

## Aislamiento de bacterias resistentes y transformadoras de cr(vi) y metil parati6n

M. Islas Espinoza<sup>1</sup>, J. C. Vazquez Chagoyán<sup>2</sup>, R. Bojórquez Aguilar<sup>1</sup>, I. Linares  
Hernández<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro Interamericano de Recursos del Agua (CIRA), Universidad Aut6noma del  
Estado de México (UAEM)

<sup>2</sup>Centro de Investigaci6n y Estudios Avanzados en Salud Animal

### Resumen

**E**l río Lerma está poblado por diversas bacterias que se han vuelto resistentes a los contaminantes presentes. Algunas de estas bacterias son capaces de transformar algunos contaminantes a sustancias menos t6xicas. Tres cepas aisladas de sedimentos del Río Lerma resistieron concentraciones superiores a 207 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) y lo transformaron. La capacidad de transformaci6n del Cr(VI) en orden descendente fue: *Pseudomonas entomophila* L48 > *Pseudomonas cedrina* CFML 96-198 > *Pseudomonas graminis* DSM 11363. Por otro lado, ocho cepas con diferentes porcentajes de transformaci6n de metil parati6n (PM) fueron aisladas. Las cepas resistieron concentraciones superiores a 1,052 mg L<sup>-1</sup>. La capacidad de transformaci6n del PM en orden descendente fue: *Comamonas testosteroni* KS 0043 > *Achromobacter denitrificans* DSM 30026 > *Rhodococcus qingshengii* djl-6 > *Achromobacter spanius* LMG 5911 > *Pseudomonas meridiana* CMS 38 > *Pseudomonas veronii* CIP 104663 > *Pseudomonas nitroreducens* IAM 1439 > *Microbacterium esteraromaticum* DSM 8609. Estas bacterias presentan un potencial biotecnol6gico en la remediaci6n de cuerpos de agua o en tratamientos de agua para uso industrial.

## introducción

El Cr(VI) y el Metil Paratión (PM) son contaminantes de origen industrial y agrícola que se encuentran en el Río Lerma y que representan problemas para la salud pública. Existen propuestas para la remediación del río como las expresadas en el Plan Nacional de Desarrollo 2007-2012, sin embargo, éstas han sido insuficientes para evitar y controlar los problemas de contaminación. El agua del Río Lerma está poblada de diversos microorganismos que por presión selectiva se han hecho resistentes a los contaminantes presentes. En un análisis bacteriológico realizado en las localidades de Lerma y Atlacomulco se reporta la presencia de las siguientes especies en la columna de agua del río: *Enterococcus* sp., *Enterococcus faecium*, *Aeromonas hydrophila*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae*, y *Acinetobacter iwoffii* (Lima, 2007). Algunas de estas bacterias podrían ser capaces de degradar los contaminantes y transformarlos a sustancias menos tóxicas. En este sentido, las bacterias aisladas de los sedimentos (excepto las patogénicas) pueden ser utilizadas en la remediación de cuerpos de agua contaminados.

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 (Sotelo *et al.*, 2005). En este sentido, las descargas de diferentes orígenes que alimentan el río, 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 e inorgánicos que sirven de sustrato a algunas especies de comunidades microbianas. Los metales en el Río Lerma se encuentran asociados principalmente a los sólidos suspendidos y a los sedimentos (Ávila *et al.*, 1999), de ahí su potencial para encontrar bacterias resistentes a metales pesados. El cromo (Cr) es un metal pesado ampliamente utilizado en la industria para el curtido de pieles, electrogalvanizado, manufactura de pinturas y pigmentos, e industria de fertilizantes (Sotelo *et al.*, 2005). El Cr(VI) se encuentra generalmente bajo la forma de aniones cromatos o dicromatos solubles en agua. Por otra parte, el Cr(III) forma complejos altamente estables con gran cantidad de sustancias y puede ser encontrado en forma catiónica ( $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})^{+3}$ ,  $\text{Cr}(\text{OH})^{+2}$ ,  $\text{Cr}(\text{OH})^{+}$ ) o aniónica ( $\text{CrCl}^{-3}$ ,  $\text{Cr}(\text{OH})^{-}$ ). El Cr(III) es esencial para los mamíferos, mientras que el Cr(VI) es muy tóxico (Sahayam, 2002). Es por ello, que la reducción de Cr(VI) a Cr(III) representa la manera de descontaminar aguas o suelos con cromo

hexavalente. La dosis letal 50 ( $LD_{50}$ ) en mamíferos es de 3-30  $mg\ kg^{-1}$  de peso corporal (Singh & Walker, 2006) y dada su peligrosidad en humanos, diversas agencias regulatorias (*International Agency for Research on Cancer* (IARC) y la Organización Mundial de la Salud (OMS)), clasifican al Cr(VI) como un tóxico de atención prioritaria (IARC, 2008; WHO, 1996).

