et al.*, 2004), se encontraron únicamente bacilos Gram -, esto puede deberse entre otros aspectos metabólicos, a la resistencia de su doble membrana celular ausente en las bacterias Gram +, así como a la capacidad de agruparse en pares o cadenas observado comúnmente en bacilos.

7.8 Identificación bioquímica de las colonias aisladas

El kit API 20E maneja un tiempo de incubación de 48 horas, sin embargo, algunas cepas requirieron de 72 horas de incubación para reaccionar con los sustratos (10-1 ISI 2-0.3 mM, 12-1b, ISI 2-1 mM, 20 ISI 1, 1-1a TUL 1-0.3 Mm, 7-1 ISI 1-0.6 mM y 2b ISI 1-19.23 mM), esta discrepancia con el método se debe a que las cepas aisladas en ésta investigación son atípicas, es decir, están adaptadas a condiciones extremas de contaminación y temperaturas menores a 22° C, por lo que presentan cambios en su metabolismo y velocidad de crecimiento, contrario a las especies tipo para las cuales fue diseñado el kit API-20E. Únicamente la cepa 16 TUL 2b reaccionó a las 24 horas de incubación. Después del periodo total de incubación de las galerías API 20E, se obtuvieron los primeros siete dígitos que marca la técnica utilizando las reacciones de cada prueba (Figura 45).



Figura 45. Respuestas bioquímicas de algunas cepas analizadas así como su código de 7 cifras.

Dado que se encontraron algunas coincidencias de especies, se realizaron algunas pruebas complementarias (ver sección 6.9.3). Se obtuvieron los códigos de nueve cifras (Tabla 23) y se analizaron en la base de datos API 20E.

Tabla 23. Código de identificación API 20E de nueve dígitos

| ID cepas Cr-resistentes | ID API 20E | ID cepas PM-resistentes | ID API 20E |
|-------------------------|------------|-------------------------|------------|
| 2 a ISI 1-19.23 mM | 000000041 | 1-1a TUL 1-0.3 Mm | 000000001 |
| 2 b ISI 1-19.23 mM | 000062041 | 1-3b TUL 1-0.3 mM | 000000201 |
| 7 ISI 2-19.23 mM | 000000041 | 2-3b TUL 1-1mM | 000000001 |
| 8 CTN 1-19.23 mM | 000000001 | 4-1b TUL 2-0.6 mM | 000000000 |
| 16 TUL 2 c | 104453341 | 6-2 TUL 2-1 mM | 000000041 |
| 17 TUL 2 d | 000100000 | 7-1 ISI 1-0.6 mM | 000025041 |
| 20 ISI 1 | 000404241 | 10-1 ISI 2-0.3 mM | 020467301 |
| | | 12-1b ISI 2-1 mM | 000025041 |
| | | 25-1a CTN 2 | 004000041 |

Las cepas: 2a ISI 1-19.23 mM , 2b ISI 1-19.23 mM, 10-1 ISI 2-0.3 mM, 12-1b ISI 2-1 mM y 25-1a CTN 2 no correspondieron a ningún perfil bioquímico asociado a alguna especie para su identificación en la base de datos del kit API-20E. El resto de las bacterias presentaron perfiles bioquímicos dispares. A pesar de lo anterior, los resultados de la identificación bioquímica generan una serie de datos que junto con la caracterización

morfológica colonial y celular permite una descripción más amplia de cada cepa para su correcta identificación. Con la información recabada durante la observación macroscópica y microscópica, así como los resultados bioquímicos de las cepas aisladas se conformaron la Tabla 24 y Tabla 25 .

Tabla 24. Caracterización morfológica, fisiológica y bioquímica de las cepas aisladas resistentes a Cr (VI)

| Características Morfológicas/fisiológicas/bioquímicas | Cepas bacterianas | | | | | | |
|--|------------------------|------------------------|----------------------|----------------------|---------------|---------------|-------------|
| | 2 a ISI 1- 19.23 mM | 2 b ISI 1- 19.23 mM | 7 ISI 2- 19.23 mM | 8 CTN 1- 19.23 mM | 16 TUL 2 c | 17 TUL 2 d | 20 ISI 1 |
| Tinción de Gram | - | - | - | - | - | - | - |
| Forma celular | B ¹ | B | B | CB ² | B | B | B |
| Tamaño celular(μ m) | 1x.75 | 1.25 x.5 | 1.75x1 | 2x.75 | 1.5x1 | 1x0.5 | 1x0.5 |
| Movilidad | + | + | + | - | + | - | + |
| Crecimiento sobre agar MacConkey | + | + | + | + | + | - | + |
| Prueba indol | - | - | - | - | - | - | - |
| Producción de betagalactosidasa | - | - | - | - | + | - | - |
| Utilización de arginina | - | - | - | - | - | - | - |
| Utilización de lisina | - | - | - | - | - | - | - |
| Utilización de ornitina | - | - | - | - | - | - | - |
| Utilización de citrato | + | - | - | - | - | - | + |
| Utilización de urea | - | - | - | - | - | - | - |
| Utilización de triptófano | - | - | - | - | - | - | - |
| Utilización de gelatina de Kohn | - | - | - | - | - | - | - |
| Utilización de glucosa | - | - | - | - | + | - | - |
| Utilización de manitol | - | - | - | - | + | - | - |
| Utilización de inositol | - | + | - | - | - | - | - |
| Utilización de sorbitol | - | + | - | - | + | - | - |
| Utilización de ramnosa | - | - | - | - | + | - | - |
| Utilización de sacarosa | - | + | - | - | - | - | - |
| Utilización de melibidiosa | - | - | - | - | - | - | - |
| Utilización de amigdalina | - | - | - | - | + | - | - |
| Utilización de arabinosa | - | - | - | - | + | - | - |
| Producción de H ₂ S | - | - | - | - | - | - | - |
| Prueba oxidasa | - | - | - | - | - | - | - |
| No fermentador spp. | 90.7% ³ | NA | 88.3% | 87.6% | | | 90.7% |
| <i>Bordetella/Alcaligenes/Moraxella spp.</i> | | | | 87.5% | | 83.1% | |
| <i>Pantoea spp.</i> 4 | | | | | 86.9% | | |

1 B: Bacilar; 2 CB: Cocobacilar; 3 Porcentaje de certeza en la identificación utilizando el sistema API 20E; NA: no aplica, por el porcentaje de certeza menor al 70%.

Respecto a las cepas resistentes a PM, se encontraron dos cepas Gram +, a pesar de que esta característica es excluyente para aplicar el sistema de identificación Api-20E, se utilizó para establecer las características bioquímicas y complementar la información para la identificación de las cepas.

Tabla 25. Caracterización morfológica, fisiológica y bioquímica de las cepas aisladas resistentes a PM

| Características Morfológicas/fisiológicas/bioquímicas | Cepas bacterianas | | | | | | | | | | | |
|--|----------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------|----------------|--|
| | 1-1a TUL 1-0.3 Mm | 1-3b TUL 1-0.3 mM | 2-3b TUL 1- 1mM | 4-1b TUL 2-0.6 mM | 6-2 TUL 2- 1 mM | 7-1 ISI 1- 0.6 mM | 10-1 ISI 0.3 mM | 10-3 ISI 2-0.3 mM | 12-1b ISI 2- 1 mM | 13-1 CTN 1-0.3 mM | 25-1a CTN 2 | |
| Tinción de Gram | - | - | - | + | - | - | - | - | - | + | - | |
| Forma celular | B ¹ | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B | |
| Tamaño celular(μm) | 2.5x.5 | 2x.5 | 2x.75 | 5x.75 | 2.5x.75 | 1.5x.5 | 3x.5 | 2.5x.75 | 1.5x.5 | 2x.75 | 1.5x.5 | |
| Movilidad | - | - | + | - | + | + | - | - | + | - | - | |
| Crecimiento sobre agar MacConkey | + | + | + | - | + | + | + | - | + | + | + | |
| Prueba indol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | |
| Producción de betagalactosidasa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| Utilización de arginina | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| Utilización de lisina | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| Utilización de ornitina | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| Utilización de citrato | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | |
| Utilización de urea | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| Utilización de triptófano | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| Utilización de gelatina de Kohn | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| Utilización de glucosa | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | |
| Utilización de manitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| Utilización de inositol | - | - | - | - | - | + | + | - | + | - | - | |
| Utilización de sorbitol | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | |
| Utilización de ramnosa | - | - | - | - | - | + | + | - | + | - | - | |
| Utilización de sacarosa | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | |
| Utilización de melibidiosa | - | - | - | - | - | + | + | - | + | - | - | |
| Utilización de amigdalina | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | |
| Utilización de arabinosa | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | |
| Producción de H ₂ S | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| Prueba oxidasa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| No fermentador spp. | 87.9% | NA | 87.9% | | 91.9% | NA | NA | 84.6% | NA | | NA | |
| <i>Bordetella/Alcaligenes/Moraxella</i> spp. | | | | | | | | 86% | | | | |
| <i>Pantoea spp. 4</i> | | | | | | | | | | | | |
| <i>Myroides/Chryseobacterium indologenes</i> | 86.3% | | 86.3% | | | | | | | | | |
| <i>Ochrobactrun anthropi</i> | 87.5% | 84% | 87.5% | | 91.8% | | | | | | | |
| <i>Shigella sp.</i> | 87.9% | | 87.9% | | | | | | | | | |
| <i>Chryseobacterium meningosepticum</i> | | | | | | | | 81.7% | | | | |
| <i>Pseudomonas oryzihabitans</i> | | | | | 92% | | | | | | | |
| <i>Burkholdeira cepacia</i> | | | | | 82% | | | | | | | |

1 B: Bacilar; 2 CB: Cocobacilar; 3 Porcentaje de certeza en la identificación utilizando el sistema API 20E; NA: no aplica, por el porcentaje de certeza menor al 70%.

Las características bioquímicas obtenidas en las cepas aisladas en este estudio fueron distintas a las correspondientes a las bacterias reportadas como transformadoras de Cr (VI) y PM por otros estudios (Donmez y Kocberber, 2004; Wang *et al.* 1989; Bopp y Ehrlich 1988; Cervantes y Ohtake 1988; Ohtake *et al.*, 1987; Ehrlich 1986; Bopp *et al.*, 1983; Qiu *et al.*, 2007; Pakala *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2002; Ortíz-Hernández *et al.*, 2001; Zhongli *et al.*, 2001; Chaudhry *et al.*, 1988). Sin embargo, pueden esperarse cambios metabólicos

como mecanismos de adaptación a condiciones de toxicidad.

Los resultados de los análisis morfológico y bioquímico, señalan que todas las cepas aisladas son metabólicamente distintas. Sin embargo, para este estudio la técnica de identificación bioquímica vía API-20E proporcionó porcentajes de especies relacionadas entre 81.7 y 92.0%, lo cual es limitado para establecer una identificación concluyente. En este caso, se realizó un análisis vía molecular para la correcta identificación de las cepas.

7.9 Identificación molecular de las colonias aisladas

El resultado final de la identificación molecular se presenta en Tabla 26 y Tabla 27. Los números de acceso para el GenBank se presentan en Anexo 14 y Anexo 15.

Tabla 26. Identificación molecular de bacterias resistentes a Cr (VI), con su respectivo % de similitud respecto a su secuencia en el Genbank

| ID cepas Cr-resistentes | Organismos relacionados | % Similitud |
|-------------------------|------------------------------------|-------------|
| 2a ISI 1-19.23 mM | <i>Pseudomonas reactans</i> AMP-13 | 93 |
| | <i>Pseudomonas sp.</i> NCCP-18 | |
| 2b ISI 1-19.23 mM | <i>Comamonas testosteroni</i> A | 100 |
| 7 ISI 2-19.23 mM | <i>Pseudomonas fluorescens</i> A | 97.5 |
| 8 CTN 1-19.23 mM | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 97 |
| | <i>Pseudomonas fluorescens</i> B | |
| 16 TUL 2 c | <i>Pseudomonas fluorescens</i> B | 97.5 |
| 17 TUL 2 d | <i>Pseudomonas sp.</i> | 99 |
| 20 ISI 1 | <i>Pseudomonas entomophila</i> L48 | 97 |

La secuencia de la cepa 2a ISI 1-19.23 mM, obtuvo para las especies *Pseudomonas reactans* AMP-13 y *Pseudomonas sp.* NCCP-18 un 93% de similitud, éste dato no es concluyente para una identificación final, por lo tanto, se denominan dentro del grupo *Pseudomonas* en el orden Pseudomonales. Se encontraron principalmente bacterias del género *Pseudomonas*, lo cual resultó inconsistente con la identificación obtenida en el análisis bioquímico realizado con el kit API-20E. Esta inconsistencia se relaciona con la variabilidad bioquímica de la especie *Pseudomonas fluorescens* (Bergey, 2008) y la adaptabilidad de las bacterias resistentes a contaminantes. Una de las especies que no ha sido reportada en la literatura como resistentes a Cr (VI) y que fue identificada en este estudio fue *Pseudomonas entomophila* L48.

Respecto a las especies identificadas en este estudio y las encontradas por otros autores; Anderl *et al.* (2000) demostraron la resistencia a antibióticos de una biopelícula de *Klebsiella pneumoniae* formando complejos con metales pesados entre los cuales se encontraba el Cr (VI). Filali *et al.* (1999) aislaron de agua residual a las cepas *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y *Staphylococcus*, estas bacterias resultaron resistentes a metales pesados y antibióticos. En esta línea de investigación, Sultana *et al.* (2003), encontraron que las especies *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* y *Streptococcus faecalis* fueron resistentes al complejo antibiótico-metal: cefradina-cromo, estas cepas fueron susceptibles a concentraciones superiores a $128 \mu\text{g mL}^{-1}$. Sharma *et al.* (2000) aislaron una cepa de *Klebsiella* altamente resistente a Cd con capacidad de precipitarlo, por lo que se plantea a estos organismos como un potencial agente para biorremediación de contaminación por metales pesados.

En lo que respecta al grupo *Pseudomonas*, éste ha sido reportado por varios autores como resistente al ion cromato (Bopp *et al.*, 1983; Horitsu *et al.*, 1983; Lebedeva y Lyalikova, 1979; Summers y Jacoby, 1978). En general, los sistemas de resistencia a metales pesados están codificados en los genes del grupo *Pseudomonas*, lo que le confiere una adaptabilidad ambiental característica (Aguilar-Barajas *et al.*, 2010). Específicamente Bopp y Ehrlich (1988) encontraron a *Pseudomonas fluorescens* sobreviviendo en sitios contaminados con Cr (VI) y, recientemente, Parameswari *et al.* (2009) examinaron a la especie *Pseudomonas fluorescens* aislada de un suelo contaminado con metales pesados y evaluaron su tolerancia a Cr (VI) y su habilidad para reducir Cr (VI) a Cr (III). Se encontró que *Pseudomonas fluorescens* redujo entre un 52% y 61% Cr (VI) a Cr (III) a diferentes valores de pH.

Cepas de *Comamonas* han sido aisladas de sitios contaminados con varios complejos orgánicos y metales pesados, y en particular una cepa resistente a Cd fue aislada (Kanazawa y Mori, 1996 en Bergey, 2008). Además de los estudios anteriores, en un par de estudios locales las especies *Klebsiella pneumoniae* (Lowe, 2002) y *Comamonas testosteroni* (Thuy, 2003) han sido identificadas como resistentes a Cr (VI).

Las bacterias resistentes a PM identificadas en este estudio, se presentan en la Tabla 27.

Tabla 27. Identificación de bacterias resistentes a PM, con su respectivo % de similitud respecto a su secuencia en el Genbank

| ID cepas PM-resistentes | Organismos relacionados | % Similitud |
|-------------------------|-----------------------------------|-------------|
| 1-1a TUL 1-0.3 Mm | <i>Pseudomonas fluorescens C</i> | 98.5 |
| 1-3b TUL 1-0.3 mM | <i>Pseudomonas fluorescens D</i> | 95 |
| 2-3b TUL 1-1mM | <i>Pseudomonas fluorescens E</i> | 98.5 |
| 4-1b TUL 2-0.6 mM | <i>Leifsonia xyli subsp. xyli</i> | 96 |
| 6-2 TUL 2-1 mM | <i>Pseudomonas fluorescens F</i> | 98.5 |
| 7-1 ISI 1-0.6 mM | <i>Comamonas testosteroni B</i> | 99 |
| 10-1 ISI 2-0.3 mM | <i>No concluyente*</i> | |
| 10-3 ISI 2-0.3 mM | <i>Achromobacter piechaudii A</i> | 99 |
| 12-1b ISI 2-1 mM | <i>Comamonas testosteroni C</i> | 100 |
| 13-1 CTN 1-0.3 mM | <i>Rhodococcus erythropolis</i> | 100 |
| 25-1a CTN 2 | <i>Achromobacter piechaudii B</i> | 98 |

*Ninguna de las cepas propuestas corresponden con las características morfológicas de la cepa original.

En el sitio identificado como colonia Isidro Fabela (Totoltepec) se encontró una mayor variabilidad de especies para ambos contaminantes, dentro de las bacterias seleccionadas. Este sitio es considerado como uno de los más contaminados (Zarazúa, 2008), ya que se encuentra afectada por las descargas de las plantas de tratamiento de la zona de Lerma, Reciclagua y las canalizadas por el río Atarasquillo, por lo que recibe gran cantidad de aportes bacterianos y de contaminantes.

En el sitio identificado como Tultepec se encontraron la mayor cantidad de bacterias transformadoras de Cr (VI) y PM dentro del grupo de bacterias seleccionadas. Esta eficiencia de transformación en las cepas se debe a que en ésta zona se encuentra afectada por las descargas de zonas agrícolas como Zinacantepec y plantas industriales como la de San Mateo Atenco.

La especie *Pseudomonas fluorecens* apareció en un alto porcentaje como degradadora de PM, aunque no se encontraron estudios específicos de resistencia y degradación de PM por ésta cepa en particular. Sin embargo, se han estudiado una gran cantidad de especies bacterianas capaces de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), por ejemplo, *Pseudomonas sp.* (Hilyard *et al.*, 2008), *Achromobacter sp.* (Leahy y Colwell,

1990) y *Pseudomonas fluorescens* (Serebriiskaya *et al.*, 1999). Se encontró una cepa denominada *Pseudomonas sp.* aislada de lodos activados capaz de degradar o-nitrobenzaldehído (ONBA) y posteriormente demostraron que esta cepa es capaz de degradar otros compuestos orgánicos como: ácido benzoico, 2-nitrofenol, 2-aminofenol, ácido 4-hidroxibenzoico y 4-dimetilaminobenzaldeído (Fang-Bo *et al.*, 2006).

Sobre estudios de comunidad se estudió una con capacidad de degradar naftaleno, fluoreno, pireno, criseno, indeno y benzoantraceno entre las especies identificadas se encontraron principalmente los géneros *Klebsiella sp.* y *Pseudomonas sp.* (Coelho *et al.*, 2010). Además se han reportado como degradadoras de pesticidas: *Pseudomonas sp.* y *Rhodococcus sp.* (Vidali, 2001).

Ying-Fei *et al.* (2010) analizaron el genoma completo de la especie *Comamonas testosteroni*, con lo cual demostraron cómo las células responden y se adaptan genéticamente a los cambios ambientales y, por ende, poseen una capacidad innata de tolerar concentraciones elevadas de contaminantes variados, por ejemplo, Cr (VI) y PM.

Es común que en el medio ambiente existan fuertes barreras ecológicas que limiten la dispersión de los microorganismos, generando divergencias genéticas entre poblaciones de las mismas especies debido al aislamiento y a la adaptación a diferentes sustratos y presiones ambientales, tal es el caso de las cepas resistentes a sustancias tóxicas.

A pesar de las diferencias bioquímicas y morfológicas coloniales, varias de las cepas analizadas en este estudio resultaron ser de la misma especie, esto se debe a la alta tasa de mutación presente en bacterias, donde pequeñas diferencias en el material genético, producto de las condiciones del medio ambiente, pueden generar desde afectación en funciones específicas hasta cambios metabólicos importantes. Esto explica que el porcentaje de similitud obtenido en la base de datos del GenBank, para la identificación de especies no fue en todos los casos del 100%. Incluso se aprecian pequeñas diferencias en las secuencias de las cepas identificadas con la misma especie en este estudio.

A continuación se muestra la diversidad de especies resistentes a Cr (VI) y PM seleccionadas en ésta investigación, así como la totalidad de especies identificadas (Figura

46).

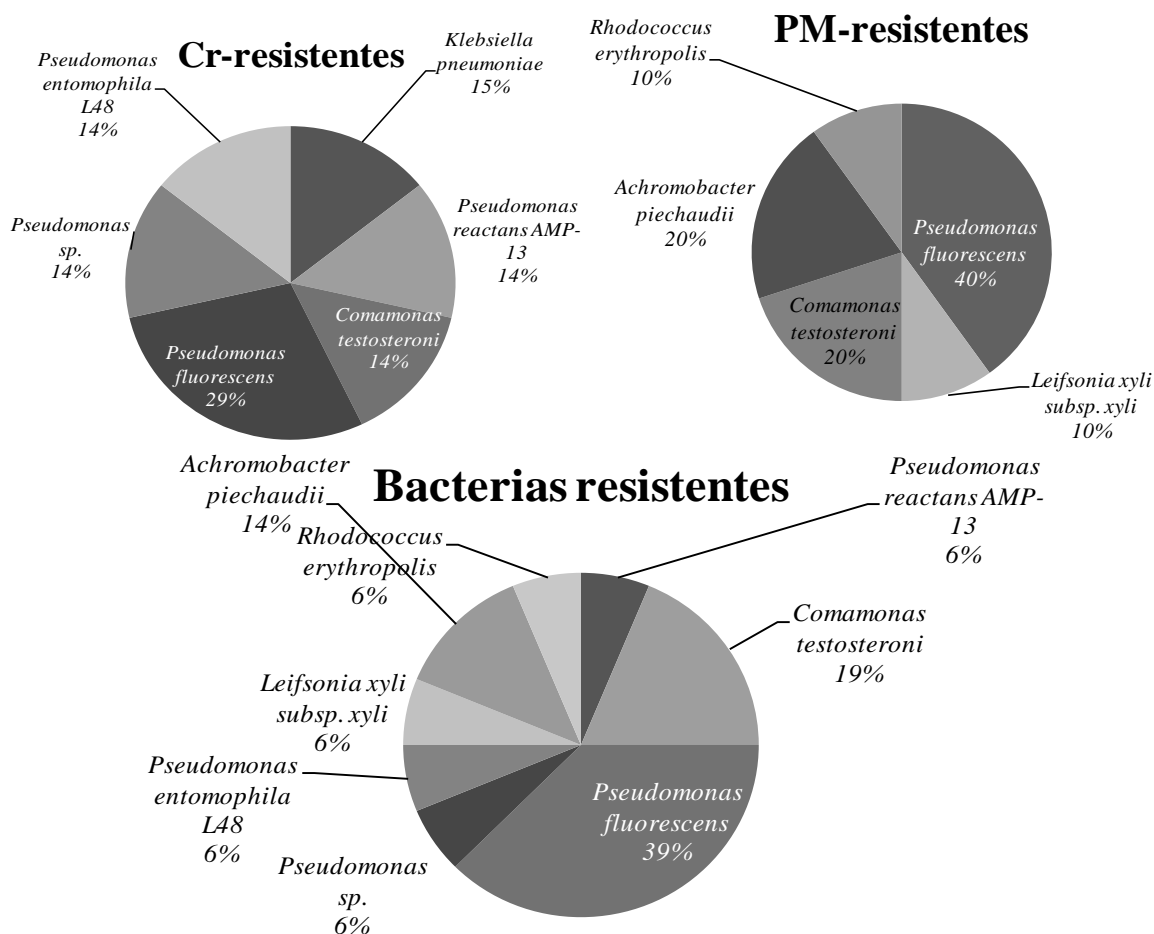


Figura 46. Proporción de bacterias resistentes a Cr (VI), PM y concentrado total de las cepas identificadas

De las siete bacterias identificadas como bacterias resistentes a Cr (VI) se encontraron principalmente *Pseudomonas* spp. Para PM se encontró mayor variabilidad de especies, debido a que las bacterias son capaces de utilizar una gran cantidad de sustancias orgánicas como fuente de carbono y fósforo. En general la especie más común fue *Pseudomonas fluorescens* seguida por *Comamonas testosteroni*, esto se debe a que ambas especies son de amplia distribución ambiental y en particular *Pseudomonas fluorescens* presenta una flexibilidad en cuanto al uso de sustratos orgánicos (Bergey, 2008).

La importancia de la identificación y obtención de cepas puras permite análisis específicos en cepas adaptadas a condiciones fisicoquímicas y biológicas particulares, tales como las

del río Lerma, también nos permite un conocimiento de la diversidad bacteriológica de importancia biotecnológica en los sedimentos, así como un manejo adecuado de las cepas respecto a su peligrosidad y dispersión.

La mayor parte de las especies identificadas en éste estudio son ambientales (saprófitas y epífitas), únicamente *Klebsiella pneumoniae* representa un riesgo biológico. *Klebsiella pneumoniae* es una especie ubicua, presente como comensal en nasofaringe (tasa de detección 1-6%) y tracto digestivo (tasa de detección 5-38%) en humanos, sin embargo puede causar infecciones urinarias o pulmonares en humanos y equinos, su contagio es por contacto principalmente de manos, y en hospitales por in mobiliario y productos sanguíneos contaminados (Podschn y Ullmann, 1998; en: Bergey, 2008).

7.10 Selección de porcentaje de inóculo y concentración de Cr (VI)

Se escogieron dos colonias, la de más lento crecimiento (*Pseudomonales sp.* y la de crecimiento más rápido (*Klebsiella pneumoniae*). Se trabajaron con concentraciones de 2.88, 5.77, 11.53 y 23 mM de Cr; y con 0.5, 1 y 5% de inóculo. Después de 72 horas se presentó crecimiento en ambas cepas en todos los porcentajes de inóculo, pero con la concentración más baja de contaminante (2.88 mM). Para considerar el resultado final se mantuvo el cultivo por siete días.

Tabla 28. Pruebas de resistencia, para dos cepas de bacterias Cr-resistentes.

| % Inóculo Cr (VI)(mM) | <i>Pseudomonales sp.</i> | | | | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | | | |
|--------------------------|--------------------------|------|-----------------|------------------|------------------------------|------|-------|------------------|
| | 2.88 | 5.77 | 11.53 | 23 | 2.88 | 5.77 | 11.53 | 23 |
| 0.5% | +* | + | - ^{**} | - | + | + | + | - |
| 1% | + | + | - | - | + | + | + | - |
| 5% | + | + | - | - ^{***} | + | + | + | - ^{***} |

*: Crecimiento observado por turbidez en el medio. **: No se observó crecimiento por turbidez. ***: Bajo microscopio se observó sobrevivencia de las células inoculadas, sin crecimiento poblacional.

La observación bajo el microscopio demostró que hay una relación directa entre la concentración de Cr y la movilidad de las células. En las concentraciones de 2.88 y 5.77 mM la movilidad de los bacilos fue reducida pero adecuada, comparada con la cepa original sin contaminante. En la concentración mayor en la cual se obtuvo crecimiento para la cepa *Klebsiella pneumoniae* fue de 11.53 mM. La movilidad de las células “*in vivo*” fue

casi nula y los bacilos se agruparon en forma de estreptobacilos (colonias). En la mayor concentración (23 mM), con un inóculo del 5%, para ambas cepas, se observaron bajo el microscopio células poco móviles, probablemente las mismas inoculadas siete días antes.

Para las pruebas de transformación y determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI) de Cr (VI) se utilizó 1% de inóculo y una concentración de 3.8 mM, esta concentración es muy cercana a la que presentan las aguas industriales de tenería (en promedio: 3.5 mM de Cr) (Oke *et al.*, 2006).

7.11 Concentración mínima inhibitoria (CMI) de Cr (VI) y PM en cepas puras seleccionadas

La cantidad de células encontradas en el medio de cultivo TS adicionado con diferentes concentraciones de Cr (VI) al día 0 y 7 de cultivo nos permiten establecer la CMI. Se considera que la concentración mayor en la cual hubo crecimiento al día 7 de incubación en comparación al día 0, será el límite inferior de la CMI y el límite superior corresponde a la siguiente concentración en orden creciente con la que se haya trabajado. Por lo tanto la CMI es un rango de concentraciones en el cual la cepa expuesta al contaminante es incapaz de reproducirse. La contabilización celular directa de cada cepa al día 0 y 7 se presentan en la Tabla 29:

Tabla 29. Conteo celular en cámara de Neubauer para la detección de crecimiento de bacterias resistentes a Cr (VI) expuestas a diferentes concentraciones de contaminante.

| ID CEPA | Concentración (mM): | 4.8 | 5.8 | 9.6 | 14.4 | 19.2 |
|------------------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | Día 0 (UFC/mL) | Día 7 (UFC/mL) | Día 7 (UFC/mL) | Día 7 (UFC/mL) | Día 7 (UFC/mL) | Día 7 (UFC/mL) |
| Pseudomonales sp. | 7.50X10 ⁷ | 5.23X10 ⁸ | 4.75X10 ⁸ | 2.38X10 ⁸ | 6.88X10 ⁷ | 4.25X10 ⁷ |
| <i>Comamonas testosteroni</i> A | 8.00X10 ⁷ | 2.75X10 ⁸ | 2.67X10 ⁸ | 7.63X10 ⁷ | 6.39X10 ⁷ | 2.38X10 ⁷ |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> A | 1.16X10 ⁸ | 8.2X10 ⁸ | 7.23X10 ⁸ | 2.69X10 ⁸ | 8.75X10 ⁷ | 0 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 1.07X10 ⁸ | 1.91X10 ¹⁰ | 1.72X10 ¹⁰ | 8.6X10 ⁹ | 4.63X10 ⁷ | 2.38X10 ⁷ |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> B | 1.34X10 ⁸ | 1.31X10 ⁸ | 1.98X10 ⁸ | 3.63X10 ⁷ | 2.38X10 ⁷ | 4.0X10 ⁷ |
| <i>Pseudomonas</i> sp | 1.88X10 ⁷ | 1.89X10 ⁸ | 1.58X10 ⁸ | 5.63X10 ⁷ | 3.75X10 ⁶ | 1.25X10 ⁷ |
| <i>Pseudomonas entomophila</i> L48 | 6.63X10 ⁷ | 3.01X10 ⁸ | 2.73X10 ⁸ | 1.01X10 ⁸ | 7.57X10 ⁷ | 7.13X10 ⁷ |

De los resultados anteriores se obtuvo la CMI para las bacterias resistentes a Cr (VI), para

la cepa *Pseudomonas fluorescens B* fue entre 0.96-4.8 mM de Cr (VI), el valor de 0.96 mM proviene de la concentración utilizada para el aislamiento al cual todas las cepas son resistentes y el 4.8 fue la máxima concentración en la cual no hubo crecimiento, por lo tanto la CMI se encuentra entre 0.96 y 4.8 mM. Para la cepa *Comamonas testosteroni A*, la CMI se encontró entre 5.8-9.6 mM. Finalmente para las cepas: *Pseudomonales sp.*, *Pseudomonas fluorescens A*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas sp* y *Pseudomonas entomophila L48* entre 9.6-14.4 mM. Cabe mencionar que la concentración de 19.2 mM de Cr (VI) únicamente resultó letal para la cepa *Pseudomonas fluorescens A*, ya que el resto de las poblaciones lograron sobrevivir a esta concentración de contaminante, estos resultados son similares a los obtenidos por Donmez y Kocberber (2004) y Bader *et al.* (1999). En cuanto a la CMI, Srinath *et al.* (2002) reportan CMI superiores a 151 mg L⁻¹ (3.0 mM) sólo en el 13% de las cepas aisladas, a diferencia del presente estudio en donde la CMI fue mayor a 250 mg L⁻¹ (4.8 mM) para 6 de 7 cepas aisladas.

Para las bacterias resistentes a PM cultivadas en MMS, se obtuvieron los resultados que se presentan en la Tabla 30:

Tabla 30. Conteo celular en cámara de Neubauer para la detección de crecimiento de bacterias resistentes a PM expuestas a diferentes concentraciones de contaminante.

| Concentración (mM): | | 0.75 | 2.0 | 3.75 | 4.0 | 5.0 |
|-----------------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| ID CEPA | Día 0 (UFC/mL) | Día 7 (UFC/mL) | Día 7 (UFC/mL) | Día 7 (UFC/mL) | Día 7 (UFC/mL) | Día 7 (UFC/mL) |
| <i>Pseudomonas fluorescens C</i> | 3.6X10 ⁷ | 8.61 X10 ⁷ | 7.20X10 ⁷ | 5.00X10 ⁸ | 4.00X10 ⁷ | 1.25X10 ⁷ |
| <i>Pseudomonas fluorescens D</i> | 5.6X10 ⁷ | 1.50 X10 ⁸ | 2.13 X10 ⁸ | 4.00 X10 ⁸ | 6.20X10 ⁷ | 5.00X10 ⁷ |
| <i>Pseudomonas fluorescens E</i> | 7.6X10 ⁷ | 1.26 X10 ⁸ | 1.5 X10 ⁸ | 8.40 X10 ⁸ | 9.62 X10 ⁸ | 7.87X10 ⁷ |
| <i>Leifsonia xyli subsp. xyli</i> | 4.4X10 ⁷ | 5.44 X10 ⁷ | 6.8 X10 ⁷ | 3.00 X10 ⁸ | 3.45 X10 ⁸ | 4.10X10 ⁷ |
| <i>Pseudomonas fluorescens F</i> | 2.40X10 ⁷ | 8.88 X10 ⁷ | 1.25 X10 ⁸ | 2.60 X10 ⁸ | 3.00X10 ⁷ | 2.45X10 ⁷ |
| <i>Comamonas testosteroni B</i> | 1.2X10 ⁷ | 1.75 X10 ⁸ | 3.30 X10 ⁸ | 4.40 X10 ⁸ | 1.80X10 ⁷ | 1.00X10 ⁷ |
| 10-1 ISI 2-0.3 mM | 1.2X10 ⁷ | 2.16 X10 ⁸ | 2.82 X10 ⁸ | 3.60 X10 ⁸ | 1.30X10 ⁷ | 1.25X10 ⁷ |
| <i>Achromobacter piechaudii A</i> | 3.0X10 ⁷ | 1.66 X10 ⁸ | 1.66 X10 ⁸ | 1.80 X10 ⁸ | 2.80X10 ⁷ | 2.85X10 ⁷ |
| <i>Comamonas testosteroni C</i> | 2.0X10 ⁷ | 1.00 X10 ⁸ | 2.13 X10 ⁸ | 3.20 X10 ⁸ | 2.50X10 ⁷ | 2.10X10 ⁷ |
| <i>Rhodococcus erythropolis</i> | 2.6X10 ⁷ | 2.06 X10 ⁸ | 2.06 X10 ⁸ | 1.60 X10 ⁸ | 2.9X10 ⁷ | 2.75X10 ⁷ |
| <i>Achromobacter piechaudii B</i> | 1.6X10 ⁷ | 1.50 X10 ⁸ | 1.50 X10 ⁸ | 3.20 X10 ⁸ | 1.80X10 ⁷ | 1.58X10 ⁷ |

De los resultados anteriores se obtuvo la CMI para las bacterias resistentes a PM, para las cepas: *Pseudomonas fluorescens C*, *Pseudomonas fluorescens D*, *Pseudomonas fluorescens F*, *Comamonas testosteroni B*, Cepa 10-1 ISI 2-0.3 mM, *Achromobacter piechaudii A*, *Comamonas testosteroni C*, *Rhodococcus erythropolis* y *Achromobacter piechaudii B* fue entre 3.75-4.0 mM de PM, para las cepas *Pseudomonas fluorescens E* y *Leifsonia xyli subsp. xyli* fue entre 4.0-5.0 mM de PM. No se encontró ninguna concentración letal con las concentraciones de PM a las que se expuso a las cepas. En cuanto a la CMI, únicamente Pakala *et al.* (2006) reportan una concentración máxima de crecimiento para *Serratia sp.* de 2.25 mM de PM, en el presente estudio la CMI fue mayor a 3.75 mM para todas las cepas aisladas.

7.12 Porcentajes de transformación de Cr (VI) y PM por las cepas puras seleccionadas

Los porcentajes de transformación entre las bacterias resistentes a Cr (VI) se calcularon aplicando ecuación 2:

$$\% \text{Transformación de Cr (VI)} = \frac{\left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \text{Cr(VI)}_{\text{inicial}}\right) - \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \text{Cr(VI)}_{\text{final}}\right)}{\frac{\text{mg}}{\text{L}} \text{Cr(VI)}_{\text{inicial}}} \times 100\% \quad \text{Ecuación (2)}$$

Para calcular el porcentaje de transformación de las bacterias resistentes a Cr (VI) seleccionadas, se restó el porcentaje de transformación abiótico del medio de cultivo TS. Los resultados se presentan en la Tabla 31:

Tabla 31. Porcentaje de transformación de Cr (VI) a Cr (III) en las cepas aisladas.

| ID | Concentración inicial (mg L ⁻¹ Cr (VI)) | | Concentración final (mg L ⁻¹ Cr (VI)) | | % Transformación (de Cr (VI) a Cr (III)) |
|--------------------------------------|---|--------|---|--------|---|
| | Media | Dv std | Media | Dv std | |
| <i>Pseudomonales sp.</i> | 142.93 | 4.27 | 89.06 | 10.82 | 20.48% |
| <i>Comamonas testosteroni A</i> | 127.96 | 2.62 | 127.81 | 14.33 | NT |
| <i>Pseudomonas fluorescens A</i> | 115.64 | 1.52 | 72.93 | 8.96 | 19.72% |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 109.84 | 3.96 | 92.46 | 10.09 | NT |
| <i>Pseudomonas fluorescens B</i> | 149.11 | 3.02 | 137.87 | 6.44 | NT |
| <i>Pseudomonas sp.</i> | 121.52 | 4.24 | 102.73 | 13.57 | NT |
| <i>Pseudomonas entomophila L48</i> | 189.12 | 5.75 | 111.96 | 3.73 | 23.59% |
| Control + (CTS+Cr (VI)) | 164.07 | 6.29 | 135.83 | 3.91 | 17.21% |
| Control +(H ₂ O+Cr (VI)) | 202.43 | 0.28 | 182.32 | 1.70 | 9.93% |

NT: No transformadora.

Las cepas resistentes a Cr (VI): *Pseudomonales sp.*, *Pseudomonas fluorescens A* y *Pseudomonas entomophila L48*, fueron capaces de reducir Cr (VI) a Cr (III). El resto de las cepas no presentaron esta capacidad, ya que a pesar de tener porcentajes de transformación positivos considerando el sistema completo (bacterias+medio de cultivo) éstos resultaron menores que el medio de cultivo sin inóculo e incluso menores. Por lo tanto, las cepas *Comamonas testosteroni A*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas fluorescens B* y *Pseudomonas sp.* fueron resistentes a la presencia de Cr (VI) pero que no pudieron transformarlo.

A diferencia de las cepas resistentes a Cr (VI), para el caso de la transformación de PM las cepas aisladas resistentes al PM no resultaron ser muy eficientes (Tabla 32). Los valores residuales de fosfato se utilizaron como un indicativo indirecto de la degradación de PM. Para obtener el porcentaje de degradación se aplicó la ecuación 3:

$$\% \text{Transformación de PM} = \frac{\left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \text{PO}_4^{3-} \text{ final} \right) - \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \text{PO}_4^{3-} \text{ inicial} \right)}{\frac{\text{mg}}{\text{L}} \text{PO}_4^{3-} \text{ teórico}} \times 100\%$$

Ecuación (3)

En donde el valor teórico de fosfato en mg L^{-1} corresponde a la cantidad máxima de fosfato que se podría encontrar en la solución en caso de que todo el PM (0.75 mM) fuese transformado.

Tabla 32. Porcentajes de transformación de PM en las cepas aisladas.

| Cepa | Concentración inicial ($\text{mg L}^{-1} \text{PO}_4^{3-}$) | | Concentración final ($\text{mg L}^{-1} \text{PO}_4^{3-}$) | | % transformación |
|-----------------------------------|--|--------|--|--------|---------------------|
| | Media | Dv std | Media | Dv std | |
| <i>Pseudomonas fluorescens C</i> | 26.3 | 1.32 | 27.75 | 0.05 | 2.04% |
| <i>Pseudomonas fluorescens D</i> | 24.2 | 0.80 | 25.42 | 0.13 | 1.71% |
| <i>Pseudomonas fluorescens E</i> | 24.2 | 2.36 | 24.8 | 0.52 | 0.84% |
| <i>Leifsonia xyli subsp. xyli</i> | 25.5 | 2.32 | 25.58 | 1.40 | 0.11% |
| <i>Pseudomonas fluorescens F</i> | 24.8 | 2.32 | 24.83 | 0.68 | 0.04% |
| <i>Comamonas testosteroni B</i> | 25.6 | 3.40 | 33.92 | 0.77 | 11.68% |
| 10-1 ISI 2-0.3 mM | 25.6 | 1.94 | 26.42 | 0.48 | 1.15% |
| <i>Achromobacter piechaudii A</i> | 25.6 | 2.25 | 28.25 | 0.30 | 3.72% |

| | | | | | |
|-----------------------------------|------|------|-------|------|--------|
| <i>Comamonas testosteroni C</i> | 25.6 | 2.27 | 32.33 | 0.38 | 9.45% |
| <i>Rhodococcus erythropolis</i> | 25.6 | 1.15 | 29.08 | 1.10 | 4.89% |
| <i>Achromobacter piechaudii B</i> | 25.6 | 1.13 | 30.67 | 0.20 | 7.12% |
| Ctrl +(MSM+PM) | 0.39 | 0.01 | 0.18 | 0.01 | -0.30% |
| Ctrl + (MSM+PM+CTS) | 27.0 | 0.15 | 27.6 | 0.30 | 0.03% |

Los resultados encontrados coinciden con las observaciones de algunos autores, que indican que la degradación de PM ocurre como resultado de procesos de cometabolismo, aumentando su eficiencia significativamente cuando las bacterias actúan como un consorcio y no como cultivos axénicos (Ortíz-Hernández *et al.*, 2001; Chaudry *et al.*, 1988; Munnecke *et al.*, 1974). En las referencias no se encontraron estudios sobre la degradación de PM con las especies encontradas en este estudio, pero es común que especies del grupo *Pseudomonas* tengan la capacidad de degradar PM (Chaudhry *et al.*, 1988; Ortíz-Hernández *et al.*, 2001; Rani y Lalithakumari, 1993; Chen, 2002).