La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos de América (EPA, 2010) establece una concentración máxima permitida de 0.1  $mg\ L^{-1}$  de Cr total para agua potable. La OMS establece que el valor de 50  $\mu g\ L^{-1}$  de Cr(VI) es demasiado alto, comparado con su alto riesgo carcinogénico por inhalación y su genotoxicidad (WHO, 1996). En el caso del Río Lerma se han reportado concentraciones de hasta 297  $mg\ kg^{-1}$  en sedimentos (Zarazúa, 2008), las cuales superan con creces las normas de la EPA y la OMS.

Por otro lado, los plaguicidas mayormente usados a nivel mundial son los organofosforados, representando más de 36% del total del mercado (Kanekar *et al.*, 2004). El Metil Paratión (O,O-dimetil O-4-nitrofenilfosforotioato) (PM) es un insecticida organofosforado no selectivo utilizado ampliamente en la agricultura del Valle de Toluca que llega por filtración y escorrentía a los cauces del Río Lerma. Se han analizado las concentraciones de PM en muestras de sedimentos e invertebrados de la presa Ignacio Ramírez que es uno de los abastecedores de agua de este río, reportando su presencia en alta concentración en sedimento (0.013 y 0.001  $mg\ kg^{-1}$ ) en época de secas (De la Vega-Salazar *et al.*, 1999). El PM es rápidamente absorbido vía oral, dermal y por inhalación, luego se distribuye en los tejidos del cuerpo humano pudiendo causar dolor de cabeza, mareos, ansiedad, confusión mental, convulsiones y coma, además de depresión del centro respiratorio (WHO, 1986). La inmunotoxicidad de los compuestos organofosforados en humanos y animales silvestres ha sido revisada por Galloway y Handy (2003). La dosis letal 50 ( $LD_{50}$ ) en mamíferos es de 3-30  $mg\ kg^{-1}$  de peso corporal (Singh & Walker, 2006). El PM tiene una vida media de 25 a 130 días y puede ser degradado por la luz solar, sin embargo, esto dependerá de factores ambientales como pH, temperatura y carga microbiana. Si el PM se encuentra en altas cantidades puede tardar años en degradarse (EXTOXNET, 1996).

Por tal motivo, este estudio se enfocó en el muestreo, aislamiento, selección e identificación de bacterias de sedimentos del Río Lerma capaces de transformar el Cr(VI) y PM a sustancias menos tóxicas para ser aplicadas en sistemas de biorremediación.

## Métodos

El muestreo de sedimento se realizó en abril del 2009, se eligieron tres sitios del Río Lerma cercanos a zonas industriales y agrícolas altamente contaminados (Fall *et al.*, 2007). Los puntos de muestreo se describen en la Tabla 7.1.

**Tabla 7.1 Sitios de obtención de sedimento del Río Lerma**

Ubicación del sitio de muestreo	Coordenadas			
	*UTM		Geográficas	
	LATITUD	LONGITUD	LATITUD	LONGITUD
(a) Calle Alfredo del Mazo y Villa Mar, Puente peatonal Tultepec, Tultepec, México.	448303	2117578	19o9'.044"	99o29'.044"
(b) Puente peatonal, Col. Isidro Fabela, 500 m aguas arriba de la empresa Reciclagua, Lerma, México.	431052	2132630	19o17'.174"	99o39'.373"
(c) Puente sobre el Río Lerma, a lo largo de la carretera Toluca-Naucalpan, Toluca, México.	441678	2142669	19o22'.637"	99o33'.323"

Fuente:

\*:Universal Transversal de Mercator.

De cada sitio, se tomó una muestra compuesta, en la cual se mezclaron los sedimentos de tres puntos a lo ancho del río utilizando los puentes peatonales para tener acceso y asegurar la draga. Cada punto de muestreo recibía diferentes descargas, así que las condiciones de las muestras de sedimento para el aislamiento de las bacterias fueron heterogéneas.

Inicialmente se sembraron 5 g de sedimento de cada punto de muestreo en 50 mL de Medio Mínimo de Sales (MSM), composición (mg L<sup>-1</sup>): 11, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 14, CaCl<sub>2</sub>; 340, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 670, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 22, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O; y 500, NH<sub>4</sub>Cl. La incubación en medio líquido se llevó a cabo en un agitador orbital a 100 rpm a temperatura ambiente (20-23°C) durante dos semanas. Antes de aclimatar a la comunidad bacteriana al Cr(VI) y PM, se realizaron seis resiembras de tres días cada una para eliminar las partículas de sedimento. Después de esta etapa y en adelante se utilizó para el cultivo de bacterias resistentes a Cr(VI) un Medio de Trypticaseína y Soya (MTS) composición (g L<sup>-1</sup>): 15, peptona de caseína; 5, peptona de soya; 5, NaCl. Para el cultivo de bacterias resistentes a PM se utilizó un Medio Mínimo de Sales Modificado (MMSM) composición (mg L<sup>-1</sup>): 11, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 187, KCl; 320, NaCl; 14, CaCl<sub>2</sub>; 22, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O; 500, peptona. Para la selección de bacterias resistentes se realizaron cinco resiembras de tres días con 50 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) en MTS y 16 mg L<sup>-1</sup> de PM en MMSM. Posteriormente,

se inoculó 1 mL de cada cultivo en matraces con MTS adicionados con 83, 208, 415 y 830 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI); y 53, 79, 158 y 263 mg L<sup>-1</sup> de PM. La obtención de bacterias resistentes a Cr(VI) se llevó a cabo por ciclos de siembra en placa en MTS más 15 g L<sup>-1</sup> de agar-agar y 41.5 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) hasta obtener colonias morfológicamente distintas. La obtención de bacterias resistentes a PM se llevó a cabo por ciclos de siembra en placa en MMSM más 15 g L<sup>-1</sup> de agar-agar y 53 mg L<sup>-1</sup> de PM.