7.13 Cinéticas de crecimiento y transformación de Cr (VI) y PM para las cepas puras seleccionadas

7.13.1 Reducción de Cr (VI) a Cr (III)

Se cuantificó el crecimiento de la cepa *Pseudomonas entomophila L48* por densidad óptica utilizando una concentración de Cr (VI) de 3.8 mM. Se realizó la regresión correspondiente para obtener la velocidad de crecimiento en la fase exponencial, obteniéndose los siguientes resultados:

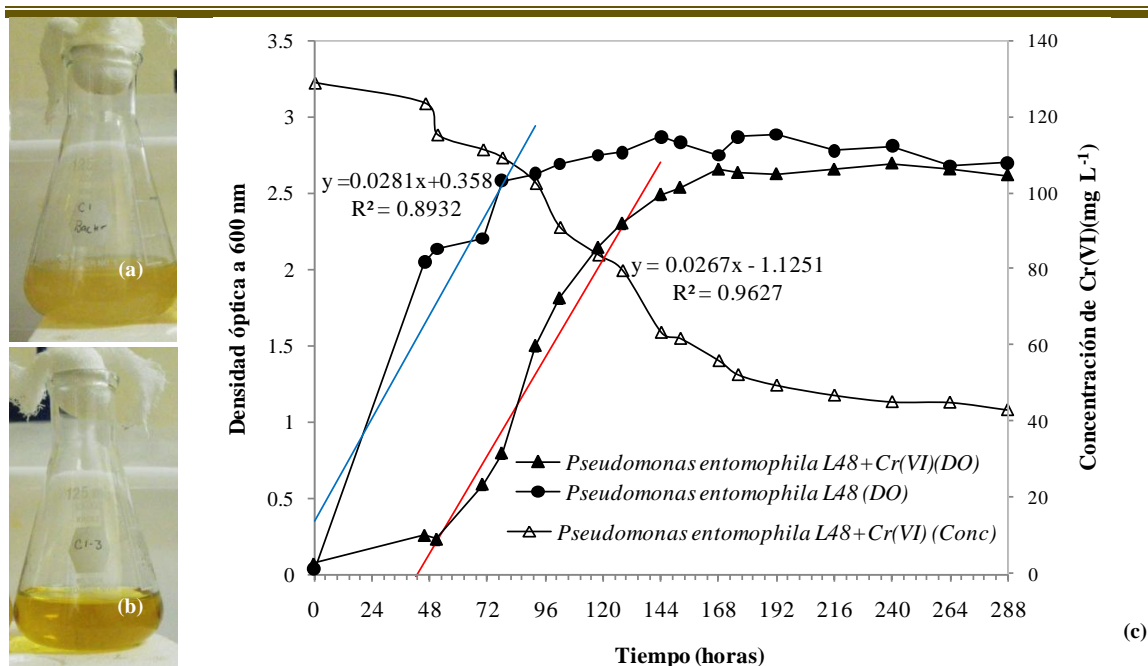


Figura 47. Diferencia en la turbidez de la cepa *Pseudomonas entomophila* L48 sin presencia de contaminante (a) y con contaminante (b), después de 48 horas de incubación. (c) La gráfica corresponde a la cinética de crecimiento de la cepa *Pseudomonas entomophila* L48 con y sin contaminante con su respectiva ecuación de velocidad de crecimiento en la fase exponencia, así como la concentración de Cr (VI) durante el experimento.

Para este caso, la cantidad de biomasa final no se vio fuertemente afectada por la presencia de contaminante en comparación con la biomasa generada sin presencia del mismo, contrario a lo que encuentran Srinath *et al.* (2002), donde existe una diferencia de aproximadamente 50% entre la biomasa máxima con y sin contaminante para las cepas *Bacillus megaterium* y *B. circulans*.

La presencia de Cr (VI) aumenta la fase Lag (etapa de adaptación al medio) de la cepa *Pseudomonas entomophila* L48 sembrada en el medio adicionado con Cr (VI), esta reacción esta directamente relacionada con la mayor concentración del contaminante en el medio.

En lo que concierne a la transformación de Cr (VI), algunos trabajos coinciden en una reducción de la concentración de Cr (VI) en el sobrenadante de entre 80-98%, con una fase estacionaria entre 24-48 h (Donmez y Kocberber 2004; Srinath *et al.* 2002), a diferencia de este estudio (Figura 47) en donde la fase estacionaria se inició a las 168 h y la reducción mayor de Cr (VI) para la cepa *Pseudomonas entomophila* L48 fue del 33.59% a los 12

días. Esto último puede atribuirse a las condiciones de cultivo, ya que a diferencia de los estudios mencionados que manejan temperaturas fisiológicas (alrededor de 38° C), en esta investigación se trabajó a temperatura ambiente (18-20° C). Es importante señalar que el medio de cultivo por sí mismo representó un medio abiótico de reducción de Cr (VI) del 17.21%, el cual fue sustraído del porcentaje de reducción de Cr (VI) de la cepa *Pseudomonas entomophila* L48.

Se cuantificó la cantidad total de Cr (Anexo 8) para evaluar la eficiencia total del sistema, y se recalculó que el porcentaje de reducción de Cr (VI) a Cr (III) por la especie *Pseudomonas entomophila* L48 utilizando CTS fue del 80.16%. Para evaluar los distintos tratamientos y la reducción de Cr es necesario considerar la distribución de especies de Cr en solución acuosa.

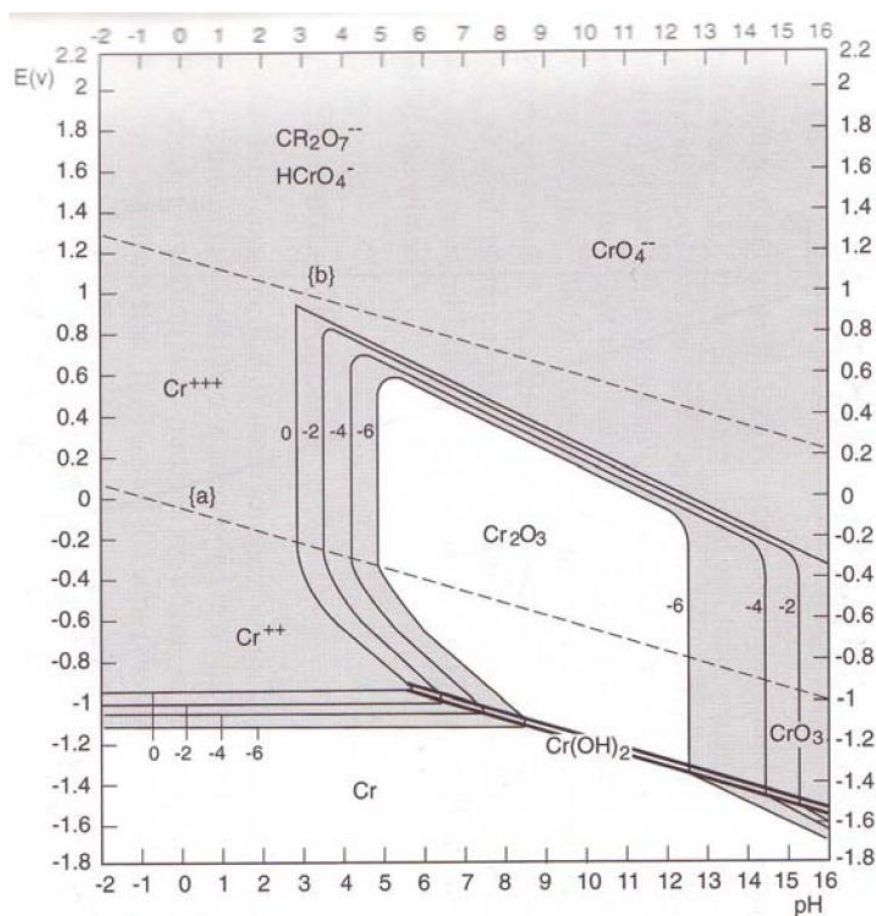


Figura 48. Diagrama de pH-pE para el Cr en agua. La concentración máxima de Cr soluble es 10^{-6} M.

Como se observa en el diagrama de distribución de especies del Cr (Figura 48), éste es muy inestable en solución acuosa, y se encuentra en formas de valencia distintas a 6^+ , de ahí que al entrar en contacto con el medio acuoso ocurre una disminución en la concentración de Cr (VI), sin embargo, el sistema medio de cultivo-bacteria, generó condiciones adecuadas para la reducción de Cr (VI) (Figura 49).

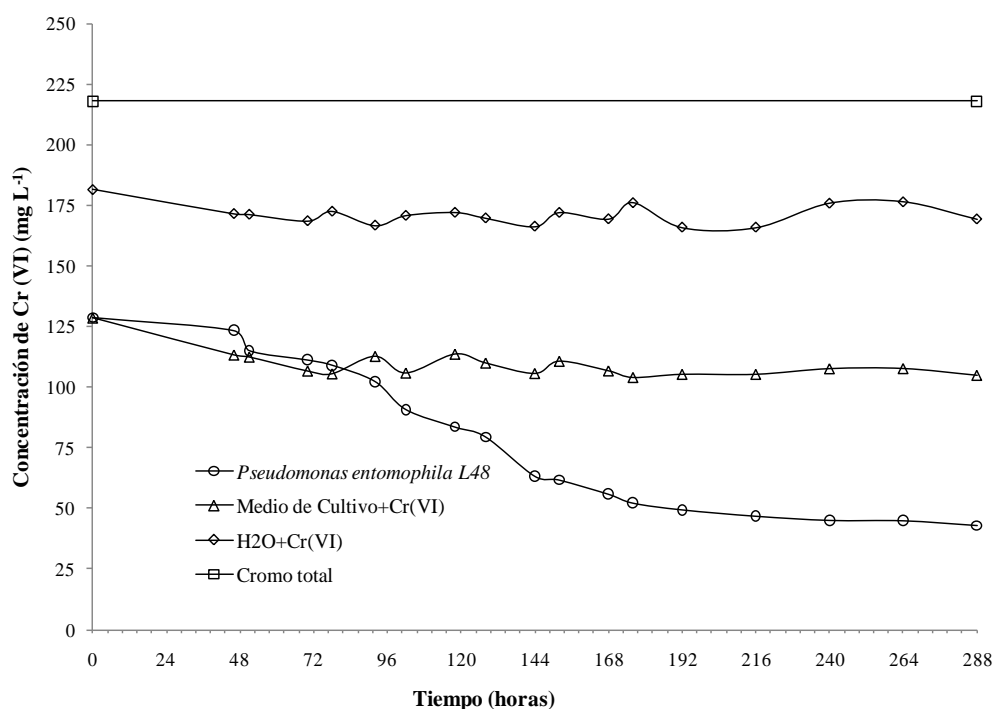
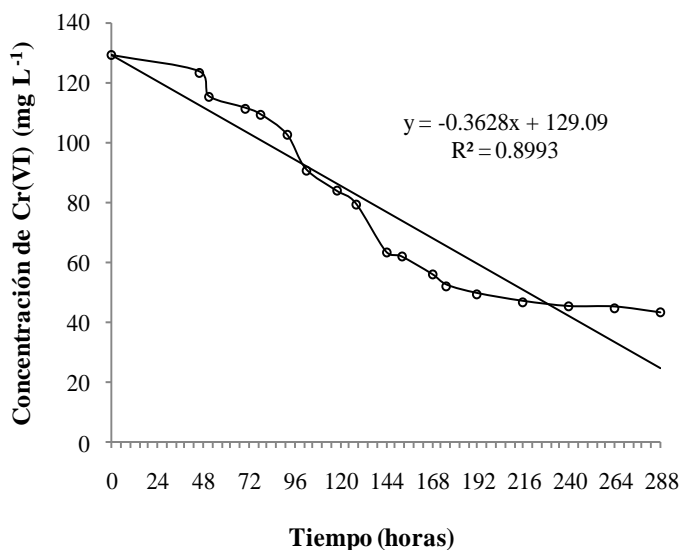


Figura 49. Relación entre Cr total y tratamientos evaluados.

La concentración de Cr (VI) se mantuvo estable en los sistemas: agua y medio de cultivo, antes de 72 h para ambos casos, esta variante debe considerarse al preparar los medios de cultivo, ya que esta acción podría aumentar la velocidad de transformación de Cr (VI) por las cepas al disminuir la concentración de Cr (VI) inicial que inhibe la velocidad de crecimiento en la fase exponencial, así como la disminución del tiempo de la fase Lag.



La reducción de Cr (VI) a Cr (III) por la cepa *Pseudomonas entomophila* L48, se ajustó a un modelo lineal, con una R^2 de 0.9. Es importante anotar que por tratarse de microorganismos, las condiciones físico-químicas del medio de cultivo influyeron en el comportamiento metabólico, por esta razón hubo, fluctuaciones en las concentraciones de Cr (VI).

Figura 50. Ecuación que representa el comportamiento de reducción de Cr (VI) a Cr (III).

Adicionalmente, se determinó si las células bacterianas eran capaces de acumular Cr en el cuerpo celular, para lo cual se cuantificó el Cr que después de un proceso de centrifugación se pierde del sistema (concentrándose en las células). Se encontró un valor de concentración negativo (-1.64 mg L^{-1} de Cr (III) con una desviación estándar de 2.62), por lo tanto, *Pseudomonas entomophila* L48 no bioacumuló como mecanismo de resistencia ante la presencia de Cr (VI) (Anexo 16 y Anexo 17).

7.13.2 Transformación de PM

Se cuantificó el crecimiento de la cepa *Comamonas testosteroni* B por densidad óptica, obteniéndose los siguientes resultados:

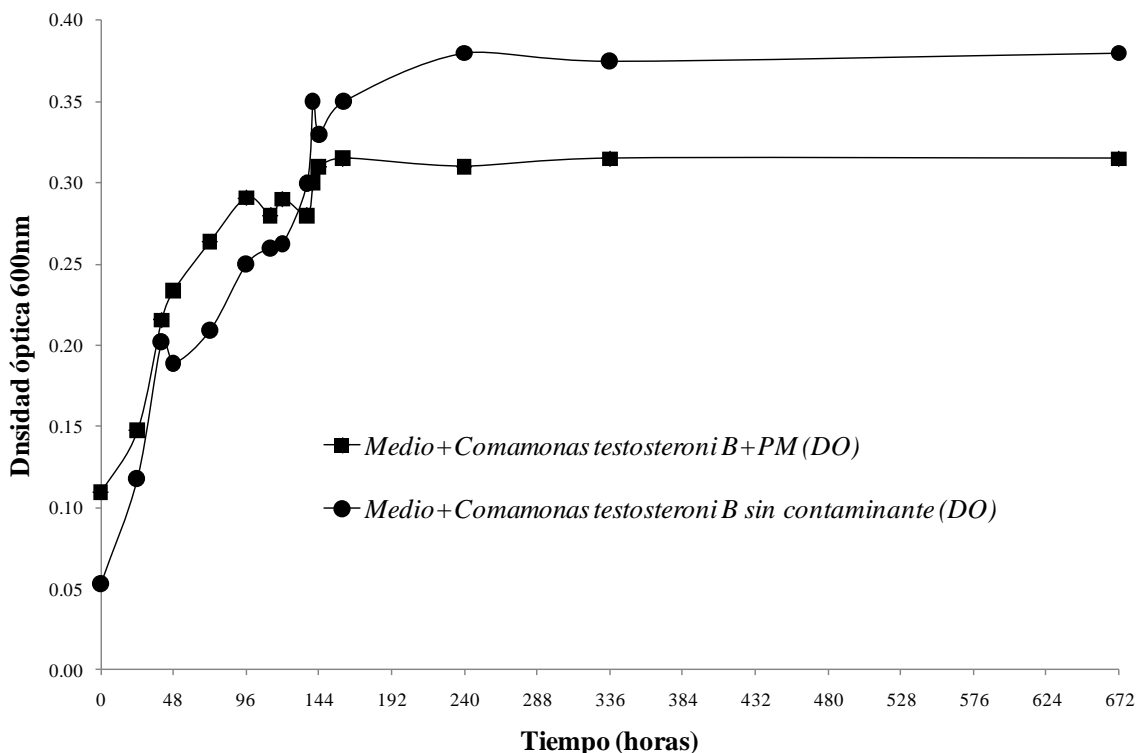


Figura 51. La gráfica corresponde a la cinética de crecimiento de la cepa *Comamonas testosteroni* B con y sin contaminante.

En la Figura 51 se observa una diferencia sostenida entre el crecimiento máximo de la cepa *Comamonas testosteroni* B con y sin contaminante, sin embargo, esta diferencia se debe a la turbidez que genera el contaminante al ser añadido, por lo tanto, la diferencia entre el crecimiento máximo con y sin contaminante no es significativo, esta afirmación se verificó con un conteo celular directo en la cámara de Neubauer con ambas muestras. No se encontraron referencias con datos comparativos entre la velocidad de crecimiento de cepas resistentes a PM con y sin contaminante.

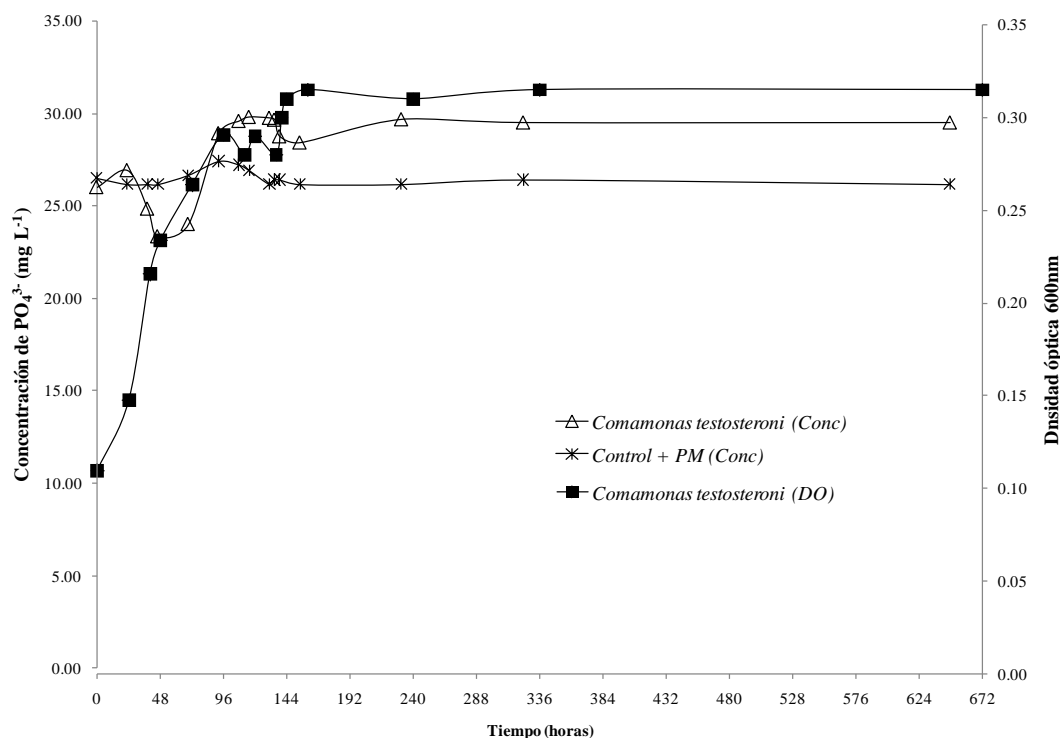


Figura 52. Cinética de liberación de PO_4^{3-} (mg L^{-1}), en *Comamonas testosteroni B*.

La transformación de PM fue poco eficiente ya que la diferencia de la concentración de PO_4^{3-} en el sobrenadante de la cepa *Comamonas testosteroni B* y el control sin presencia de biomasa fueron similares. Este resultado puede deberse al método de cuantificación indirecto utilizado para medir la cantidad de PM transformado, que presentó poca sensibilidad, además el medio en el cual fue preparado el inóculo aportó una cantidad importante de PO_4^{3-} , al inicio y durante el crecimiento de la cepa *Comamonas testosteroni B*. Al realizar la cinética de transformación de esta cepa se obtuvo un 6.32% de transformación, se corroboró este resultado repitiendo el experimento y obteniéndose la misma cantidad. Durante la selección de la cepa con mayor resistencia a PM, se eligió *Comamonas testosteroni B* con un porcentaje de transformación del 11.68%, esta diferencia de transformación puede deberse a la continua modificación metabólica que ocurre en las bacterias como sistema de adaptación.

8. CONCLUSIONES

Se identificaron por el método molecular 4 especies diferentes de bacterias resistentes a Cr (VI) y 5 resistentes a PM. Los porcentajes de similitud con especies ya identificadas fueron mayores al 96%. La mayor parte de las especies identificadas en éste estudio fueron inocuas (saprófitas y epífitas), únicamente *Klebsiella pneumoniae* representa un posible riesgo biológico.

Siete cepas Gram negativas con diferentes características morfológicas y bioquímicas fueron aisladas de sedimentos del río Lerma. Cinco de estas cepas son capaces de multiplicarse en concentraciones de hasta 9.6 mM de Cr (VI) y sobrevivir a concentraciones de hasta 19.2 mM, (*Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas fluorescens A*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas sp.* y *Pseudomonas entomophila L48*). Entre estas especies, *Pseudomonas entomophila L48* no ha sido reportada en la literatura como resistente a Cr (VI).

Considerando la concentración mínima inhibitoria en microorganismos heterotróficos para Cr (VI) (0.02 mM), las cepas aisladas resultaron todas resistentes y su CMI fue mayor que la reportada en otros trabajos similares.

Se detectó la reducción de Cr (VI) a Cr (III) por estas cepas, usando 3.8 mM de Cr (VI). La capacidad de transformación de cada cepa en orden descendente fue: *Pseudomonas entomophila L48* > *Pseudomonas sp.* > *Pseudomonas fluorescens A* > *Klebsiella pneumoniae* > *Pseudomonas fluorescens B* > *Comamonas testosteroni A*.

Se eligió la cepa *Pseudomonas entomophila L48* para determinar la cinética de transformación del Cr (VI). Con esta bacteria se obtuvo una reducción de Cr (VI) a Cr (III) del 33.59% a los 12 días. *Pseudomonas entomophila L48* no bioacumuló Cr (VI) como mecanismo de resistencia. Es importante señalar que el medio de cultivo por sí mismo representó un medio abiótico de reducción de Cr (VI) (17.21%).

Once cepas con diferentes porcentajes de transformación de PM fueron aisladas de sedimentos del río Lerma. Se identificaron seis especies de bacterias distintas, dos Gram positivas y tres Gram negativas. La capacidad de transformación en cada cepa en orden

descendente fue: *Comamonas testosteroni B* > *Comamonas testosteroni C* > *Achromobacter piechaudii B* > *Rhodococcus erythropolis* > *Achromobacter piechaudii A* > *Pseudomonas fluorescens C* > *Pseudomonas fluorescens D* > Cepa 10-1 ISI 2-0.3 mM > *Pseudomonas fluorescens E* > *Leifsonia xyli subsp. xyli* > *Pseudomonas fluorescens F*. No se encontraron estudios específicos sobre la degradación y resistencia a PM de las especies encontradas en este estudio.

La transformación de PM medida por el método indirecto de PO_4^{3-} fue baja, logrando una transformación máxima de 6.32% por la cepa *Comamonas testosteroni B* a los 14 días.

La cepa denominada 10-1 ISI 2-0.3 mM no pudo ser identificada, ya que la descripción morfológica no correspondió a la lista de especies relacionadas en el GeneBank, posiblemente se trate de una especie que aún no ha sido encontrada ni reportada en estudios previos.

La utilización del Kit API-20E fue útil en la determinación de algunas reacciones bioquímicas de las cepas, pero no resultó concluyente para la identificación de las bacterias encontradas en el presente estudio.

En el sitio identificado como colonia Isidro Fabela se aislaron la mayor variabilidad de especies para ambos contaminantes dentro del grupo de bacterias seleccionadas. En Tultepec se aislaron la mayor cantidad de bacterias degradadoras de Cr (VI) y PM.

Un total de 21 cepas resistentes a Cr (VI) y 43 cepas resistentes a PM, se mantienen a -80°C en glicerol (60%) para su aplicación en futuras investigaciones.

9. RECOMENDACIONES

- Realizar análisis bioquímicos de las cepas aisladas, para definir las rutas metabólicas de la resistencia y transformación de contaminantes.
- Realizar pruebas de patogenicidad en *Klebsiella pneumoniae* antes de la aplicación en sistemas de tratamiento.
- Realizar estudios moleculares de las cepas aisladas, que incluyan la identificación de los genes responsables de la resistencia y transformación de contaminantes. Plantear proyectos de ingeniería genética.
- Cuantificar la transformación de Cr (VI) y PM utilizando consorcios bacterianos aplicando diversas combinaciones de las cepas aisladas.
- Probar cepas aisladas con contaminantes análogos a los utilizados en este estudio (plaguicidas organofosforados y otros metales pesados).
- Aplicar consorcios y cultivos axénicos en sistemas de tratamiento como reactores biológicos o biofiltros.
- Probar la eficiencia de las cepas aisladas en tratamiento de aguas residuales.
- Probar diferentes concentraciones de contaminante para establecer la máxima eficiencia de remoción.
- Cuantificar la remoción de PM aplicando métodos directos como cromatografía de gases.
- Establecer un plan de manejo de lodos residuales contaminados con Cr una vez efectuado el tratamiento bacteriológico.

10.REFERENCIAS

1. Aguilar-Barajas, E., Ramírez-Díaz, M.I., Riveros-Rosas, H. y Cervantes, C. (2010). Heavy Metal Resistance in Pseudomonads en Pseudomonas. C. Biom. and lif. sci. Parte 3, pp. 255-282.
2. Aguilera, S., Aguilar, M. E., Chávez, M. P., López-Meza, J. E., Pedraza-Reyes, M., Campos-García, J. y Cervantes, C. (2004). Essential residues in the chromate transporter ChrA of *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microb. Let., 232, pp. 107–112.
3. Álvarez, A. H., Moreno-Sánchez, R. y Cervantes, C. (1999). Chromate efflux by means of the ChrA chromate resistance protein from *Pseudomonas aeruginosa*. J. of Bact., 181, pp. 7398–7400.
4. Anderl, J. N., M. J. Franklin y P. S. Stewart. (2000). Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. Antimicrob. Agen. Chemother., 44, pp. 1818–1824.
5. Andrews, G. (1995). Pesticides residues in Food/ Technologies for detection. Technomic Publishing co., Inc. New York.
6. APHA. American Public Health Association. (1998). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (20va edición). American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation. Washington, DC., USA.
7. Arzate, O. O., Vázquez, O. A., y Moreno, J. A. (1992). Identificación cromatográfica de compuestos orgánicos en la fracción líquida de lodos residuales. IV Congreso Técnico Científico. ININ-SUTIN. México. pp. 09-15.
8. Ávila, P. P., Balcázar, M., Zarazúa, G. O., Barceló, I. Q. y Díaz, C. D. (1999). Heavy metals concentrations in water and bottom sediments of a mexican reservoir. Sci. Tot. Env., 234, pp. 185-196.
9. Avison, M. B., Underwood, S., Okazaki, A. Walsh T. R., Bennett, P. M. (2004). Analysis of AmpC β -lactamase expression and sequence in biochemically atypical ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae from paediatric patients. J. of Ant. Chemother., (53) 4, pp. 584-591.

10. Bader, J. L., Gonzalez, G., Goodell, P. C., Ali, A. S. y Pillai, S. D. (1999). Chromium-resistant bacterial populations from a site heavily contaminated with hexavalent chromium. Wat., A., and S. pol., 109, pp. 263-779.
11. Beveridge, T. J. (1978). The response of cell walls of *Bacillus subtilis* to metals and to electron-microscopic stains. Can. J. of Microb., (2) 24, pp. 89–104.
12. Blake II, R. C., Choate, D. M. y Bardhan, S. (1993). Chemical transformation of toxic metals by a *Pseudomonas* strain from a toxic waste site. Env. Tox. and Chem., 12, pp. 1365–1376.
13. Bopp, L. H. y Ehrlich, H. L. (1988). Chromate resistance and reduction in *Pseudomonas fluorescens* strain LB300. Arch. of Microb., 150, pp. 426-431.
14. Bopp, L. H., Chakrabarty, A. M. y Ehrlich, H. L. (1983). Chromate resistance plasmid in *Pseudomonas fluorescens*. J. of Bacter., 155, pp. 1105–1109.
15. Brenner D. J., Krieg N. R. y Staley J. T. (2008). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2da ed. Springer. Michigan, EUA. pp. 1106
16. Camargo, F. A. O., Okeke, B. C., Bento, F. M. y Frankenberger, W. T. (2003). In vitro reduction of hexavalent chromium by a cell-free extract of *Bacillus sp.* ES 29 stimulated by Cu^{2+} . App. Microb. and Biotech., 62, pp. 569–573.
17. Carballeira, N. M., Miranda, C., Lozano, C. M., Nechev, J. T. K., Ivanova, A., Ilieva, M., Tzyetkova, I. y Stefanov, K. (2001). Characterization of Novel Methyl-Branched Chain Fatty Acids from a Halophilic *Bacillus* Species. J. Nat. Prod., 64, pp.256-259.
18. Carballeira, N. M., Pagán, M., Shalabi, F., Nechev, J. T., Lahtchev, K., Ivanova, A. y Stefanov, K. (2000). Two Novel Iso-Branched Octadecenoic Acids from a *Micrococcus* Species. J. Nat. Prod., 63, pp.1573-1575.
19. Carreño, M. (2008). Tesis de Doctorado en Ingeniería: Presencia y distribución de los compuestos orgánicos persistentes en agua y sedimento del curso alto del río Lerma. UAEM-CIRA .
20. Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H.,

-
- Torres-Guzmán, J.C. y Moreno-Sanchez, R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. FEMS Microb. Rev., 25, pp. 335–347.
21. Cervantes, C., Silver, S. (1992). Plasmid chromate resistance and chromate reduction. Plasm., 27, pp. 65–71.
22. Chaudhry, G. R., Ali, A. N. y Wheeler, W. B. (1988). Isolation of a methyl parathion-degrading *Pseudomonas sp.* that possesses ADN homologous to the opd gene from a *Flavobacterium sp.* Appl. Environ. Microb., 54, pp. 288–293.
23. Chen, Y., Zhang, X., Liu, H., Wang, Y. y Xia, X. (2002). Study on *Pseudomonas sp.* WBC-3 capable of complete degradation of methylparathion. Wei Sheng Wu Xue Bao, 42, pp. 490–497.
24. Cheung, K. H. y Gu, J. D. (2007). Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: a review. Int. Biod. and Biod., 59, pp. 8-15.
25. Cochran, W. G. (1977). Sampling Techniques. Wiley & Sons. Massachusetts.
26. Coelho, J.R.C.F., Sousa, S., Santos, L., Santos, L.A., Almeida, A., Gomes, C.M.N. y Cunha, A. (2010). PAH Degrading Bacteria in an Estuarine System. Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry — Biological Responses to Contaminants, Eds., N. Hamamura, S. Suzuki, S. Mendo, C. M. Barroso, H. Iwata and S. Tanabe, pp. 77–87.
27. Colombo, C., Khalil, F., Amac, M., Horht, C., y Catoggio, A. (1990). The casual of the word toxic. Env. Sci. and Tech., 24, pp. 498-505.
28. Crossland, N. O., Bennett, D., y Wolff, C. J. M. (1986). Evaluation of models used to assess the fate of chemicals in aquatics sytems. Pesti. Sci., 17, pp. 297-304.
29. De Baere, T., Wauters, G., Kämpfer, P., Labit, C., Claeys, G., Verschraegen, G., Vaneechoutte, M. (2002). Isolation of *Buttiauxella gaviniae* from a Spinal Cord Patient with Urinary Bladder Pathology. J. of Clin. Microb., (40) 10, pp. 3867–3870.
30. De la Vega-Salazar, M. Y., Martínez-Tabche, L., Macías-García, C. y Díaz-Prado, E. (1999). Methyl Parathion Impact on Water Sediment and Benthic Macroinvertebrates from

- the Ignacio Ramirez Dam in Mexico. Tox. Env. Chem., 71, pp. 81-93.
31. DOF. Diario Oficial de la Federación. (2006). Resolución final del examen de vigencia de la cuota compensatoria impuesta a las importaciones de PM, mercancía clasificada en las fracciones arancelarias 2920.10.02 y 3808.10.99 de la Tarifa de la Ley de los Impuestos Generales de Importación y de Exportación, originarias del Reino de Dinamarca, independientemente del país de procedencia. 11 de mayo de 2006.
 32. Donmez, G. y Kocberber, N. (2004). Isolation of hexavalent chromium resistant bacteria from industrial saline effluents and their ability of bioaccumulation. Enz. Microb. Tech., 36, pp. 700-705.
 33. Dood, C. C., Sanderson, M. W., Sargeant, J. M., Nagaraja, T. G., Oberst, R. D., Smith, R. A., Griffin, D. D. (2003). Prevalence of *Escherichia coli* O157 in Cattle Feeds in Midwestern Feedlots. Appl. and Env. Microb., (69) 9, pp. 5243-5247.
 34. Dumas, D. P., Caldwell, S. R., Wild, J. R. y Raushel, F. M. (1989). Purification and properties of the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. J. Biol. Chem., 264, pp. 19659–19665.
 35. Ehrlich, H. L. (1986). Interactions of Heavy Metals and Microorganisms. En Carlisle, D., (editor), Mineral Exploration: Biological Systems and Organic Matter, Rubey Volume V. Prentice-Hall. Englewood Cliffs. pp. 221-237.
 36. EPA. Environmental Protection Agency. (1993). Environmental Health Criteria 145: methyl parathion. World Health Organization. Geneva, pp. 151.
 37. EPA. Environmental Protection Agency. (2007). The Clean Air Act amendments of 1990 list of hazardous air pollutants. Clean Air Act. U.S. United States Code. 42 USC 7412. URL: <http://www.epa.gov/ttn/atw/orig189.html>. Consultado en abril 24, 2009.
 38. EPA. Environmental Protection Agency. (2008). Designation of hazardous substances. U.S. Code of Federal Regulations. 40 CFR 116.4. URL: <http://www.epa.gov/lawsregs/search/40cfr.html>. Consultado en abril 24, 2009.
 39. Fall, C., Hinojosa-Peña, A., Carreño-de-León, M. C. (2007). Design of a monitoring

- network and assessment of the pollution on the Lerma river and its tributaries by wastewaters disposal. Sci. of the Tot. Env., 373, pp. 208-219.
40. Fang-Bo, Y., Biao, S., Shun-Peng, L. (2006). Isolation and Characterization of *Pseudomonas* sp. Strain ONBA-17 Degrading o-Nitriobenzaldehyde. Cur. Microb. (53), pp. 457-461.
 41. FDA. Food and Drug Administration. (2007a). Beverages. Bottled water. U.S.. Code of Federal Regulations. 21 CFR 165.110. URL: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm>. Consultado en abril 24, 2009.
 42. FDA. Food and Drug Administration. (2008). EAFUS: A food additive database. U.S. URL: <http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/eafus.html>. Consultado en abril 24, 2009.
 43. Filali, B.K., Taoufik, J., Zeroual, Y., Dzairi, F.A.Z., Talbi, M. y Blaghen, M. (1999). Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. Curr. Microb., 41, pp. 51-156.
 44. Friedrich, A. W., Köck, R., Bielaszewska, M., Zhang, W., Karch, H. y Mathys, W. (2005). Distribution of the Urease Gene Cluster among and Urease Activities of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 Isolates from Humans. J. of Clin. Microbiol., (43) 2, pp. 546-550.
 45. Frioni, L. (1999). *Procesos microbianos*. Editorial de la fundación universidad nacional del río cuarto Argentina. Río cuarto.
 46. Gadd, G. M. y White, C. (1993). Microbial treatment of metal pollution—a working biotechnology. Tren. in Biotech., (8) 11, 353–359.
 47. GEM, Gobierno del Estado de México. (1997). Atlas ecológico de la cuenca hidrográfica del río Lerma. En Tomo III: Ecosistemas reproductivos (p. 250). Comisión Coordinadora para la recuperación Ecológica de la Cuenca Alta del Río Lerma. Toluca, Estado de México.
 48. Gibb, H. J., Lees, P. S., Pinsky, P. F. y Rooney, B. C. (2000a). Lung cancer among workers in chromium chemical production. Amer. J. of Ind. Med., 38, pp. 115–126.

49. Gibb, H. J., Lees, P. S., Pinsky, P. F. y Rooney, B. C. (2000b). Clinical findings of irritation among chromium chemical production workers. Amer. J. of Ind. Med., **38**, pp.127–131.
50. Gieg, L., Kolhatkar, R., Mcinerney, M. J., Tanner, R., Harris, S. J., Sublette, K. y Suflita, J. (1999). Intrinsic Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons in a Gas Condensate-contaminated Aquifer. Environ. Sci. Technol., **33**, pp. 2550-2560.
51. González, F. A. V. (2006). Tesis para obtener el título de Biólogo: Estudio de plaguicidas organoclorados en los cuerpos acuáticos del área natural protegida ciénegas del Lerma, Estado de México, UNAM.
52. Gopalan, R. y Veeramani, H. (1994). Studies on microbial chromate reduction by *Pseudomonas* sp, in aerobic continuous suspended growth cultures. Biotech. and Bioeng., **43**, pp. 471–476.
53. Grisez, L., Ceusters, R. y Ollevier, F. (1991). The use of API 20E for the identification of *Vibrio anguillarum* and *V. ordalii*. J. of F. Dis., **14**, pp. 359–365.
54. Guha, H., Jayachandran, K. y Maurrasse, F. (2001). Kinetics of chromium (VI) reduction by a type strain *Shewanella alga* under different growth conditions. Env. Pol., **115**, pp. 209–218.
55. Guinebretiere, M-H., Berge, O., Normand, P. Morris, C., Carlin, F., Nguyen-The, C. (2001). Identification of Bacteria in Pasteurized Zucchini Pureés Stored at Different Temperatures and Comparison with Those Found in Other Pasteurized Vegetable Purées. Appl. and Env. Microb., (67) **10**, pp. 4520–4530.
56. Hilyard, E. J., Jones, J. M., Spargo, B. J., & Hill, R. T. (2008). Enrichment, isolation, and Phylogenetic Identification of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from Elizabeth River Sediments. Appl. and Env. Microb., **74** (4), pp. 1176-1182
57. Holm, H. W., Kollig, H. P., y Payne, W. R. Jr. (1983). Fate of methyl parathion in aquatic channel microcosms. Env. Tox. Chem., **2**, pp. 169-176.
58. Horitsu, H., S. Futo, K. Ozawa y K. Kawai. (1983). Comparison of characteristics of

- hexavalent chromium-tolerant bacterium, *Pseudomonas ambigua* G-1, and its hexavalent chromium-sensitive mutant. Agric. Biol. Chem., 47, pp. 2907-2908.
59. IARC. Agency for Research on Cancer. (2008). Agents reviewed by the IARC monographs: Volumes 1-99. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>. Consultado en abril 24, 2008.
60. Ishibashi, Y., Cervantes, C. y Silver, S. (1990). Chromium reduction in *Pseudomonas putida*. Appl. and Env. Microb., 56, pp. 2268–2270.
61. Kwak, Y. H., Lee, D. S. y Kim, H. B. (2003). *Vibrio harveyi* nitroreductase is also a chromate reductase. Appl. and Env. Microb., 69, 4390–4395.
62. Leahy, J. G., & Colwell, R. R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microb. Rev., 54 (3), pp. 305-315.
63. Lebedeva, E. V. y N. N. Lyalikova. (1979). Reduction of crocoite by *Pseudomonas chromatophila* sp. nov. Mik., 48, pp. 517-522.
64. Leica Microsystems Inc. (2000). La teoría del microscopio. Educational and Analytical Division. New York, USA.
65. Liassine, N., Frei, R., Jan, I. y Auckenthaler, R. (1998). Characterization of Glycopeptide-Resistant Enterococci from a Swiss Hospital. J. of Clin., (36) 7, pp. 1853-1858.
66. Lima, A. J. (2007). Tesis de licenciatura en Biología: Evaluación bacteriológica de la calidad del agua del Río Lerma, México. Universidad Nacional Autónoma de México: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
67. López, C., Obiols, J. y Subías, P. (1998). Plaguicidas agrícolas y salud. Plaguicidas, aspectos ambientales, analíticos y toxicológicos. Ed. I. Morell y Candela. pp. 273-295.
68. Lowe, L. Kristine, Fliflet, E. R., LY, T., Litle, J.B., Jones-Meehan, J. (2002). Chromium tolerant microbial communities from the Chesapeake bay watershed. Virg. J. of Sci., (53), 3, pp. 141-156.
69. Magrinya, N., Bou, R., Tres, A., Rius, N., Codony, R. y Guardiola, F. (2009). Effect of

- Tocopherol Extract, *Staphylococcus carnosus* Culture, and Celery Concentrate Addition on Quality Parameters of Organic and Conventional Dry-Cured Sausages J. Agric. Food Chem., *57*, pp. 8963–8972.
70. MacDonnel, M. T., Singleton, F. L. y Hood, M. A. (1982). Diluent composition for use of API 20E in characterizing marine and estuarine bacteria. Appl. and Env. Microb., *44*, pp. 423–427.
71. Mazierski, J. (1994). Effect of chromium (CrVI) on the growth rate of denitrifying bacteria. Wat. Resea., *28*, pp. 1981–1985.
72. McGrath, S. P. y Smith, S. (1990). Chromium and Nickel. en: Alloway, B. J. *Heavy Metals in Soils*. John Wiley & Sons. New York. pp. 125–147.
73. McLean, J. S., Beveridge, T. J. y Phipps, D. (2000). Isolation and characterization of a chromium-reducing bacterium from a chromated copper arsenate-contaminated site. Env. Microb., *2*, pp. 611–619.
74. McLellan, L. S., Daniels, A. D., Salmore, A. K. (2001). Clonal Populations of Thermotolerant *Enterobacteriaceae* in Recreational Water and Their Potential Interference with Fecal *Escherichia coli* Counts. App. and Env. Microb., (67) *10*, pp. 4934-4938.
75. Melnikow, N.N. (1971). Chemistry of pesticides. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg, New York.
76. Mulbry, W. W., Karns, J. S., Kearney, P. C., Nelson, J. O., McDaniel, C. S. y Wild, J. R. (1986). Identification of a plasmid-borne parathion hydrolase gene from *Flavobacterium* sp. by southern hybridization with *opd* from *Pseudomonas diminuta*. Appl. Environ. Microb., *51*, pp. 926–930.
77. Munnecke, D. M. y Hsieh, D. P. (1974). Microbial decontamination of parathion and p-nitrophenol in aqueous media. Appl. Microb., *28*, pp. 212–217.
78. NCBI. National Center for Biotechnology Information. (2010). Blastn suite. URL: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome

Consultado en agosto 10, 2010.