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) se sembraron las cepas puras (1 mL de inóculo) en MTS por triplicado con concentraciones en un rango de 0-830 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI), y para PM se utilizó (1 mL de inóculo) MMS por triplicado con concentraciones de 0-1,316 mg L<sup>-1</sup> de PM. Se contaron las células los días 0 y 7 con una cámara de Neubauer. Se consideró como CMI la concentración hasta la cual no hubo crecimiento al día siete de incubación.

Para determinar el porcentaje de reducción de Cr(VI) se sembraron las cepas por triplicado en MTS con 164 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) (Farag & Zaki, 2010) y 1 mL de inóculo de 48 h de incubación, un control positivo (MTS+Cr(VI), sin inóculo), un control positivo con agua (H<sub>2</sub>O+Cr(VI)) y un control negativo (MTS). Las concentraciones de Cr(VI) y Cr total se midieron los días 0 y 7 con el método de la difenil carbazida (APHA 1998). Se tomaron submuestras de 4 mL a diferentes tiempos (h): 0, 48, 56, 72, 80, 96, 104, 120, 128, 144, 152, 168, 176, 192, 216, 240, 264 y 288 para cuantificar el crecimiento bacteriano por Densidad Óptica (DO) a 600 nm de absorbancia en un espectrofotómetro. 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 separando la biomasa y el sobrenadante. Para medir el Cr(VI) se colocó el sobrenadante en un matraz de 10 mL, se añadieron 200 µL de solución de difenil carbazida, una gota de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y se aforó con agua destilada, se mezcló suavemente por inversión y se midió a 543 nm. Al finalizar el tiempo de incubación, se midió el Cr total, realizando una oxidación con dicromato de potasio.

Para determinar el porcentaje de transformación de PM se sembraron las cepas por triplicado en MMSM+MTS con 197 mg L<sup>-1</sup> de PM (Pradnya *et al.*, 2004) y 1 mL de inóculo de 48 h de incubación, un control positivo (MMSM+MTS+PM, sin inóculo) y un control negativo (MMSM+MTS). Las concentraciones de fosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) se midieron con el método de azul de molibdeno los días 0 y 7 (APHA, 1998). Los valores residuales de fosfato se utilizaron como un método indirecto de la degradación de PM. Se tomaron submuestras de 4 mL a diferentes tiempos (h): 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 264, 288, 312, 336 y 672 para medir el crecimiento bacteriano por DO a 600 nm. 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 medir el PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, se colocó el sobrenadante en un vial, se añadió agua destilada hasta 25 mL y un sobre de reac-

tivo para la reacción de azul de molibdeno, se mezcló vigorosamente por inversión. Después de dos minutos de reacción se midió la absorbancia en un espectrofotómetro HACH® modelo DR 2000 a 890 nm.

Después de obtener el porcentaje de transformación de Cr(VI) y de PM, se eligió para cada contaminante la cepa con mayor capacidad de transformación y se determinó su cinética, utilizando MTS con 166 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) y MMSM+MTS con 197 mg L<sup>-1</sup> de PM. Se midieron las concentraciones de Cr(VI) (Conc), PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> y DO de los cultivos bacterianos, en un espectrofotómetro UV-Visible, Varian® modelo Cary 1E. Adicionalmente, se evaluaron los contenidos de Cr(VI) acumulados en los tejidos de las células bacterianas, midiendo el Cr(VI) que se obtuvo después de un proceso de centrifugación de los tubos con colonias.

La identificación molecular de las bacterias se realizó obteniendo el ADN de cada cepa aislada con un kit de extracción (*Ultraclean Soil DNA isolation, Mo Bio Laboratories, Inc.*). La amplificación del gen ARNr 16S se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Los oligonucleótidos iniciadores de la reacción fueron: sentido 63F (5'-3': CAGGCCTAACACATGCAAGTC) y contrasentido 1389R (5'-3': ACGGCGGTGTGTACAAG) Sigma® (Osborn *et al.*, 2000). La amplificación del gen ARNr 16S y la secuenciación del amplicón fueron realizados por MacroGen Corp. Las secuencias obtenidas fueron alineadas y analizadas con el *software* Mega 4 © (Tamura *et al.*, 2008). Las secuencias corregidas fueron ingresadas en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), para obtener los porcentajes de similitud entre la secuencia corregida y las secuencias del gen ARNr 16S del BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). La importancia de la obtención de cepas puras y su identificación permite hacer análisis específicos en cepas adaptadas a condiciones fisicoquímicas y biológicas particulares, tales como las del Río Lerma, además de que amplía el conocimiento de la diversidad bacteriológica de interés biotecnológico en los sedimentos, así como el manejo adecuado de las cepas respecto a su peligrosidad y dispersión.

## Resultados y discusión

### *Identificación y selección de bacterias resistentes a Cr(VI) y PM*

Se obtuvieron seis cepas resistentes a Cr(VI) y ocho resistentes a PM. La mayor parte de las especies identificadas en este estudio fueron saprófitas y epífitas. No hay reportes de patogenicidad respecto a estas especies por lo que podrían ser utilizadas en pruebas de biorremediación. Las características morfológicas, fisiológicas y bio-

químicas de las cepas aisladas resistentes a Cr(VI) ya fueron reportadas en un trabajo previo (Islas-Espinoza & Bojórquez, 2011). Después del análisis y corrección de las secuencias genéticas se obtuvieron las siguientes especies (Tabla 7.2):

**Tabla 7.2 Identificación molecular, % de similitud, número de acceso y concentración mínima inhibitoria de bacterias resistentes a Cr(VI)**

<i>Organismo relacionado</i>	<i>% Similitud</i>	<i>Número de Acceso</i>	<i>CMI mg L-1</i>
<i>Pseudomonas cedrina</i> CFML 96-198	98	NR_024912.1	830 ± 3.02
<i>Comamonas testosteroni</i> KS 0043	98	NR_029161.1	414 ± 2.46
<i>Enterobacter cancerogenus</i> LMG 2693	98	NR_044977.1	610 ± 4.32
<i>Pseudomonas libanensis</i> CIP 105460	99	AB506040.1	207± 2.14
<i>Pseudomonas graminis</i> DSM 11363	98	NR_026395.1	610± 5.03
<i>Pseudomonas entomophila</i> L48	98	PSEEN008.7	610± 6.22

Fuente:

De las seis cepas aisladas resistentes a Cr(VI), cuatro resultaron ser del género *Pseudomonas*. Ya existen reportes acerca de varias especies de *Pseudomonas* resistentes a cromatos (Bader, 1999). Sin embargo, en el presente estudio se encontraron especies de *Pseudomonas* que no habían sido reportadas con anterioridad. Asimismo, se encontraron las cepas: *Comamonas testosteroni* KS 0043 y *Enterobacter cancerogenus* LMG 2693 que tampoco habían sido reportadas previamente como resistentes a Cr(VI).

El género *Pseudomonas* presenta sistemas de resistencia a metales pesados codificados en sus genes (Aguilar-Barajas *et al.*, 2010). El gen ChrA es el responsable de la traslocación de los aniones cromatos hacia afuera de la membrana celular. En diferentes bacterias, la reducción de cromatos es tanto aeróbica como anaeróbica (pero no ambas) y es llevada a cabo por proteínas solubles o por membranas celulares (Cervantes & Silver, 1992). Algunas bacterias cromato-resistentes son capaces de reducir Cr(VI) a Cr(III) usando una variedad de donadores de electrones (Wang & Shen, 1995). La identificación del primer microorganismo capaz de reducir Cr(VI) a Cr(III) fue en 1970 (Romanenko & Korenkov, 1977), posteriormente otros géneros han sido identificados (Cheung & Gu, 2007).

En el presente estudio tres de ocho especies de bacterias resistentes a PM, también fueron del género *Pseudomonas* (Tabla 7.3), lo que concuerda con otros estudios donde han encontrado especies de este género, entre ellas: *P. fluorescens*, *Pseudomonas* sp. y *P. putida* (Abo-Amer, 2011; Fang-Bo *et al.*, 2006). En estudios realizados en México, Ortiz *et al.*,

(2001) reportan la actividad biodegradadora de cinco bacterias aisladas de suelo agrícola, cuya degradación de PM de mayor a menor es: *Pseudomonas aeruginosa* > *Klebsiella pneumoniae* > *Burkholderia cepacia* > *Enterobacter sakazakii* > *Citribacter freundii*.

En este estudio, se encontraron las especies *Achromobacter spanius* y *Rhodococcus qingshengii*, las cuales no han sido reportadas en otros estudios, pero cuyos géneros sí han reportado capacidad para degradar plaguicidas organofosforados (Chen *et al.*, 2002; Vidali, 2001).