79. Nies, D. H. y Silver, S. (1989). Plasmid-determined inducible efflux is responsible for resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. J. of Bact., 171, pp. 896–900.
80. Ohta, N., Galsworthy, P. R., Pardee, A. B. (1971). Genetics of sulfate transport by *Salmonella typhimurium*. J. of Bacter., 105, pp. 1053–1062.
81. Ohtake, H. y Silver, S. (1994). Bacterial Detoxification of Toxic Chromate, en Chaudry, G. R. (editor). *Biological Degradation and Bioremediation of Toxic Chemicals*. Dioscorides Press, Portland, pp. 403–415.
82. Ohtake, H., Cervantes, C., y Silver, S. (1987). Decreased chromate uptake in *Pseudomonas fluorescens* carrying a chromate resistance plasmid. J. of Bacter., 169, pp. 3853-3856.
83. Oke, I. A., Otun, J. A., Okuofu, C. A. y Olarinoye, N. O. (2006). Characteristics of Tanning Industries in Nigeria for Aquatic Animals and Plants. Resear. J. of Agric. and Biol. Scien., 2 (5), pp.209-217.
84. Ortíz-Hernández, M. L., Monterrosas- Brisson, M., Yañez-Ocampo, G. y Sanchez-Salinas, E. (2001). Biodegradation of methyl-parathion by bacteria isolated of agricultural soil. Rev. Int. Cont. Amb., 17 (3), pp.147-155.
85. Pakala, S. B., Gorla, P., Pinjari A. B., Krovidi, R. K., Baru, R., Yanamandra, M., Merrick, M. y Siddavattam, D. (2006). Biodegradation of methyl parathion and p-nitrophenol: evidence for the presence of a p-nitrophenol 2-hydroxylase in a Gram-negative *Serratia sp.* strain DS001. Env. Biotech. Springer-Verlag. DOI 10.1007/s00253-006-0595-z.
86. Parameswari, E., Lakshmanan, A. y Thilagavathi, T. (2009). Chromate Resistance and Reduction by Bacterial Isolates. Aust. J. of Bas. and Appl. Sci., (2) 3, pp. 1363-1368.
87. Park, C. H., Keyhan, M., Wielinga, B., Fendorf, S. y Matin, A. (2000). Purification to homogeneity and characterization of a novel *Pseudomonas putida* chromate reductase. Appl. and Env. Microb., 66, pp. 1788–1795.
88. Peng, J. F., Jian-feng, P., Yong-hui, S., Xiao-yu, C. y Guang-lei, Q. (2008). Review: The

-
- remediation of heavy metals contaminated sediment. J. Haz. Mat., 161, pp. 633-640.
89. Pesti, M., Gazdag, Z. y Belagyi, J. (2000). In vivo interaction of trivalent chromium with yeast plasma membrane as revealed by EPR spectroscopy. FEMS Microb. Let., 182, pp. 375–380.
90. Popovic, N. T., Coz-Rakovac, R. y Strunjak-Perovic, I. (2007). Commercial phenotypic test (API 20E) in diagnosis of fish bacteria: a review. Veterinarni Medicina., 52 (2), pp.49-53.
91. Qiu, X., Zhonga, Q., Li, M., Bai, W. y Li, B. (2007). Biodegradation of p-nitrophenol by methyl parathion-degrading *Ochrobactrum sp. B2*. Int. Biodet. and Biodeg., 59, pp. 297–301.
92. Rani, N. L. y Lalithakumari, D. (1994). Degradation of methyl parathion by *Pseudomonas putida*. Can. J. Microbiol., 40, pp. 1000–1006.
93. Rodicio, M. del R. y Mendoza, M. del C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Enferm, infecc. Microbiol. Clin., 22 (4), pp. 238-245.
94. Rodriguez, S., y Ávila, P. P. (1997). Stock of immobilized metals in "José Antonio Alzate" dam mud sediment samples in the State of Mexico. Radioanal, Nuclear Chemistry, 221, pp. 231-234.
95. Romanenko, V. I. y Korenkov, V. N. (1977). A pure culture of bacterial cells assimilating chromates and bichromates as hydrogen acceptors when grown under anaerobic conditions. Mikrob., 46, pp. 414–417
96. Santos, Y. Romalde J. L., Bandin, I., Magarinos B., Nuñez, S., Barja J. L. y Toranzo, A. E. (1993). Usefulness of the API 20E system for the identification of bacterial fish pathogens. Aqua., 116, pp. 111–120.
97. Saxena, D. K., Murthy, R. C., Jain, V. K. y Chandra, S. V. (1990). Fetoplacental-maternal uptake of hexavalent chromium administered orally in rats and mice. Bull. of Env. Cont. and Tox., 45, pp. 430–435.
98. SE. Secretaría de Ecología. (2000). Programa institucional de mediano plazo de la

Secretaría de Ecología 2000-2005. Toluca Estado de México.

99. Serebriiskaya, T. S., A. A. Lenets, I. V. Goldenkova, N. S. Kobets and E. S. Piruzian (1999): Identification of nah-1 genes of the *Pseudomonas putida* naphthalene-degrading NPL-41 plasmid operon. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.*, 4, pp.33–36.
100. Shakoori, A. R., Tahseen, S. y Haq, R. U. (1999). Chromium-tolerant bacteria isolated from industrial effluents and their use in detoxification of hexavalent chromium. *F. Microb.*, 44, pp. 50–54.
101. Sharma, P.K., Balkwill, D.L., Frenkel A, y Vairavamurthy, M.A. (2000). A new *Klebsiella planticola* strain (*Cd-1*) grows anaerobically at high cadmium concentrations and precipitates cadmium sulfide. *Appl Environ Microbiol.*, 66 (7), pp. 3083–3087.
102. Shen, H. y Wang, Y. T. (1994). Biological reduction of chromium by *E. coli*. *J. of Env. Eng.*, 120, pp. 560–572.
103. Shi, W., Becker, J., Bischoff, M., Turco, R. F. y Konopka, A. E. (2002). Association of microbial community composition and activity with lead, chromium, and hydrocarbon contamination. *Appl. and Env. Microb.*, 68, pp. 3859–3866.
104. Silva, J., Gatica, R., Aguilar, C., Becerra, Zita, Garza-Ramos, U., Velázquez, M., Miranda, G., Leños, B., Solórzano, F. y Echániz, G. (2001). Outbreak of Infection with Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Mexican Hospital. *J. of Clin. Microbiol.*, 39, pp. 3193-3196.
105. Silver, S., Schottel, J. y Weiss, A. (2001). Bacterial resistance to toxic metals determined by extrachromosomal R factors. *Int. Biodet. and Biodeg.*, 48, pp. 263–281.
106. Srinath, T., Verma, T. P., Ramteke, W. y Garg, S. K. (2002). Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. *Chem. (Pergamon)*, 48, pp. 427-435.
107. Sultana, N., Saeed, A.M., y Afzal, M. (2003). Synthesis and antibacterial Activity of cephadrine metal complexes: complexes with magnesium, calcium, chromium and manganese. *Pak. J. of Pharm. Sci.* (16)1, pp.59-72.
108. Summers, A. O. y G. A. Jacoby. (1978). Plasmid-determined resistance to boron and

- chromium compounds in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agen. Chem., 13, pp. 637-640.
109. Suzuki, T., Miyata, N., Horitsu, H., Kawai, K., Takamizawa, K., Tai, Y. y Okazaki, M. (1992). NAD(P)H-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. of Bact., 174, pp. 5340–5345.
110. Tallon, P., Magajna, B., Lofranco, C. y Leunng, T. K. (2005). Microbial Indicators of Faecal Contamination in Water: A Current Perspective. J. Wat. Air, and S. Poll., 166, pp. 139-166.
111. Tchobanoglous, G., Burton, F. L. y Stensel, H. D. (2003). *Wastewater Engineering Treatment and Reuse*. 4ta Edición. McGraw-Hill. Illinois.
112. Tejeda, S. V. (2006). Tesis de Maestría en Ecología: Distribución espacial y temporal de los metales Ti, Mn, Fe, Cu, Zn y Pb en sedimentos del curso alto del río Lerma. Toluca, Estado de México, México: Universidad Autónoma del Estado de Mexico, Facultad de Química.
113. Tejeda, S. V. (2006). Tesis de Maestría en Ecología: Distribución espacial y temporal de los metales Ti, Mn, Fe, Cu, Zn y Pb en sedimentos del curso alto del río Lerma. Toluca, Estado de México, México: Universidad Autónoma del Estado de Mexico, Facultad de Química.
114. Theofanis, Z. U., Astrid, S., Lidia, G. y Calmano, W. G. (2001). Contaminants in sediments: remobilisation and demobilization. Sci. Tot. Env., 266, pp. 195-202.
115. EPA. Environmental Protection Agency. (2008). Designation of hazardous substances. U.S. Code of Federal Regulations. 40 CFR 116.4. URL: <http://www.epa.gov/lawsregs/search/40cfr.html>. Consultado en abril 24, 2009.
116. Thuý, H. L., Quynh, H. K., Phuong, A.V., Thi, H.P., Thu, H.N.T. (2003). Studying on microorganisms in heavy metal contaminated wastewater in the vùn chàng craft-settlement, nam ðĩnh. Institute of Biotechnology, NCST, URL:

- http://www.idm.gov.vn/nguon_luc/xuat_ban/2003/21/t72.htm. Consultado en septiembre 30, 2010.
117. Turpeinen, R., Kairesalo, T. y Haggblom, M. M. (2004). Microbial community structure and activity in arsenic-, chromium- and coppercontaminated soils. FEMS Microb. Ecol., 47, pp. 39–50.
118. Valls, M., Atrian, S., Lorenzo, V. y Fernández, L. A. (2000). Engineering a mouse metallothionein on the cell surface of *Ralsonia eutropha* CH34 for immobilization of heavy metals in soil. Nat. Biotech., 28, pp. 661–665.
119. Vaneechoutte, M., Kampfer, P., Baere, T. D., Falsen, E. y Verschraegen, G. (2004). *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralsonia* [Pseudomonas] *syzygii* comb. nov. Int. J. of Syst. and Evol. Microb., 54, pp. 317–327.
120. Vidali, M. (2001). Bioremediation. An overview. Pure appl. Chem , 73 (7), 1163-1172.
121. Volesky, B. (1990). Biosorption of Heavy Metals. CRC press. Boca Raton. Florida.
122. Wang, P. C, Mori, T., Komori, K., Sasatsu, M., Toda, K. y Ohtake, H. (1989). Isolation and characterization of an *Enterobacter cloacae* strain that reduces hexavalent chromium under anaerobic conditions. Appli. and Env. Microb., 55, pp. 1665-1669.
123. Wang, Y. T. y Shen, H. (1995). Bacterial reduction of hexavalent chromium. J. of Ind. Microb., 14, pp. 159–163.
124. Wang, Y.T. y Xiao, C. (1995). Factors affecting hexavalent chromium reduction in pure cultures of bacteria. W. Resea., 29, pp. 2467–2474.
125. WHO. World Health Organization. (1986). Environmental Health Criteria, 63: Organophosphorus insecticides: a general introduction. Geneva, pp. 181.
126. WHO. World Health Organization. (2000). Air quality guidelines. 2nd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization. URL: http://www.euro.who.int/document/aicq/6_4chromium.pdf. Consultado en mayo 14, 2008.

127. WHO. World Health Organization. (2004). Guidelines for drinking-water quality. Vol. 1. Recommendations. 3ra ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization. URL: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3/en. Consultado en marzo 08, 2006.
128. Ying-Fei, M., Yun, Z., Jia-Yue, Z., Dong-Wei, C., Yongqian, Z., Huajun, Z., Sheng-Yue, W., Cheng-Ying, J., Guo-Ping, Z. y Shuang-Jiang, L. (2009). The Complete Genome of *Escherichia coli* O157:H7 Reveals Its Genetic Adaptations to Changing Environments. Appl. and Env. Microb., (75) 21, pp. 6812-6819.
129. Zarazúa, G. O. (2008). Tesis de Doctorado en Ingeniería: Evaluación de las contribuciones naturales y antropogénicas de los metales pesados Cr, Mn, Fe, Cu, Zn y Pb y su distribución en el agua y sedimento en el curso alto del Río Lerma. ININ, CIRA-UAEM.
130. Zhongli, C., Shunpeng, L. y Guoping, F. (2001). Isolation of methyl parathion-degrading strain M6 and cloning of the methyl parathion hydrolase gene. Appl. Environ. Microb., 67, pp. 4922–4925.
131. Zhou, J., Xia, B., Treves, D. S., Wu, L. Y., Marsh, T. L., O'Neill, R.V., Palumbo, A.V. y Tiedje, J.M. (2002). Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. App. and Env. Microb., 68, pp. 326–334.
132. Zhu, L., Liu, X., Zheng, X., Bu, X. X., Zhao, G., Xie, C., Zhang, J., Li, N., Feng, E., Wang, J., Jiang, Y., Huang, P. y Wang, H. (2010). Global Analysis of a Plasmid-Cured *Shigella flexneri* Strain: New Insights into the Interaction between the Chromosome and a Virulence Plasmid. J. of Prot. Res., 9, pp. 843–854.
133. Zouboulis, A. I., Loukidou, M. X. y Matis, K. A. (2004). Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal polluted soils. Proc. Biochem., 39, pp. 909–16.

11.ANEXOS

Anexo 1. Bacterias encontradas normalmente en cuerpos de agua contaminados con aguas residuales municipales y resistentes a Cr (VI) y PM (según diversos autores).

| Cepas comunes en agua residual municipal | Cepas encontradas en la columna de agua del Río Lerma | Cr-resistentes | PM-resistentes |
|--|---|---|---|
| <i>Enterobacteriaceae</i> | <i>Enterococcus sp.</i> <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> | <i>Enterobacter cloacae</i> | <i>Enterobacter sakazakii</i> |
| <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella</i> | <i>E. coli</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>E. coli</i> ATCC 33456 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| <i>Streptococcus faecalis</i> , <i>S. faecalis sub. liquefaciens</i> , <i>S. faecalis sub. zymogenes</i> , <i>S. faecium</i> , <i>S. equinus</i> , <i>S. avium</i> <i>Citrobacter</i> | <i>Acinetobacter Iwoffii</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Hafnia alvei</i> <i>Pseudomonas aureginosa</i> | <i>Klebsiella aerogenes</i> | |
| | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas maltophilia</i> <i>O-2</i> , <i>Pseudomonas ambigua</i> , <i>Pseudomonas synxantha</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Staphylococcus cohnii</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus spp</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>TKW3</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus circulans</i> <i>Arthobacter viscosus</i> <i>Alcaligenes eutrophus</i> <i>Zooglea ramigera</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Bacillus sp. Pleisomonas sp.</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Citribacter freundii</i> , <i>Serratia sp.</i> , <i>Flavobacterium sp.</i> |

Anexo 2. Caracterización morfológica colonial de cada lote de las cepas resistentes a Cr (VI)

| ID cepas Cr (VI)- Resistentes LOTE 1 | Forma de la colonia | Elevación | Borde | Superficie | Color | Brillo |
|--|---------------------|-----------|-------|------------|-------|--------|
| 1 TUL 2-19.23 mM | NC | | | | | |
| 2 ISI 1-4.8 mM | 2 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 |
| 3 ISI 1-19.23 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 1 |
| 4 ISI 1-19.23 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 5 ISI 1-19.23 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 6 CTN 1-19.23 mM | 2 | 3 | 6 | 0 | 3 | 1 |
| 7 CTN 1-19.23 mM | 2 | 3 | 6 | 0 | 1 | 1 |
| 8 CTN 2-19.23 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 1 |
| 9 CTN 2-19.23 mM | NC | | | | | |
| 10 CTN 2-19.23 mM | 5 | 5 | 5 | 0 | 1 | 1 |
| 11 CTN 2-19.23 mM | 5 | 3 | 3 | 1 | 1 | 1 |
| 12 CTN 2-19.23 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 1 |
| 13 CTN 2-19.23 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 1 |
| 14 TUL 2 | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 1 |
| 15 TUL 2 a | 2 | 3 | 6 | 0 | 3 | 1 |
| 16 TUL 2 b | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 17 TUL 2 c | 4 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 |
| 18 TUL 2 d | 5 | 3 | 5 | 0 | 1 | 1 |
| 19 TUL 2 e | 3 | 3 | 3 | 0 | 3 | 1 |
| 20 ISI 1 | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 1 |
| 21 CTN 1 | 4 | 5 | 2 | 1 | 1 | 1 |

| ID cepas Cr (VI)- resistentes LOTE 2 | Forma de la colonia | Elevación | Borde | Superficie | Color | Brillo |
|--|---------------------|-----------|-------|------------|-------|--------|
| 1 ISI 1-4.8 mM | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 2 ISI 1-19.23 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 1 |
| 3 ISI 1-19.23 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 1 |
| 4 ISI 1-19.23 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 1 |
| 5 ISI 1-19.23 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 1 |
| 6 ISI 2-19.23 mM | 2 | 3 | 3 | 0 | 1 | 1 |
| 7 ISI 2-19.23 mM | 2 | 3 | 6 | 0 | 1 | 1 |
| 8 CTN 1-19.23 mM | 2 | 3 | 6 | 0 | 3 | 1 |
| 9 CTN 1-19.23 mM | 2 | 1 | 1 | 0 | 3 | 1 |
| 10 CTN 2-19.23 mM | 2 | 3 | 4 | 0 | 3 | 1 |
| 11CTN 2-19.23 mM | 2 | 1 | 5 | 1 | 1 | 1 |
| 12 CTN 2-19.23 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 1 |
| 13 CTN 2-19.23 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 1 |
| 14 TUL 2 | 2 | 1 | 5 | 1 | 1 | 1 |
| 15 TUL 2 a | 2 | 3 | 6 | 0 | 3 | 1 |
| 16 TUL 2 b | 2 | 3 | 5 | 1 | 1 | 1 |
| 17 TUL 2 c | 4 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 |
| 18 TUL 2 d | 2 | 3 | 5 | 0 | 1 | 0 |
| 19 TUL 2 e | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 1 |
| 20 ISI 1 | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 1 |
| 21 CTN 1 | 1 | 1 | 4 | 1 | 1 | 1 |

| ID cepas Cr (VI)- Resistentes LOTE 3 | Forma de la colonia | Elevación | Borde | Superficie | Color | Brillo |
|--|---------------------|-----------|-------|------------|-------|--------|
| 1 ISI 1-4.8 mM | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 2 ISI 1-19.23 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 0 |
| 3 ISI 1-19.23 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 0 |
| 4 ISI 1-19.23 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 0 |
| 5 ISI 1-19.23 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 0 |
| 6 ISI 2-19.23 mM | 2 | 3 | 6 | 0 | 3 | 0 |
| 7 ISI 2-19.23 mM | 2 | 3 | 6 | 0 | 1 | 0 |
| 8 CTN 1-19.23 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 0 |
| 9 CTN 1-19.23 mM | 2 | 1 | 1 | 0 | 3 | 0 |
| 10 CTN 2-19.23 mM | 2 | 3 | 5 | 0 | 3 | 0 |
| 11CTN 2-19.23 mM | 2 | 1 | 3 | 1 | 1 | 0 |
| 12 CTN 2-19.23 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 0 |
| 13 CTN 2-19.23 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 0 |
| 14 TUL 2 | 2 | 3 | 6 | 0 | 3 | 0 |
| 15 TUL 2 a | 2 | 3 | 6 | 0 | 1 | 1 |
| 16 TUL 2 b | 2 | 1 | 1 | 0 | 3 | 0 |
| 17 TUL 2 c | 4 | 1 | 3 | 1 | 1 | 0 |
| 18 TUL 2 d | 2 | 3 | 2 | 0 | 1 | 0 |
| 19 TUL 2 e | 2 | 4 | 3 | 0 | 3 | 0 |
| 20 ISI 1 | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 0 |
| 21 CTN 1 | 4 | 5 | 1 | 1 | 1 | 0 |

NC: No crecimiento. **C:** Cepas seleccionadas para conservación en agar inclinado, dado su difícil manejo. **M:** Cepas con múltiples especies.