**Tabla 7.3 Identificación molecular, % de similitud, número de acceso y concentración mínima inhibitoria de bacterias resistentes a PM**

<i>Organismo relacionado</i>	<i>% Similitud</i>	<i>Número de Acceso</i>	<i>CMI mg L-1</i>
<i>Pseudomonas meridiana</i> CMS 38	98	NR_025587.1	1052 ± 7.09
<i>Pseudomonas veronii</i> CIP 104663	99	NR_028706.1	1316 ± 8.56
<i>Microbacterium esteraromaticum</i> DSM 8609	98	NR_026468.1	1316 ± 9.12
<i>Comamonas testosteroni</i> KS 0043	99	NR_029161.1	1316 ± 4.50
<i>Pseudomonas nitroreducens</i> IAM 1439	98	NR_042435.1	1316 ± 5.33
<i>Achromobacter spanius</i> LMG 5911	99	NR_025686.1	1316 ± 6.82
<i>Rhodococcus qingshengii</i> djl-6	99	NR_043535.1	1316 ± 11.13
<i>Achromobacter denitrificans</i> DSM 30026	99	NR_042021.1	1316 ± 8.05

Fuente:

En el presente estudio *Comamonas testosteroni* KS 0043 fue resistente tanto a Cr(VI) como a PM. Ying-Fei *et al.* (2009) analizaron el genoma completo de la especie *Comamonas testosteroni* mostrando que tiene muchos genes para transporte (22%) y transducción de señales (6%), los cuales permiten a la célula responder y adaptarse a diferentes ambientes. Esta especie no asimila los carbohidratos debido a la falta de genes productores de proteínas involucradas en la glucólisis y la ruta de la fosfato pentosa, y contiene muchos genes productores de proteínas involucradas en la degradación de compuestos aromáticos. Es importante notar que la doble resistencia de la bacteria *Comamonas testosteroni* a Cr(VI) y PM sugiere que tiene una capacidad de adaptación a mezclas de contaminantes.

### *Concentración mínima inhibitoria de las bacterias a Cr(VI) y PM*

La CMI de la cepas resistentes a Cr(VI) varió de 207-829 mg L<sup>-1</sup> (Tabla 7.2). Srinath *et al.* (2002) reportan CMI superiores a 151 mg L<sup>-1</sup> en 13% de las cepas aisladas, a

diferencia del presente estudio donde la CMI fue mayor a 250 mg L<sup>-1</sup> en cinco de seis cepas aisladas (83.3%).

La CMI para las bacterias resistentes a PM fue de 1052 a 1316 mg L<sup>-1</sup> de PM (Tabla 7.3). Respecto a este indicador, Pakala *et al.* (2006) reportan una concentración máxima de crecimiento para *Serratia* sp. de 592 mg L<sup>-1</sup> de PM, la cual es menor a la encontrada en las cepas aisladas en este estudio.

Una causa de la mayor resistencia de las bacterias al Cr(VI) y PM podría ser la presencia de más altas concentraciones de estos contaminantes en el Río Lerma que en cuerpos de agua reportados en otros estudios.

### *Biotransformación del Cr(VI)*

Las cepas *Pseudomonas entomophila* L48, *Pseudomonas cedrina* CFML 96-198 y *Pseudomonas graminis* DSM 11363, fueron capaces de transformar el Cr(VI), sin embargo, *Enterobacter cancerogenus* LMG 2693, *Comamonas testosteroni* KS 0043 y *Pseudomonas libanensis* CIP 105460 fueron resistentes a su presencia, pero que no pudieron transformarlo (Tabla 7.4). Recientemente, Parameswari *et al.* (2009) examinaron a la especie *Pseudomonas fluorescens* aislada de un suelo contaminado con metales pesados y encontraron una reducción de 52 a 61% de Cr(VI) a Cr (III) a diferentes valores de pH. En el presente estudio, se midió la eliminación de Cr en su forma hexavalente, pero no se determinó cuál fue el mecanismo utilizado por las bacterias, se asume que la biorreducción pudo ser el principal mecanismo, ya que el Cr(VI) biosorbido (por sorción o absorción) en las células fue bajo (Tabla 7.4).

**Tabla 7.4 Porcentaje de eliminación de Cr(VI) en las cepas aisladas**

<i>Organismo</i>	<i>Concentración inicial (mg L<sup>-1</sup> Cr(VI))</i>		<i>Concentración final (mg L<sup>-1</sup> Cr(VI))</i>		<i>% Transformación de Cr(VI)</i>
	<i>Media</i>	<i>E std</i>	<i>Media</i>	<i>E std</i>	
<i>Pseudomonas entomophila</i> L48	189.12	5.75	111.96	3.73	23.59%
<i>Pseudomonas cedrina</i> CFML 96-198	142.93	4.27	89.06	10.82	20.48%
<i>Pseudomonas graminis</i> DSM 11363	115.64	1.52	72.93	8.96	19.72%
<i>Enterobacter cancerogenus</i> LMG 2693	109.84	3.96	92.46	10.09	BS
<i>Comamonas testosteroni</i> KS 0043	127.96	2.62	127.81	14.33	BS
<i>Pseudomonas libanensis</i> CIP 105460	149.11	3.02	137.87	6.44	BS

Fuente:

BS: la biosorción explica la diferencia de concentración de Cr(VI) inicial y final. E std: error estándar.

Existen reportes previos sobre la resistencia y reducción de Cr(VI) por *Enterobacter cloacae* (Wang *et al.*, 1989). Algunas cepas de *Comamonas* han sido aisladas de sitios contaminados con metales y han sido identificadas como resistentes a Cr(VI) (Thuý, 2003), sin embargo, la variedad encontrada en el Río Lerma no corresponde con las variedades reportadas.