Anexo 3. Caracterización morfológica colonial de cada lote de las cepas resistentes a PM.

| ID cepas PM-Resistentes LOTE 1 | Forma de la colonia | Elevación | Borde | Superficie | Color | Brillo |
|--------------------------------|---------------------|-----------|-------|------------|-------|--------|
| 1 TUL 1-0.3 mM | 2 | 3 | 2 | 0 | 3 | 1 |
| 2 TUL 1-1mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 1 |
| 3 TUL 2-0.6 mM | 2 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 4 TUL 2-0.6 mM | 1 | 3 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 5 TUL 2-0.6 mM | 1 | 3 | 1 | 0 | 3 | 1 |
| 6 TUL 2-1 mM | 1 | 3 | 1 | 0 | 3 | 1 |
| 7 ISI 1-0.6 mM | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 8 ISI 1-1 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 9 ISI 2-0.3 mM | 1 | 3 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 10 ISI 2-0.6 mM | 1 | 3 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 11 ISI 2-1 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 12 CTN 1-0.3 mM | 2 | 3 | 3 | 0 | 1 | 1 |
| 13 CTN 1-0.6 mM | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| 14 CTN 1-1 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 15 CTN 2-0.3 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 16 CTN 2-0.6 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 17 CTN 2-1 mM | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 18 TUL 1 | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 19 TUL 2 | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 1 |
| 20 ISI 1 | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 1 |
| 21 ISI 2 | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 1 |
| 22 ISI 2a | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 1 |
| 23 CTN 1 | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 24 CTN 2 | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 1 |

| ID* cepas PM-resistentes LOTE 2 | Forma de la colonia | Elevación | Borde | Superficie | Color | Brillo |
|---------------------------------|---------------------|-----------|-------|------------|-------|--------|
| 1 TUL 1-0.3 mM | 1 | 3 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 2 TUL 1-1 mM | 1 | 3 | 1 | 0 | 3 | 1 |
| 3 TUL 2-0.6 mM | 1 | 3 | 1 | 0 | 3 | 1 |
| 4 TUL 2-0.6 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 1 |
| 5 TUL 2-0.6 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 0 |
| 6 TUL 2-1 mM | 1 | 3 | 1 | 0 | 3 | 1 |
| 7 ISI 1-0.6 mM | 1 | 3 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 8 ISI 1-0.6 mM | 1 | 3 | 1 | 0 | 3 | 1 |
| 9 ISI 1-1 mM | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 10 ISI 2-0.3 mM | 4 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 11 ISI 2-0.6 mM | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 12 ISI 2-1 mM | 1 | 3 | 5 | 0 | 1 | 0 |
| 13 CTN 1-0.3 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 14 CTN 1-0.6 mM | 1 | 3 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 15 CTN 1-1 mM | 1 | 3 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 16 CTN 2-0.3 mM | 1 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 17 CTN 2-0.6 mM | 1 | 3 | 5 | 0 | 1 | 1 |
| 18 CTN 2-1 mM | 2 | 1 | 6 | 1 | 1 | 1 |
| 19 TUL 1 | 2 | 2 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 20 TUL 2 | 2 | 2 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 21 ISI 1 | 2 | 1 | 6 | 0 | 1 | 0 |
| 22 ISI 2 | 1 | 3 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 23 ISI 2 a | 2 | 2 | 6 | 0 | 1 | 1 |
| 24 CTN 1 | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 25 CTN 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |

| ID* cepas PM-resistentes LOTE 3 | Forma de la colonia | Elevación | Borde | Superficie | Color | Brillo |
|---------------------------------|---------------------|-----------|-------|------------|-------|--------|
| 1-1 TUL 1-0.3 mM | 1 | 3 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 1-2 TUL 1-0.3 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 0 |
| 1-3 TUL 1-0.3 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 2-1 TUL 1-1mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 2-3 TUL 1-1mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 0 |
| 3-1 TUL 2-0.6 mM | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 3-2 TUL 2-0.6 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 4-1 TUL 2-0.6 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 5-1 TUL 2-0.6 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 0 |
| 6-1 TUL 2-1 mM | 2 | 3 | 3 | 0 | 3 | 0 |
| 7-1 ISI 1-0.6 mM | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 7-2 ISI 1-0.6 mM | NC | | | | | |
| 7-3 ISI 1-0.6 mM | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 7-4 ISI 1-0.6 mM | 2 | 3 | 3 | 0 | 3 | 0 |
| 8-1 ISI 1-0.6 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 0 |
| 8-2 ISI 1-0.6 mM | 2 | 3 | 3 | 0 | 3 | 0 |
| 9-1 ISI 1-1 mM | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 9-2 ISI 1-1 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 10-1 ISI 2-0.3 mM | 2 | 1 | 1 | 0 | 3 | 0 |
| 10-2 ISI 2-0.3 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 11-1 ISI 2-0.6 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 11-2 ISI 2-0.6 mM | NC | | | | | |
| 11-3 ISI 2-0.6 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 11-4 ISI 2-0.6 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 12-1 ISI 2-1 mM | 2 | 1 | 6 | 1 | 1 | 1 |
| 12-2 ISI 2-1 mM | 2 | 3 | 3 | 0 | 3 | 0 |
| 12-3 ISI 2-1 mM | 2 | 3 | 3 | 0 | 3 | 0 |
| 13-1 CTN 1-0.3 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 13-2 CTN 1-0.3 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 13-3 CTN 1-0.3 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 14-1 CTN 1-0.6 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 14-2 CTN 1-0.6 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 15-1 CTN 1-1 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 16-2 CTN 2-0.3 mM | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 17-1 CTN 2-0.6 mM | 2 | 1 | 6 | 1 | 1 | 1 |
| 17-2 CTN 2-0.6 mM | 2 | 3 | 3 | 0 | 1 | 0 |
| 18-1 CTN 2-1 mM | 2 | 1 | 6 | 1 | 1 | 1 |
| 19-1 TUL 1 | 2 | 2 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 20-1 TUL 2 | 2 | 3 | 1 | 0 | 3 | 1 |
| 21-1 ISI 1 | 2 | 1 | 6 | 0 | 1 | 0 |
| 23-1 ISI 2 a | 2 | 1 | 6 | 0 | 1 | 0 |
| 24-1 CTN 1 | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 25-1 CTN 2 | 2 | 1 | 6 | 0 | 1 | 0 |

Anexo 4. Técnica de tinción de Gram

| Reactivos | Materiales y equipo |
|-------------------------------------|-----------------------------|
| Solución de alcohol 50% | Mechero |
| Agua destilada | Asa bacteriológica |
| Colorante violeta de genciana al 3% | Portaobjetos y cubreobjetos |
| Solución de lugol | Microscopio de campo claro |
| Solución de etanol 97% y acetona 3% | |
| Colorante safranina | |
| Aceite de inmersión | |

Procedimiento.

1. Lavar los portaobjetos y cubreobjetos con una solución de alcohol al 50%, enjuagar con agua destilada y secarlos perfectamente con papel seda.
2. Realizar un frotis en el portaobjetos:
 - a. Para cultivos líquidos: colocar con el asa una muestra de cultivo y expandirla sobre el área central del portaobjetos limpio. repetir el proceso aproximadamente 3 veces. Fijar con calor, en la parte superior de la flama del mechero.
 - b. Para colonias en medio solido: colocar una pequeña gota de agua destilada en el centro del portaobjetos, tomar una colonia del cultivo, con cuidado de no tomar medio de cultivo. esparcir y diluir la muestra con el asa, hasta que se vea una muestra homogénea. Fijar con calor, en la parte superior de la flama del mechero.
3. Colocar colorante violeta de genciana al 1% sobre la muestra, asegurando que todo el frotis quede impregnado de colorante. Esperar de 1 a 2 minutos. Tirar el exceso.
4. Enjuagar levemente con solución de lugol, posteriormente cubrir la muestra con esta solución y esperar 1 minuto. Tirar el exceso y enjuagar con agua corriente.
5. Decolorar con una solución compuesta de etanol 97% y acetona 3%, para una adecuada decoloración, se coloca el portaobjetos con la muestra a 45° y con una pipeta Pasteur se aplica la solución de alcohol-acetona, dejándose correr desde la parte superior del portaobjetos hasta que no se vea color en la parte final de la muestra. Enjuagar con agua corriente.
6. Colocar colorante safranina por un minuto. Enjuagar con agua corriente. Dejar secar al aire. Observar a 40 y 100X.
7. Para muestras fijas, antes de observar bajo el microscopio, colocar cuidadosamente sobre un cubreobjetos resina o barniz de uñas transparente, voltear el cubreobjetos sobre el portaobjetos centrando la muestra teñida. Eliminar las burbujas presionando suavemente una goma de lápiz sobre el cubreobjetos. Dejar secar al aire por 48

horas. Observar a 40 y 100X.

Anexo 5. Prueba de hidróxido de potasio (KOH) (confirmación de la tinción de Gram)

| Reactivos | Materiales y equipo |
|------------------------------|------------------------------------|
| Solución acuosa de KOH al 3% | Asa bacteriológica Portaobjetos |

Procedimiento.

1. Lavar los portaobjetos y cubreobjetos con una solución de alcohol al 50%, enjuagar con agua destilada y secarlos perfectamente con papel seda.
2. Colocar de 1 a 2 gotas de la solución de KOH sobre el portaobjetos.
3. Inocular con la ayuda de un asa bacteriológica una muestra de cultivo (no utilizar colonias de más de 48 horas de antigüedad).
4. Agitar en forma circular con el asa de 5 a 10 segundos. Sí la solución se pone viscosa (observar la formación de un hilo de 0.5 a 2 cm al levantar el asa de la solución) el resultado es Gram – de lo contrario es Gram (+).

Anexo 6. Prueba Oxidasa

| Reactivos | Materiales y equipo |
|--|--------------------------------------|
| Tiras de papel filtro Solución acuosa al 1% de cloruro tetrametil para-fenilendiamina | Asa bacteriológica Pipeta pasteur |

Procedimiento.

1. Con la ayuda de una pipeta pasteur impregnar las tiras de papel filtro con la solución acuosa al 1% de cloruro tetrametil para-fenilendiamina.
2. Con el asa bacteriológica tomar una muestra del cultivo a analizar y trazar líneas en una tira de papel con la solución.
3. La reacción es instantánea: un cambio de color entre purpura y negro en los primeros 20 segundos es una reacción positiva. Los oxidasa negativos no generan ningún cambio de color.

Anexo 7. Protocolo de extracción de ADN modificado de MO BIO Laboratories, Inc. Protocolo (para máxima recuperación). Página 2. 12800-50.doc. Versión 10292003.

1. En tubos para centrifuga de 15 mL y utilizando el medio de cultivo habitual, **cultivar las cepas uniespecíficas a identificar**.
2. Incubar, por 48 hrs a temperatura ambiente en un agitador orbital a 100 rpm.
3. **Centrifugar** los tubos a 6000 rpm durante 10 min.
4. Descartar el sobrenadante conservando el pellet y agregar 5 mL de **agua destilada estéril**, resuspender la biomasa y centrifugar de nuevo.
5. Repetir el paso anterior.
6. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 0.5 mL de agua destilada estéril.
7. En un tubo con solución Bead de 2 mL (incluido), agregar 0.50 mL de la muestra del cultivo lavada y resuspendida en agua destilada.
8. Aplique vortex suave para homogenizar.
9. **Revisar solución S1**. Si la solución S1 esta precipitada, calentarla a 60° C no se utilice hasta que se haya disuelto.
10. Agregar 60µL de solución **S1** mezclar por inversión varias veces, o dar vortex brevemente.
11. Agregar 200µL de solución **IRS (Inhibitor Removal Solution)**. **Este paso se requiere ya que el ADN recuperado fue utilizado para PCR.**
12. Asegure los tubos Bead horizontalmente utilizando la gradilla Mo Bio Vortex Adapter para el vortex. O asegure los tubos horizontalmente sobre una placa para vortex con tapa. **Dar vortex a máxima velocidad por 10 minutos**.
13. Asegurarse de que los tubos Bead de 2 mL roten libremente en la centrifuga sin derramarse. Centrifugar los tubos a **10,000 g por 30 seg. Precaución: asegurarse de no exceder los 10,000 g**, ya que los tubos pueden quebrarse.
14. Transferir sobrenadante a tubos para microcentrifuga limpios (incluidos).
15. **Nota:** con 0.5 mL de muestra y dependiendo de la concentración de la muestra, se esperaría recuperar aproximadamente entre 500 a 750 µL de sobrenadante. El sobrenadante puede presentar algunas partículas.
16. Añadir 250 µL de solución **S2** y dar vortex por 5 seg. Incubar a 4° C por 5 min.
17. Centrifugar los tubos por 1 min a 10,000 g a 4° C.
18. Conservando el pellet, transferir el total del sobrenadante **en volúmenes de máximo 700 µL** a tubos de microcentrifuga limpio (incluido).
19. Agregar 1.3 mL de solución **S3** a cada tubo con sobrenadante y dar vortex por 5 seg.
20. Llevar aproximadamente 700 µL de la solución anterior a un **filtro (spin filter)** centrifugar a 10,000 g por 1 min. Descartar el líquido y agregar el resto del sobrenadante y centrifugar a 10,000 g por 1 min. **Nota:** aproximadamente se requieren tres cargas para filtrar todo el volumen de cada muestra.
21. Agregar 300 µL de solución **S4** y centrifugar por 30 seg a 10,000 g.
22. Descartar el líquido.
23. **Centrifugar nuevamente por 1 min.**
24. Colocar cuidadosamente el filtro (*spin filter*) en un tubo nuevo (incluido). Evitando que cualquier gota de solución S4 toque el filtro.
25. Agregar 50 µL de solución **S5** al centro de la membrana del filtro blanco.
26. **Centrifugar por 30 seg.**
27. Descartar el filtro (*spin filter*). El ADN en el tubo, esta listo para su aplicación inmediata. No se requieren pasos adicionales.
Recomendamos refrigerar a -20° C. **La solución S5 no contiene EDTA.**

Comment [RBA1]: Los cultivos deben ser nuevos, preferentemente, para evitar la formación de estructuras de resistencia, que dificulta la extracción de ADN

Comment [RBA2]: Para concentrar las células y asegurar una mayor cantidad de ADN

Comment [RBA3]: El objetivo de lavar con agua destilada a las células, es eliminar posibles interferencias por el medio de cultivo.

Comment [RBA4]: Contiene SDS, a temperatura baja, precipita. El SDS es un detergente. Rompe las membranas celulares.

Comment [RBA5]: Precipita ácidos húmicos y otros inhibidores de PCR. Generalmente los ácidos húmicos son café.

Comment [RBA6]: Lisis mecánica, aumenta la recuperación de ADN.

Comment [RBA7]: La ecuación utilizada para transformar gravidades (g) a RPM fue:
$$RPM = \sqrt{\frac{g}{1.118 \times 10^{-5} \cdot \text{radio}(mm)}}$$

Comment [RBA8]: Precipita proteínas.

Comment [RBA9]: Este volumen es para no derramar los tubos de microcentrifuga con capacidad de 2 mL, una vez que se agregue la solución S3.

Comment [RBA10]: Contiene sales que enlazan el ADN al dióxido de silicio.

Comment [RBA11]: Es de dióxido de silicio, por lo que el ADN se une selectivamente a el.

Comment [RBA12]: Solución de lavado compuesta de etanol. Esta elimina los residuos de sustancias diferentes a ADN que se hayan quedado en el filtro

Comment [RBA13]: Eliminar por completo la solución S4.

Comment [RBA14]: Solución búfer estéril.

Comment [RBA15]: Esto liberará el ADN de la membrana

Comment [RBA16]: Es una solución 10mM Tris pH 8, sin sales, lo cual permite que el ADN sea retirado de la membrana.

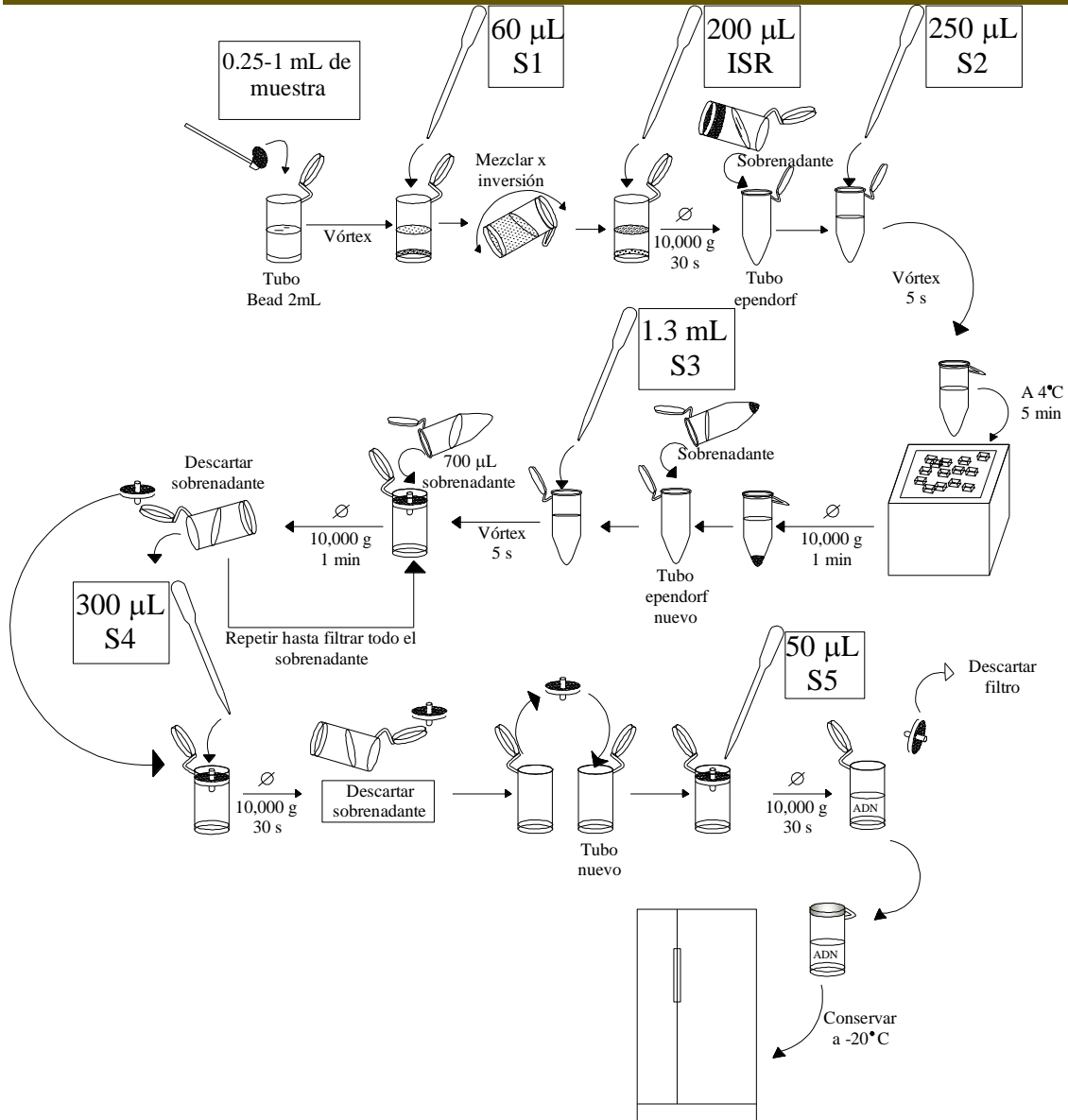
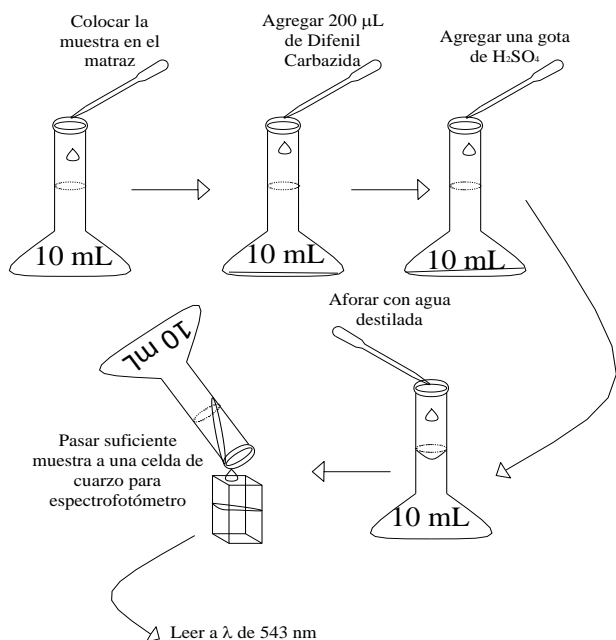


Figura 53. Diagrama de la técnica de extracción de ADN.

Anexo 8. Medición de Cr (VI) y Cr total por método colorimétrico

Para la determinación de Cr (VI) y Cr total se aplicó un método colorimétrico que mide la cantidad de Cr (VI) en la muestra (Figura 54). El método fue tomado de los métodos

estándar (APHA, 1998), y se escalo a 10 mL. Para determinar el Cr total es necesario realizar la oxidación completa de Cr (III) a Cr (VI) en la muestra utilizando una solución de permanganato de potasio y medirlo conforme a la técnica antes descrita. Inicialmente se toma una porción de la muestra a analizar que contenga entre 20 y 100 μg de Cr total a un matraz aforado a 10 mL, para dar un rango de concentración final entre 0.2 y 1 mg L^{-1} (Figura 55).



La técnica aplicada fue escalada del método original descrito en los métodos estándar, reduciendo el volumen de 100 a 10 mL. Los volúmenes manejados fueron medidos utilizando una micropipeta de 20-200 μL . La reacción se realiza justo antes de ser medida, para reducir la variabilidad en los resultados.

Figura 54. Procedimiento para la determinación de Cr (VI) por método colorimétrico (APHA, 1998).

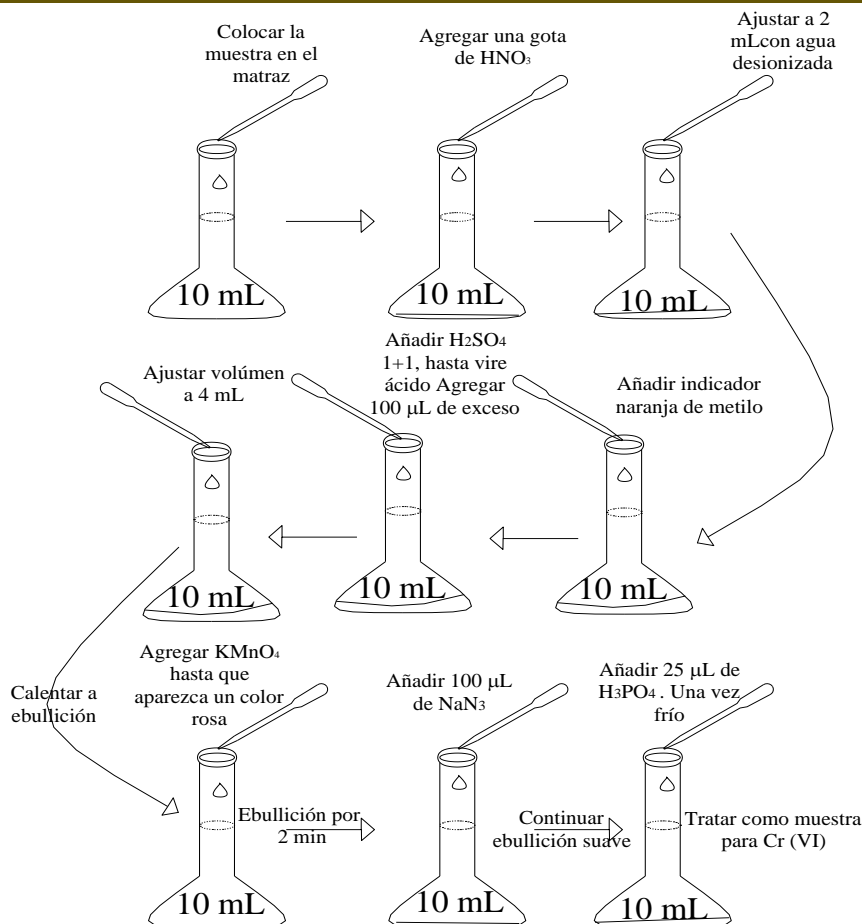
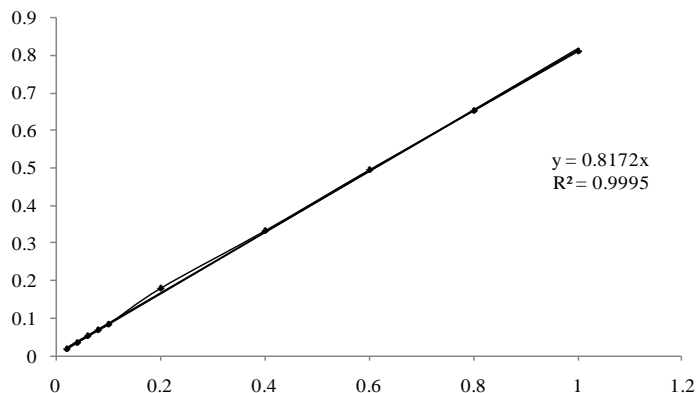


Figura 55. Técnica aplicada para la oxidación de Cr (III) a Cr (VI).


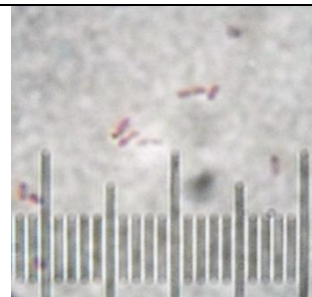

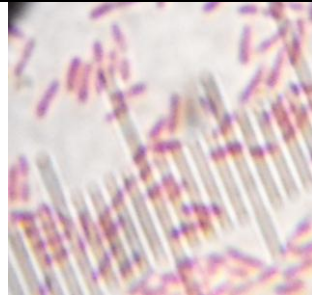
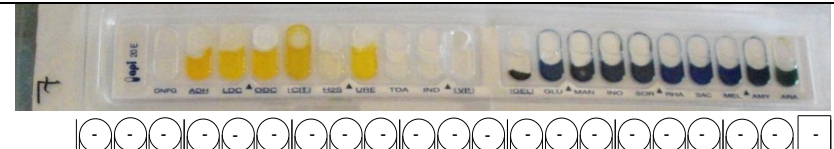
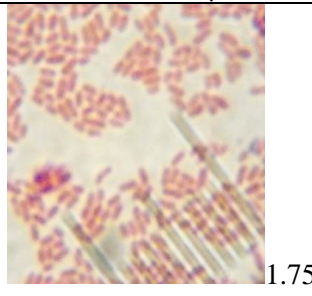
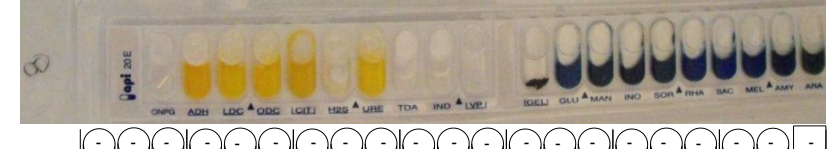
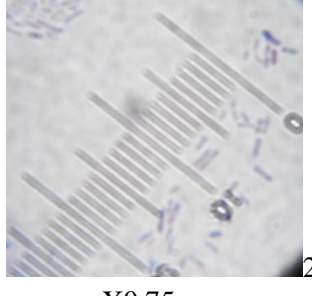
Anexo 9. Curva de calibración para la cuantificación de Cr (VI) por método colorimétrico (APHA, 1998) (Figura 54), utilizando un espectrofotómetro UV-Visible, Varian® modelo Cary 1E.

| Estándar | mg/L Cr (VI) | ABS |
|----------|--------------|--------|
| 1 | 0.02 | 0.018 |
| 2 | 0.04 | 0.0346 |
| 3 | 0.06 | 0.0528 |
| 4 | 0.08 | 0.0685 |
| 5 | 0.1 | 0.0835 |
| 6 | 0.2 | 0.1795 |
| 7 | 0.4 | 0.3325 |
| 8 | 0.6 | 0.4945 |
| 9 | 0.8 | 0.6518 |
| 10 | 1 | 0.8100 |
| Blanco | 0.00 | 0.0007 |



| | | |
|---------|------|--------|
| Control | 0.05 | 0.0378 |
|---------|------|--------|

Anexo 10. Resultados de la aplicación del método API 20 E y tamaño celular de las cepas resistentes a Cr (VI)

| | Resultado API 20 E | Tamaño celular | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|---|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|------|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|--|---|--|---|--|---|--|---|--|---|--|---|--|---|--|---|--|---|--|---|--|--|--|---|
| 2a |  <table border="1" style="width: 100%; text-align: center; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td> </tr> <tr> <td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>OX</td> </tr> <tr> <td>ONPG</td><td>ADH</td><td>LDC</td><td>UDC</td><td>GLT</td><td>H2S</td><td>URE</td><td>TDA</td><td>IND</td><td>VPI</td><td>GEL</td><td>GLU</td><td>MAN</td><td>INO</td><td>SOR</td><td>RHA</td><td>SAC</td><td>MEL</td><td>AMY</td><td>ARA</td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td> </tr> </table> | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | OX | ONPG | ADH | LDC | UDC | GLT | H2S | URE | TDA | IND | VPI | GEL | GLU | MAN | INO | SOR | RHA | SAC | MEL | AMY | ARA | | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | |  <p style="text-align: center;">1 X 0.75 μm</p> | | |
| - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | OX | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ONPG | ADH | LDC | UDC | GLT | H2S | URE | TDA | IND | VPI | GEL | GLU | MAN | INO | SOR | RHA | SAC | MEL | AMY | ARA | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2b |  <table border="1" style="width: 100%; text-align: center; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>+</td><td>+</td><td>-</td><td>+</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td> </tr> <tr> <td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>OX</td> </tr> <tr> <td>ONPG</td><td>ADH</td><td>LDC</td><td>UDC</td><td>GLT</td><td>H2S</td><td>URE</td><td>TDA</td><td>IND</td><td>VPI</td><td>GEL</td><td>GLU</td><td>MAN</td><td>INO</td><td>SOR</td><td>RHA</td><td>SAC</td><td>MEL</td><td>AMY</td><td>ARA</td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td><td colspan="2">6</td><td colspan="2">2</td><td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td> </tr> </table> | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | OX | ONPG | ADH | LDC | UDC | GLT | H2S | URE | TDA | IND | VPI | GEL | GLU | MAN | INO | SOR | RHA | SAC | MEL | AMY | ARA | | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 6 | | 2 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | |  <p style="text-align: center;">1.25 X 0.5 μm</p> |
| - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | OX | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ONPG | ADH | LDC | UDC | GLT | H2S | URE | TDA | IND | VPI | GEL | GLU | MAN | INO | SOR | RHA | SAC | MEL | AMY | ARA | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 6 | | 2 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 |  <table border="1" style="width: 100%; text-align: center; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td> </tr> <tr> <td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>OX</td> </tr> <tr> <td>ONPG</td><td>ADH</td><td>LDC</td><td>UDC</td><td>GLT</td><td>H2S</td><td>URE</td><td>TDA</td><td>IND</td><td>VPI</td><td>GEL</td><td>GLU</td><td>MAN</td><td>INO</td><td>SOR</td><td>RHA</td><td>SAC</td><td>MEL</td><td>AMY</td><td>ARA</td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td> </tr> </table> | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | OX | ONPG | ADH | LDC | UDC | GLT | H2S | URE | TDA | IND | VPI | GEL | GLU | MAN | INO | SOR | RHA | SAC | MEL | AMY | ARA | | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | |  <p style="text-align: center;">1.75 X 0.75 μm</p> |
| - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | OX | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ONPG | ADH | LDC | UDC | GLT | H2S | URE | TDA | IND | VPI | GEL | GLU | MAN | INO | SOR | RHA | SAC | MEL | AMY | ARA | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 |  <table border="1" style="width: 100%; text-align: center; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td> </tr> <tr> <td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>OX</td> </tr> <tr> <td>ONPG</td><td>ADH</td><td>LDC</td><td>UDC</td><td>GLT</td><td>H2S</td><td>URE</td><td>TDA</td><td>IND</td><td>VPI</td><td>GEL</td><td>GLU</td><td>MAN</td><td>INO</td><td>SOR</td><td>RHA</td><td>SAC</td><td>MEL</td><td>AMY</td><td>ARA</td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td><td colspan="2">0</td> </tr> </table> | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | OX | ONPG | ADH | LDC | UDC | GLT | H2S | URE | TDA | IND | VPI | GEL | GLU | MAN | INO | SOR | RHA | SAC | MEL | AMY | ARA | | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | |  <p style="text-align: center;">2 X 0.75 μm</p> |
| - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | OX | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ONPG | ADH | LDC | UDC | GLT | H2S | URE | TDA | IND | VPI | GEL | GLU | MAN | INO | SOR | RHA | SAC | MEL | AMY | ARA | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

16

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|---|---|---|
| + | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | - | - | |
| 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 |
| ONPG | ADH | LDC | UDC | CIT | H ₂ S | URE | TDA | IND | V/F | GEL | GLU | MAN | INO | SOR | RHA | SAC | MEL | AMY | ARA | OX | | | |
| 1 | | | 0 | | | 4 | | | 4 | | | 5 | | | 3 | | | 3 | | | | | |

1.5X1 μm

17

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|---|---|---|
| - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 |
| ONPG | ADH | LDC | UDC | CIT | H ₂ S | URE | TDA | IND | V/F | GEL | GLU | MAN | INO | SOR | RHA | SAC | MEL | AMY | ARA | OX | | | |
| 0 | | | 0 | | | 0 | | | 1 | | | 0 | | | 0 | | | 0 | | | | | |

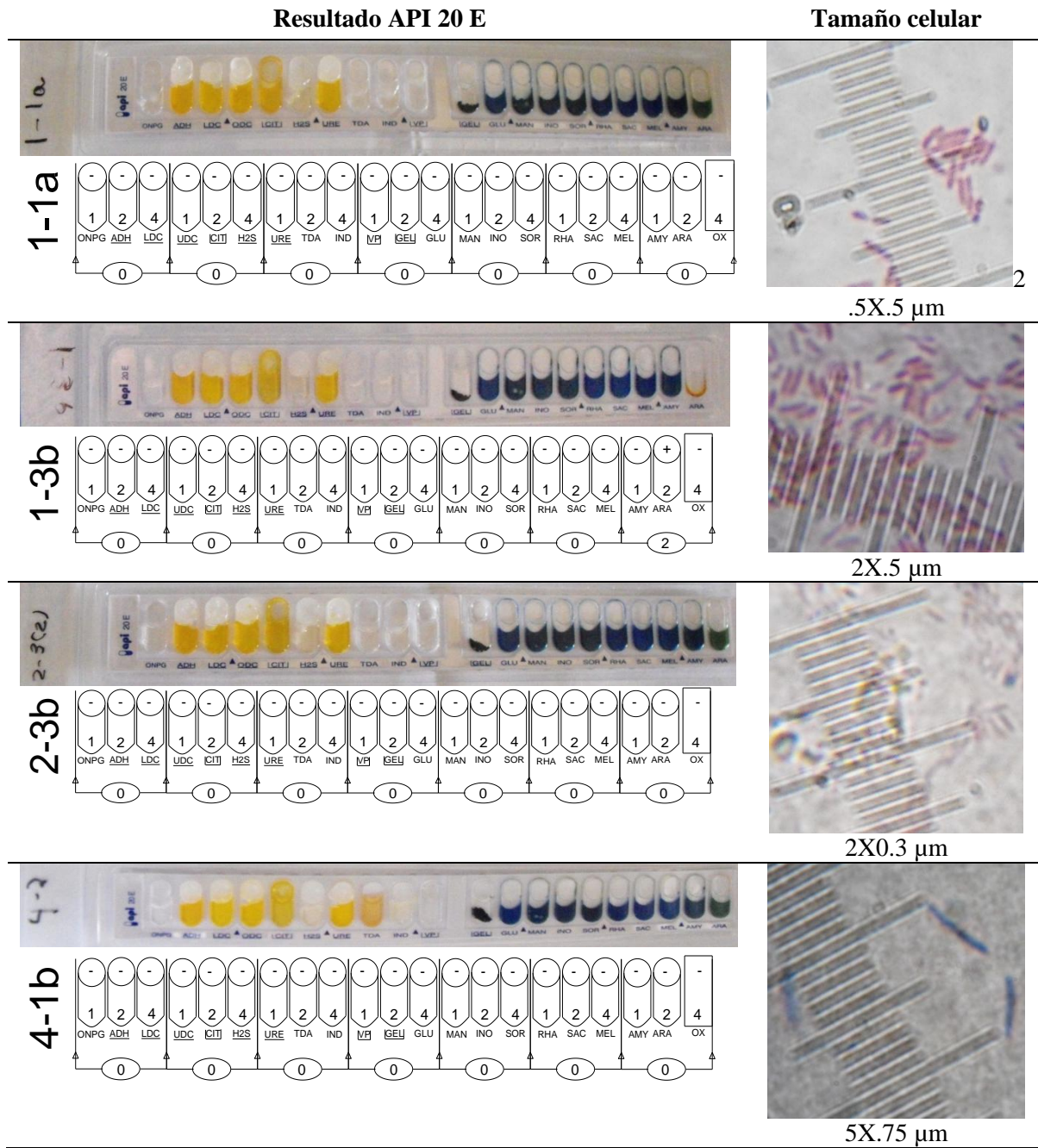
X.5 μm

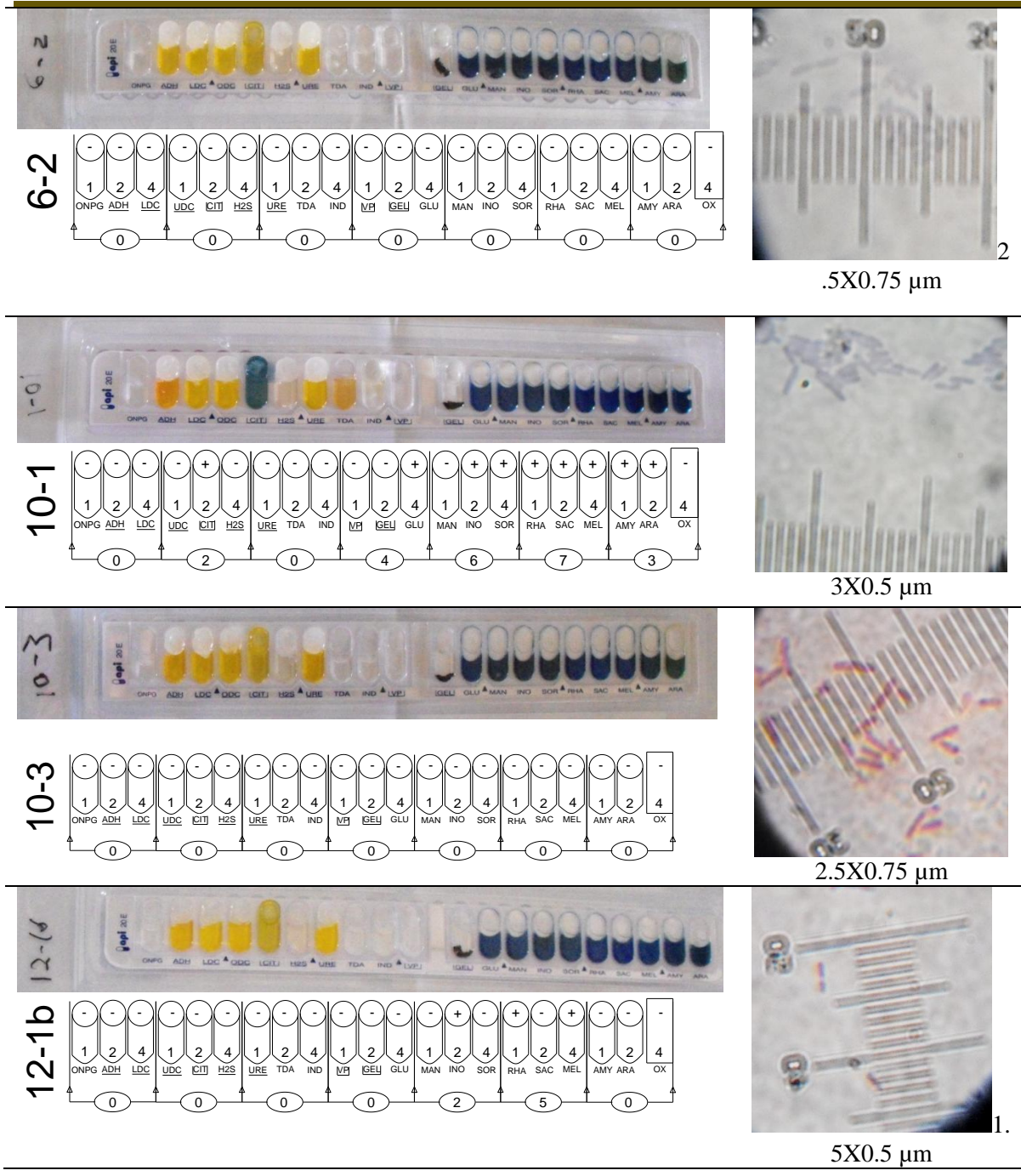
20

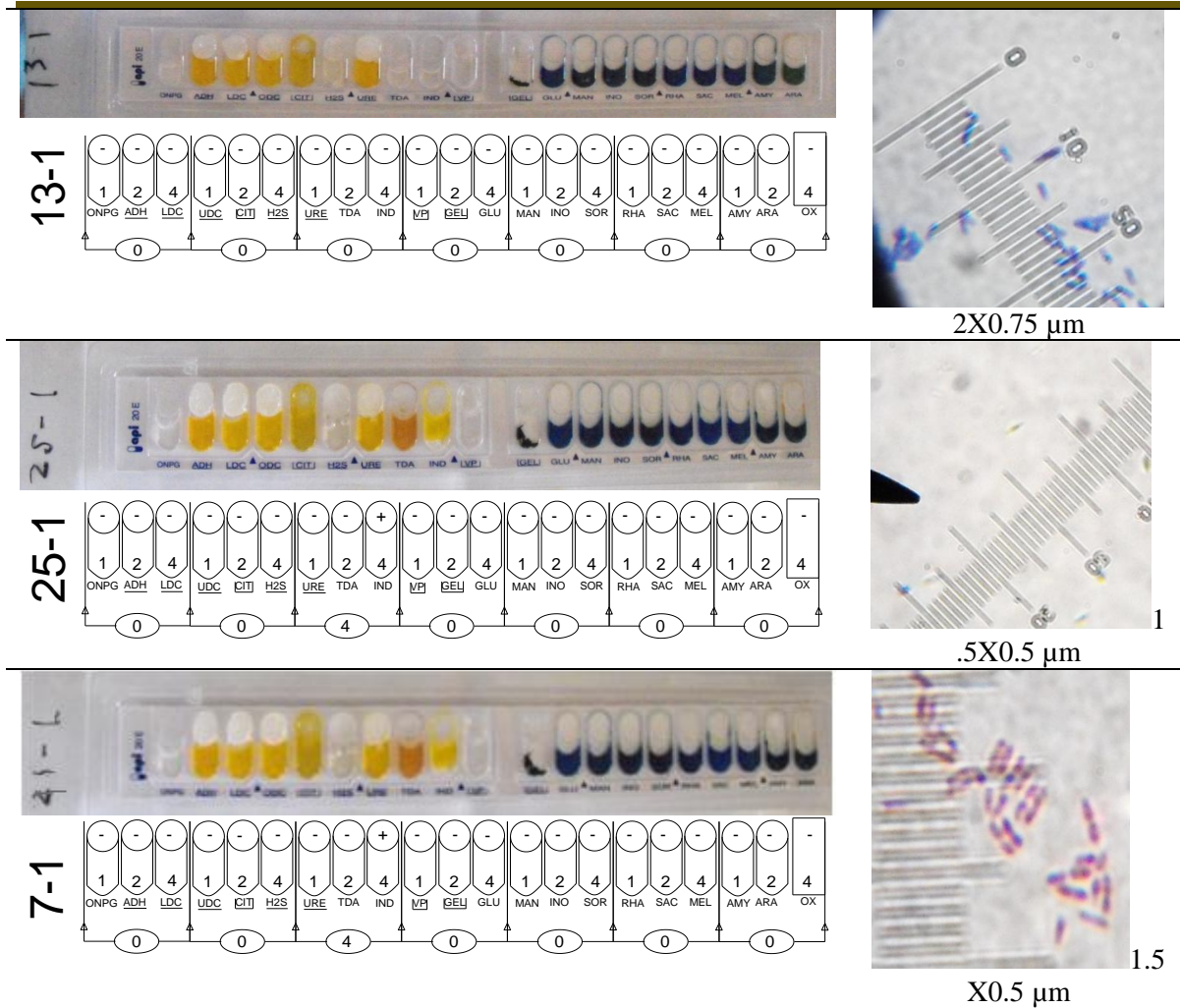
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|---|---|---|
| - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | - | + | - | - | |
| 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 |
| ONPG | ADH | LDC | UDC | CIT | H ₂ S | URE | TDA | IND | V/F | GEL | GLU | MAN | INO | SOR | RHA | SAC | MEL | AMY | ARA | OX | | | |
| 0 | | | 0 | | | 0 | | | 4 | | | 0 | | | 4 | | | 2 | | | | | |

X.5 μm

Anexo 11. Resultados de la aplicación del método API 20 E y tamaño celular de las cepas resistentes a PM







Anexo 12. Preparación de soluciones

a) Solución madre de Cr (VI) (0.96 M).

| Reactivos | Materiales y equipo |
|--|---|
| Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$). Agua destilada | 1 matraz aforado de 10 mL Balanza analítica Espátula para pesar |

Procedimiento.