### *Biotransformación del PM*

El porcentaje de biotransformación del PM de las cepas resistentes a PM medido por los fosfatos residuales fue bajo (Tabla 7.5).

**Tabla 7.5 Porcentajes de biotransformación de PM en las cepas aisladas**

<i>Organismo</i>	<i>Conc. inicial (mg L-1 PO43-)</i>		<i>Conc. final (mg L-1 PO43-)</i>		<i>% Biotransfor- mación de PM</i>
	<i>Media</i>	<i>E std</i>	<i>Media</i>	<i>E std</i>	
<i>Comamonas testosteroni</i> KS 0043	25.6	3.40	33.92	0.77	11.68%
<i>Achromobacter denitrificans</i> DSM 30026	25.6	1.13	30.67	0.20	7.12%
<i>Rhodococcus qingshengii</i> djl-6	25.6	1.15	29.08	1.10	4.89%
<i>Achromobacter spanius</i> LMG 5911	25.6	2.25	28.25	0.30	3.72%
<i>Pseudomonas meridiana</i> CMS 38	26.3	1.32	27.75	0.05	2.04%
<i>Pseudomonas veronii</i> CIP 104663	24.2	0.80	25.42	0.13	1.71%
<i>Pseudomonas nitroreducens</i> IAM 1439	25.6	1.94	26.42	0.48	1.15%
<i>Microbacterium esteraromaticum</i> DSM 8609	25.5	2.32	25.58	1.40	0.11%

Fuente:

Existen dos clases de degradación de plaguicidas: cometabolismo y catabolismo. El cometabolismo frecuentemente provoca una degradación incompleta del plaguicida y en consecuencia se acumulan sus metabolitos. En el caso del catabolismo los microorganismos pueden utilizar PM como única fuente de carbono, fósforo u otro bioelemento necesario. Las ruta completa de degradación del paratión es conocida, pero las rutas para otros compuestos organofosforados como el PM aun no han sido

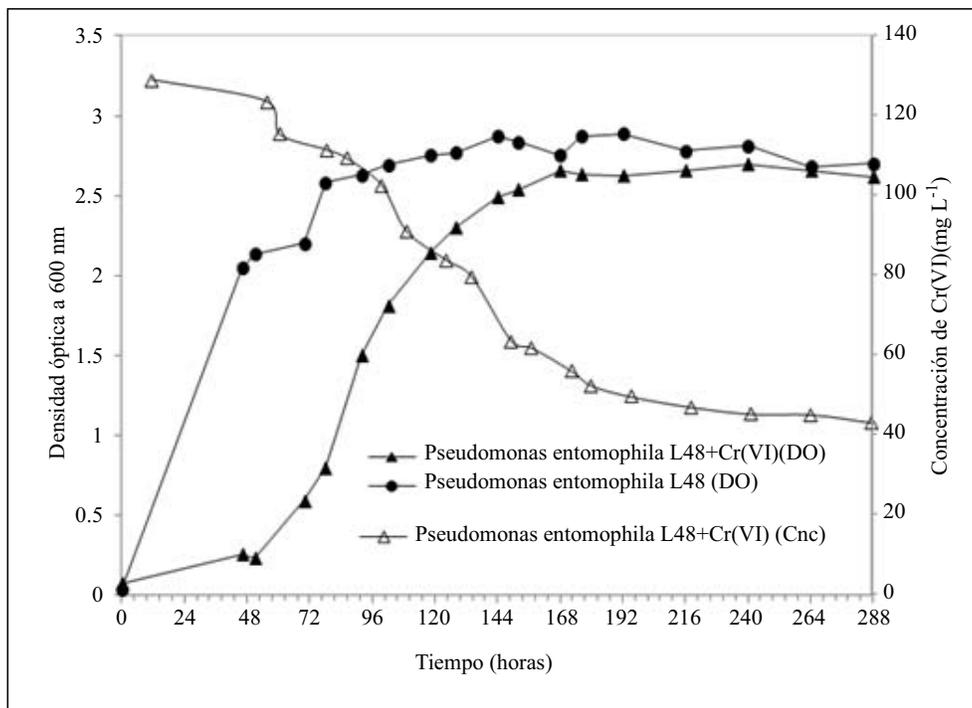
completadas (Singh & Walker, 2006). Para el caso de *Pseudomonas* sp., éstas son capaces de hidrolizar PM a p-nitrofenol y fosfato (Rani & Lalithakumari, 1994).

*Microbacterium esteraromaticum* y *Rhodococcus* son otras bacterias capaces de hidrolizar PM y otros compuestos organofosforados (Cáceres *et al.*, 2009; Kitagawa *et al.*, 2004).

### Cinética de transformación del Cr(VI)

Se determinó el crecimiento de la cepa *Pseudomonas entomophila* L48 por densidad óptica utilizando una concentración de Cr(VI) de 164 mg L<sup>-1</sup> (Fig. 7.1).

**Fig. 7.1** Cinética de crecimiento de la cepa *Pseudomonas entomophila* L48 con y sin contaminante, así como la concentración de Cr(VI) durante el experimento.



Fuente:

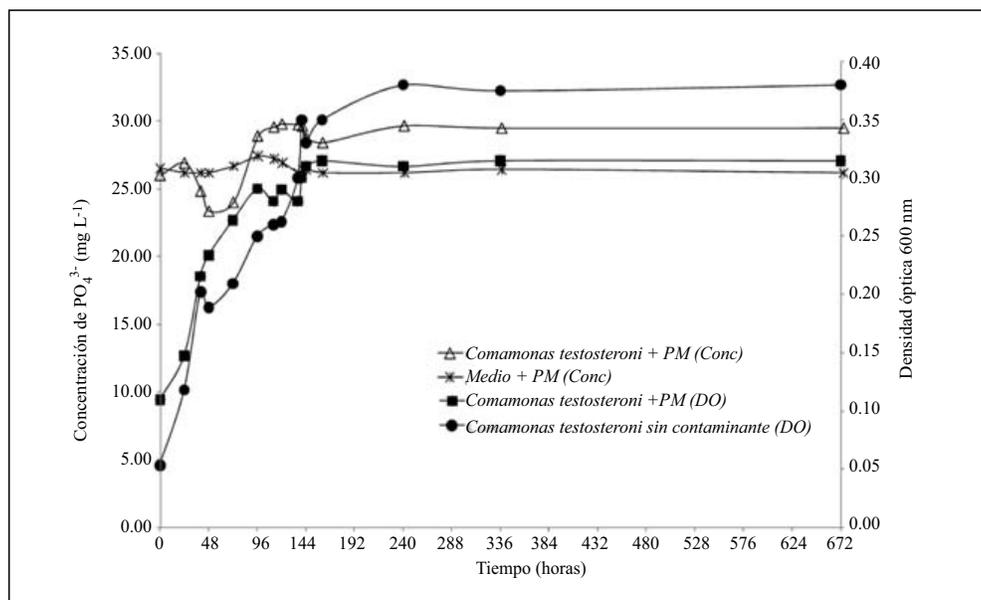
Srinath *et al.* (2002) encuentran que existe una diferencia de aproximadamente 50% entre la biomasa máxima con y sin contaminante para las cepas *B. megaterium* y *B. circulans*. En el caso de este estudio, la presencia de Cr(VI) retrasó el inicio de la fase exponencial y de adaptación de la cepa *Pseudomonas entomophila* L48, pero la biomasa final fue la misma.

En lo que concierne a la transformación de Cr(VI), algunos trabajos coinciden en una eliminación de la concentración entre 80-98%, con una fase estacionaria entre 24-48 h (Dönmez & Koçberber, 2005), a diferencia de este estudio 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 de 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 (38° C), en esta investigación se trabajó a temperatura ambiente (18-20° C). Se cuantificó la cantidad de Cr total para evaluar la eficiencia total del sistema, y se recalculó el porcentaje de Cr(VI) por la especie *Pseudomonas entomophila* L48 utilizando CTS, el cual fue de 80.16% (partiendo de 164 mg L<sup>-1</sup>).

### Cinética de transformación del PM

Se cuantificó el crecimiento de la cepa *Comamonas testosteroni* KS 0043 por DO a 600 nm (Fig. 7.2) observándose una ligera diferencia entre el crecimiento de la cepa con y sin contaminante, sin embargo, esta diferencia se debió a la turbidez que genera el contaminante al ser añadido, lo cual se verificó con un conteo celular directo con cámara de Neubauer en ambas muestras.

**Fig. 7.2** Cinética de crecimiento y de transformación del PM (liberado como PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) (mg L<sup>-1</sup>) de la cepa *Comamonas testosteroni* KS 0043 con y sin contaminante.



Fuente:

La transformación del PM por *Comamonas testosteroni* en forma de  $\text{PO}_4^{3-}$  fue baja, resultando similar a la concentración del tratamiento control (sin presencia de biomasa). Al realizar la cinética de transformación de esta cepa se obtuvo una transformación máxima de 6.32% después de 10 días de incubación. El método de detección de fosfatos fue parcial, ya que los productos de degradación del PM son diversos y no pudieron ser detectados. Se sugiere repetir este experimento con un método cromatográfico (de gases o HPLC) para identificar los diferentes metabolitos.

## Conclusiones

Se identificaron seis especies de bacterias resistentes a Cr(VI) y ocho resistentes a PM de sedimentos del Río Lerma. La mayor parte de las especies encontradas en éste estudio fueron inocuas y ninguna ha sido reportada en otros estudios. Las cepas resistentes a Cr(VI) se reprodujeron en concentraciones de hasta  $207 \text{ mg L}^{-1}$ , siendo mayor a la reportada en otros trabajos. Se eligió la cepa *Pseudomonas entomophila* L48 para determinar la cinética de transformación del Cr(VI) obteniéndose una transformación de 33.59% a los 12 días. La transformación de PM medida por el método de  $\text{PO}_4^{3-}$  fue poco eficiente, detectando una transformación máxima de 6.32% con la bacteria *Comamonas testosteroni*. Estas cepas mostraron potencial biotecnológico para transformar Cr(VI) y PM a sustancias menos tóxicas en sistemas de biorremediación de agua.