1. Colocar en un matraz aforado de 10 mL, 2.8288 g de $K_2Cr_2O_7$.
2. Diluir en 5 mL de agua destilada.
3. Aforar a 10 mL.
4. Esterilizar por filtración antes de usar.

b) Solución madre de PM (0.6 M).

| Reactivos | Materiales y equipo |
|---|---|
| Paratión metílico comercial (48%) Agua destilada | 1 matraz aforado de 10 mL Balanza analítica Espátula para pesar |

Procedimiento.

1. Colocar en un matraz aforado de 10 mL, 3.29 g de paratión metílico comercial.
2. Diluir en 5 mL de agua destilada.
3. Aforar a 10 mL.
4. Esterilizar por filtración antes de usar.

c) Solución de difenil carbazida.

| Reactivos | Materiales y equipo |
|---|---|
| 1,5-difenilcarbhidracida ($C_{13}H_{14}N_4O$) Acetona grado analítico. | 1 frasco ámbar con tapa Balanza analítica Espátula para pesar 1 probeta graduada de 100 mL |

Procedimiento.

1. Colocar en un frasco ambar 250 mg de 1,5-difenilcarbhidracida.
2. Diluir en 50 mL de acetona.
3. Descartar si desarrolla color amarillo. Guardar en refrigeración.

Anexo 13. Lista de las cepas arrojadas al utilizar el programa de alineación por internet BLAST, por sus siglas en inglés: Basic Local Alignment Search Tool, introduciendo las secuencias corregidas en la variante Blastn (NCBI, 2010), se eligieron porcentajes de similitud entre 100-95%.

| Cepa | % de similitud | Causa de descarte |
|---|----------------|--|
| 2 a ISI 1-19.23 mM | | |
| <i>Pseudomonas fluorescens SBW25</i> | 95 | |
| 2 b ISI 1-19.23 mM | | |
| <i>Comamonas testosteroni CNB-2</i> | 100 | |
| <i>Comamonas testosteroni KF-1 ctg14069</i> | 99 | |
| <i>Acidovorax ebreus TPSY</i> | 97 | Gram + |
| <i>Acidovorax sp. JS42</i> | 97 | Gram + |
| 2 b ISI 1-19.23 mM | | |
| <i>Pseudomonas fluorescens Pf0-1</i> | 98 | |
| <i>Pseudomonas fluorescens SBW25</i> | 97 | |
| <i>Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi NCPPB 3335</i> | 97 | Gran capacidad de degradar sustratos orgánicos |
| 8 CTN 1-19.23 mM | | |
| <i>Enterobacter sp. 638</i> | 98 | Moviles |
| <i>Pantoea ananatis LMG 20103 chromosome</i> | 97 | Moviles |
| <i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae MGH 78578</i> | 97 | |
| <i>Klebsiella variicola At-22</i> | 97 | Obtención en plantas y muestras clínicas únicamente. |
| <i>Klebsiella pneumoniae subsp. rhinoscleromatis ATCC 13884</i> | 96 | Gran capacidad de degradar sustratos orgánicos |
| <i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Hadar str. RI_05P066</i> | 96 | Moviles |
| <i>Enterobacter cloacae subsp. cloacae ATCC 13047</i> | 96 | Móviles. |
| <i>Erwinia tasmaniensis Et1/99,</i> | 96 | Móviles. |
| <i>Citrobacter rodentium ICC168</i> | 96 | Móviles. |
| <i>Cronobacter sakazakii ATCC BAA-894</i> | 96 | Móviles. |

| | | |
|---|----|---|
| <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Hadar</i> str. <i>RI_05P066</i> | 96 | Móviles. |
| <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> <i>PC1</i> | 96 | Móviles. |
| <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Enteritidis</i> | 96 | Móviles. |
| <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Dublin</i> str. <i>CT_02021853</i> | 96 | Móviles. |
| <i>Citrobacter koseri</i> ATCC BAA-895 | 96 | Móviles. |
| <i>Yersinia kristensenii</i> ATCC 33638 contig00434 | 95 | Móviles. |
| <i>Pectobacterium wasabiae</i> WPP163 | 95 | Móviles. |
| <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> <i>PB1/+</i> | 95 | Móviles. |
| <i>Yersinia pestis</i> <i>KIM D27</i> | 95 | Móviles. |
| <i>Yersinia rohdei</i> ATCC 43380 | 95 | Móviles. |
| <i>Erwinia amylovora</i> ATCC 49946 | 95 | Móviles. |
| 16 TUL 2 c | | |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pf0-1</i> | 98 | |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>SBW25</i> | 97 | |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aesculi</i> str. 2250 contig_scf_4865_251_3 | 96 | Indol +, gelatinasa + |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A | 96 | Patógeno de plantas, indol +, gelatinasa + |
| <i>Pseudomonas putida</i> <i>GB-1</i> | 96 | Gran capacidad de degradar sustratos orgánicos |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>A1501</i> | 95 | Oxidasa + |
| <i>Pseudomonas mendocina</i> <i>ymp</i> | 95 | Oxidasa + |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>PAb1</i> Contig1.77 | 94 | Oxidasa + |
| 17 TUL 2 d | | |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pf0-1</i> | 98 | |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>SBW25</i> | 97 | |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A | 97 | Patógeno de plantas, indol +, gelatinasa + |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i> str. <i>R4</i> contig86.1 | 97 | Patógeno de plantas, indol +, gelatinasa + |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> <i>B728a</i> | 97 | Patógeno de plantas, indol +, gelatinasa + |
| <i>Pseudomonas entomophila</i> <i>L48</i> | 96 | |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pf-5</i> | 96 | |
| <i>Pseudomonas putida</i> <i>GB-1</i> | 96 | Oxidasa + |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> str. <i>DC3000</i> | 96 | Patógeno de plantas, indol +, gelatinasa + |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>A1501</i> | 95 | Oxidasa +, gran capacidad de degradar sustratos orgánicos |
| <i>Pseudomonas mendocina</i> <i>ymp</i> | 95 | Tamaño, gran capacidad de degradar sustratos orgánicos |

| | | |
|--|----|---|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58 | 94 | Oxidasa +, Gran capacidad de degradar sustratos orgánicos |
| 20 ISI 1 | | |
| <i>Pseudomonas entomophila</i> L48 | 97 | |
| <i>Pseudomonas putida</i> GB-1 | 97 | Gran capacidad de degradar sustratos orgánicos |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aesculi</i> str. NCPPB3681 | 97 | Patógeno de plantas, indol +, gelatinasa + |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A | 97 | Patógeno de plantas, indol +, gelatinasa + |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i> str. R4 contig86.1 | 97 | Patógeno de plantas, indol +, gelatinasa + |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1 | 97 | Tamaño |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a | 97 | Patógeno de plantas, indol +, gelatinasa + |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501 | 96 | Gran capacidad de degradar sustratos orgánicos |
| <i>Pseudomonas mendocina</i> ymp | 96 | Gran capacidad de degradar sustratos orgánicos, tamaño, oxidasa + |
| 1-1a TUL 1-0.3 Mm | | |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25 | 99 | |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5 | 98 | |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A | 98 | Patógeno de plantas, indol +, gelatinasa + |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a | 98 | Patógeno de plantas, indol +, gelatinasa + |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> str. DC3000 | 97 | Patógeno de plantas, indol +, gelatinasa + |
| <i>Pseudomonas putida</i> W619 | 96 | Gran capacidad de degradar sustratos orgánicos |
| <i>Pseudomonas entomophila</i> L48 | 96 | Móviles. |
| <i>Pseudomonas mendocina</i> ymp | 95 | Gran capacidad de degradar sustratos orgánicos |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501 | 95 | Gran capacidad de degradar sustratos orgánicos |
| 1-3b TUL 1-0.3 mM | | |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25 | 99 | |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5 | 98 | |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a | 98 | Patógeno de plantas, indol +, gelatinasa + |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A | 98 | Patógeno de plantas, indol +, gelatinasa + |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> str. DC3000 | 97 | Patógeno de plantas, indol +, gelatinasa + |
| <i>Pseudomonas putida</i> W619 | 96 | Gran capacidad de degradar sustratos orgánicos |
| <i>Pseudomonas entomophila</i> L48 | 96 | Móviles. |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501 | 95 | Móviles. |

| | | |
|--|----|---|
| <i>Pseudomonas mendocina ymp</i> | 95 | Gran capacidad de degradar sustratos orgánicos |
| 2-3b TUL 1-1mM | | |
| <i>Pseudomonas fluorescens SBW25</i> | 99 | |
| <i>Pseudomonas fluorescens Pf-5</i> | 98 | |
| <i>Pseudomonas syringae pv. phaseolicola 1448A</i> | 98 | Patógeno de plantas, indol +, gelatinasa + |
| <i>Pseudomonas syringae pv. syringae B728a</i> | 98 | Patógeno de plantas, indol +, gelatinasa + |
| <i>Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000</i> | 97 | Patógeno de plantas, indol +, gelatinasa + |
| <i>Pseudomonas putida W619</i> | 96 | Gran capacidad de degradar sustratos orgánicos. |
| <i>Pseudomonas entomophila L48</i> | 96 | Utiliza citrato como fuente de carbono. |
| <i>Pseudomonas mendocina ymp</i> | 96 | Gran capacidad de degradar sustratos orgánicos |
| <i>Pseudomonas stutzeri A1501</i> | 95 | Gran capacidad de degradar sustratos orgánicos |
| <i>Pseudomonas aeruginosa LESB58</i> | 95 | Gran capacidad de degradar sustratos orgánicos |
| 4-1b TUL 2-0.6 mM | | |
| <i>Leifsonia xyli subsp. xyli str. CTCB07</i> | 96 | |
| <i>Marine actinobacterium PHSC20C1 1099646003187</i> | 95 | Aislada del medio marino. |
| 6-2 TUL 2-1 mM | | |
| <i>Pseudomonas fluorescens SBW25</i> | 99 | |
| <i>Pseudomonas fluorescens Pf-5</i> | 98 | |
| <i>Pseudomonas syringae pv. phaseolicola 1448A</i> | 98 | Patógeno de plantas, indol +, gelatinasa + |
| <i>Pseudomonas syringae pv. syringae B728a</i> | 98 | Patógeno de plantas, indol +, gelatinasa + |
| <i>Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000</i> | 97 | Patógeno de plantas, indol +, gelatinasa + |
| <i>Pseudomonas putida W619</i> | 96 | Gran capacidad de degradar sustratos orgánicos |
| <i>Pseudomonas entomophila L48</i> | 96 | Utiliza citrato como fuente de carbono. |
| <i>Pseudomonas mendocina ymp</i> | 95 | Gran capacidad de degradar sustratos orgánicos |
| 7-1 ISI 1-0.6 mM | | |
| <i>Comamonas testosteroni CNB-2</i> | 99 | |
| <i>Comamonas testosteroni KF-1 ctg14069</i> | 99 | |
| <i>Acidovorax ebreus TPSY</i> | 97 | Móviles. |
| <i>Acidovorax sp. JS42,</i> | 97 | Móviles. |
| <i>Delftia acidovorans SPH-1</i> | 95 | Móviles. |
| <i>Variovorax paradoxus S110</i> | 95 | Móviles. |
| 10-1 ISI 2-0.3 mM | | |

| | | |
|---|-----|------------|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58 | 96 | Móviles. |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA7 | 96 | Móviles. |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14 | 96 | Móviles. |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 | 96 | Móviles. |
| <i>Pseudomonas putida</i> GB-1 | 95 | Móviles. |
| <i>Pseudomonas mendocina</i> ymp | 95 | Móviles. |
| <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 | 95 | Móviles. |
| <i>Pseudomonas putida</i> F1 | 95 | Móviles. |
| <i>Pseudomonas entomophila</i> L48 | 95 | Móviles. |
| <i>Pseudomonas putida</i> W619 | 94 | Móviles. |
| 10-3 ISI 2-0.3 mM | | |
| <i>Achromobacter piechaudii</i> ATCC 43553 | 99 | |
| <i>Bordetella avium</i> 197N | 98 | Móviles. |
| <i>Bordetella bronchiseptica</i> RB50 | 98 | Móviles. |
| <i>Bordetella parapertussis</i> 12822 | 98 | Móviles. |
| <i>Bordetella pertussis</i> Tohama I | 97 | Móviles. |
| <i>Bordetella petrii</i> DSM 12804 | 97 | Móviles. |
| 12-1b ISI 2-1 mM | | |
| <i>Comamonas testosteroni</i> CNB-2 | 100 | |
| <i>Comamonas testosteroni</i> KF-1 ctg14069 | 99 | |
| <i>Acidovorax ebreus</i> TPSY | 96 | Tamaño. |
| <i>Acidovorax</i> sp. JS42 | 96 | Tamaño. |
| <i>Delftia acidovorans</i> SPH-1 | 95 | Tamaño. |
| 13-1 CTN 1-0.3 mM | | |
| <i>Rhodococcus erythropolis</i> PR4 | 100 | |
| <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1 | 98 | |
| <i>Rhodococcus opacus</i> B4 | 97 | |
| <i>Nocardia farcinica</i> IFM 10152 | 96 | Saprófito. |
| 25-1a CTN 2 | | |
| <i>Achromobacter piechaudii</i> ATCC 43553 contig00178 | 98 | |
| <i>Bordetella avium</i> 197N | 98 | Móviles. |
| <i>Bordetella bronchiseptica</i> RB50 | 98 | Móviles. |
| <i>Bordetella parapertussis</i> 12822 | 98 | Móviles. |
| <i>Bordetella pertussis</i> Tohama I | 98 | Móviles. |
| <i>Bordetella petrii</i> DSM 12804 | 97 | Móviles. |

Anexo 14. Identificación molecular de las especies resistentes a Cr (VI), utilizando datos de secuencias de ARN ribosomal 16S.

| ID laboratorio | Número de acceso (NCBI)* | Organismos relacionado | % Similitud** | Puntuación** |
|-------------------|--------------------------|---|---------------|--------------|
| 2a ISI 1-19.23 mM | HM104379.1 | <i>Pseudomonas reactans</i> AMP-13 | 93 | 976 |
| | AB576763.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. NCCP-18 | 93 | 976 |
| 2b ISI 1-19.23 mM | NZ_ADVQ01000001.1 | <i>Comamonas testosteroni</i> CNB-2 | 100 | 1295 |
| | NC_013446.1 | <i>Comamonas testosteroni</i> KF-1 ctg14069 | 99 | 1295 |
| 7 ISI 2-19.23 mM | NC_007492.2 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1 | 98 | 1203 |
| | NC_012660.1 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW2 | 97 | 1192 |
| 8 CTN 1-19.23 mM | NC_013850.1 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. | 97 | 1423 |
| | NC_011283.1 | <i>pneumoniae</i> MGH 78578 | | 1423 |
| | | <i>Klebsiella pneumoniae</i> 342 | 97 | |
| 16 TUL 2 c | NC_007492.2 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1 | 98 | 1463 |
| | NC_012660.1 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25 | 97 | 1452 |
| 17 TUL 2 d | NZ_ACOQ01000017.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. UK4 Contig17 | 99 | 1308 |
| 20 ISI 1 | NC_008027.1 | <i>Pseudomonas entomophila</i> L48 | 97 | 1415 |

*: Número de acceso de la secuencia en la base de datos del GeneBank en la página del NCBI (NCBI, 2010). **: Porcentaje de similitud entre la secuencia analizada y las existente en la base de datos, para lo cual se utilizó el programa de alineación por internet BLAST, por sus siglas en inglés: Basic Local Alignment Search Tool, introduciendo las secuencias corregidas en la variante Blastn (NCBI, 2010). ***Puntuación: cantidad de nucleótidos concordantes con la secuencia analizada.

Anexo 15. Identificación molecular de las especies resistentes a PM, utilizando datos de secuencias de ARN ribosomal 16S.

| ID laboratorio | Número de acceso (NCBI) | Organismos relacionado | % Similitud | Puntuación |
|-------------------|-------------------------|--|-------------|------------|
| 1-1a TUL 1-0.3 Mm | NC_012660.1 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25 | 99 | 1491 |
| | NC_004129.6 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5 | 98 | 1458 |
| 1-3b TUL 1-0.3 mM | NC_012660.1 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25 | 95 | 1535 |
| 2-3b TUL 1-1mM | NC_012660.1 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25 | 99 | 1530 |
| | NC_004129.6 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5 | 98 | 1496 |
| 4-1b TUL 2-0.6 mM | NC_006087.1 | <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> str. CTCB07 | 96 | 1205 |

| | | | | |
|-------------------|-------------------|--|-----|------|
| 6-2 TUL 2-1 mM | NC_012660.1 | <i>Pseudomonas fluorescens SBW25</i> | 99 | 1321 |
| | NC_004129.6 | <i>Pseudomonas fluorescens Pf-5</i> | 98 | 1288 |
| 7-1 ISI 1-0.6 mM | NZ_ADVQ01000001.1 | <i>Comamonas testosteroni CNB-2</i> | 99 | 1428 |
| | NC_013446.1 | <i>Comamonas testosteroni KF-1 ctg14069</i> | 99 | 1428 |
| 10-1 ISI 2-0.3 mM | | NO CONCLUYENTE | | |
| 10-3 ISI 2-0.3 mM | ADMS01000149.1 | <i>Achromobacter piechaudii ATCC 43553</i> | 99 | 1450 |
| 12-1b ISI 2-1 mM | NZ_ADVQ01000001.1 | <i>Comamonas testosteroni CNB-2</i> | 100 | 1428 |
| 13-1 CTN 1-0.3 mM | NZ_ACNO01000030.1 | <i>Rhodococcus erythropolis PR4</i> | 100 | 1206 |
| 25-1a CTN 2 | ADMS01000149.1 | <i>Achromobacter piechaudii ATCC 43553 contig00178</i> | 98 | 1354 |

Anexo 16. Cálculo de la pérdida de Cr, por la utilización de tubos de plástico durante la centrifugación para obtener el sobrenadante y cuantificar Cr total y Cr acumulado en las células de *Pseudomonas entomophila* L48 la cuantificación se realizó al tiempo 288 h, concentraciones en mg L⁻¹.

| | Cr (VI) Cultivo | Cr total Cultivo | Cr (VI) Sobrenadante | Cr total Sobrenadante | Cr (III)* Cultivo | Cr (III)* Sobrenadante | Cr (III)* Pérdida por material de centrifugacion |
|--------------------------|--------------------|---------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------|---------------------------|---|
| 1 Medio + Cr (VI) | 105.80 | 217.10 | 106.95 | 217.00 | 111.30 | 110.05 | 1.25 |
| 2 Medio + Cr (VI) | 105.77 | 218.90 | 106.81 | 218.75 | 113.13 | 111.94 | 1.19 |
| 3 Medio + Cr (VI) | 106.38 | 218.40 | 103.78 | 217.50 | 112.02 | 113.72 | 1.70 |
| Media | 105.98 | 218.13 | 105.85 | 217.75 | 112.15 | 111.90 | 1.38 |
| Dvstd | 0.34 | 0.93 | 1.79 | 0.90 | 0.92 | 1.84 | 0.28 |

*Cr (III)= Cr total-Cr (VI)

Anexo 17. Cálculo de la acumulación celular de Cr en *Pseudomonas entomophila* L48, concentraciones en mg L⁻¹.

| | Cr (VI) Cultivo | Cr total Cultivo | Cr (VI) Sobrenadante | Cr total Sobrenadante | Cr (III)* Cultivo | Cr (III)* Sobrenadante | Cr (III)* Pérdida de Cr (III) | Cr (III)* Acumulación celular (Pérdida de Cr (III)- Pérdida por material de |
|--|--------------------|---------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------|---------------------------|----------------------------------|--|
|--|--------------------|---------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------|---------------------------|----------------------------------|--|

Aislamiento e identificación de bacterias resistentes a sustancias tóxicas en sedimentos del río Lerma.
ANEXOS

| | | centrifugación) | | | | | | | |
|---|--|-----------------|--------|-------|--------|--------|--------|-------|-------|
| 1 | <i>Pseudomonas entomophila</i> L48 | 43.56 | 219.98 | 44.00 | 217.68 | 176.42 | 173.68 | 2.74 | 1.4 |
| 2 | <i>Pseudomonas entomophila</i> L48 | 40.04 | 217.17 | 41.65 | 220.84 | 177.13 | 179.19 | -2.06 | -3.4 |
| 3 | <i>Pseudomonas entomophila</i> L48 | 45.50 | 217.20 | 46.11 | 219.27 | 171.70 | 173.16 | -1.46 | -2.8 |
| | Media | 43.03 | 218.12 | 43.92 | 219.26 | 175.08 | 175.34 | -0.26 | -1.64 |
| | Dvstd | 2.77 | 1.61 | 2.23 | 1.58 | 2.95 | 3.34 | 2.62 | 2.62 |

*Cr (III)= Cr total-Cr (VI)