## Referencias

- Abo-Amer AE (2011) "Characterization of a strain of *Pseudomonas putida* isolated from agricultural soil that degrades cadusafos (an organophosphorus pesticide)", en *World J Microbiology and Biotech.* DOI: 10.1007/s11274-011-0873-5
- Aguilar-Barajas E, Ramírez-Díaz MI, Riveros-Rosas H and Cervantes C (2010) "Heavy Metal Resistance in Pseudomonads", en *Pseudomonas*, Capítulo 9, 255-282, DOI: 10.1007/978-90-481-3909-5\_9
- APHA. American Public Health Association (1998) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (20th ed.). American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation. Washington DC

- Ávila PP, Balcázar M, Zarazúa GO, Barceló IQ, Díaz, CD (1999) “Heavy metals concentrations in water and bottom sediments of a Mexican reservoir”, en *Sci. Tot. Env.* 234:185-196
- Bader JL, Gonzalez G, Goodell PC, Ali AS, Pillai SD (1999) “Chromium-resistant bacterial populations from a site heavily contaminated with hexavalent chromium”, en *Water Air and Soil Pol.* 109:263-779
- Cabrera JA, Kurtz A, Sikora RA, Schouten A (2010) “Isolation and characterization of fenamiphos degrading Bacteria” en *Biodegradation* 21:1017–1027
- Cáceres TP, Megharaj M, Malik S, Beer M, Naidu R (2009) “Hydrolysis of fenamiphos and its toxic oxidation products by *Microbacterium* sp. in pure culture and groundwater”, en *Bioresource Technology* 100(10): 2732-2736
- Cervantes C & Silver S (1992) “Plasmid chromate resistance and chromate reduction”, en *Plasmid.* 27 (1):65-71
- Chen Y, Zhang X, Liu H, Wang Y, Xia X (2002) “Study on *Pseudomonas* sp. WBC-3 capable of complete degradation of methylparathion” en *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 42:490–497
- Cheung KH & Gu JD (2007) “Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: a review. Int”, en *Biod. and Biod.* 59:8-15
- De la Vega-Salazar MY, Martínez-Tabche L, Macías-García C, Díaz Pardo E (1999) “Methyl parathion impact on water, sediments and benthic macroinvertebrates from the Ignacio Ramirez Dam, México. Toxicol. Environ”, en *Chem.* 71:81–93
- Dönmez G & Koçberber N (2005) “Isolation of hexavalent chromium resistant bacteria from industrial saline effluents and their ability of bioaccumulation”, en *Enz. Microb. Tech.* 36:700-705
- Environmental Protection Agency (2010) Cromo (VI) en el agua potable. Oficina de agua de EPA (EPA 815-F-10-006) URL: [http://www.epa.gov/drink/contaminants/basicinformation/upload/Cromo-VI-enelaguapotable\\_QAs.pdf](http://www.epa.gov/drink/contaminants/basicinformation/upload/Cromo-VI-enelaguapotable_QAs.pdf). Consultado el 1 de marzo de 2012
- EXTOXNET (1996) Extension Toxicology Network. Methyl Parathion
- Fall C, Hinojosa-Peña A, Carreño-de-León MC (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.* 373:208-219
- Fang-Bo Y, Biao S, Shun-Peng L (2006) Isolation and Characterization of *Pseudomonas* sp. Strain ONBA-17 Degrading o-Nitriobenzaldehyde. *Cur. Microb.* (53):457-461

- Fara S & Zaki S (2010) Identification of bacterial strains from tannery effluent and reduction of hexavalent chromium. *Journal of Environmental Biology* 31(5): 877-882
- Galloway T & Handy R (2003) Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. *Ecotoxicology*. 12(1-4):345-63
- 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 el 20 febrero de 2012
- Islas-Espinoza M & Bojórquez-Aguilar R (2011) Bacterias reductoras de Cr<sup>+6</sup> y su potencial biotecnológico. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 27(3) 231-239
- Kitagawa W, Kimura N, Kamagata Y (2004) A Novel p-Nitrophenol degradation gene cluster from a Gram-positive bacterium, *Rhodococcus opacus* SAO101. *J. Bacteriol.* 186(15):4894–4902
- Lima JA (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. México
- Ortíz-Hernández ML, Monterosas-Brisson M, Yañez-Ocampo G, Sanchez-Salinas E (2001) Biodegradation of methyl-parathion by bacteria isolated of agricultural soil. *Rev. Int. Cont. Amb.* 17(3):147-155
- Osborn AM, Moore ER, Timmis KN (2000) An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Env. Microbiol.* 2(1):39-50
- Pakala SB, Gorla P, Pinjari AB, Krovidi RK, Baru R, Yanamandra M, Merrick M, 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.* DOI 10.1007/s00253-006-0595-z
- Parameswari E, Lakshmanan A, Thilagavathi T (2009) Biosorption of chromium (VI) and nickel (II) by bacterial isolates from an aqueous solution. *EJEAFChe* 8(3):150-156
- Pradnya PK, Bharati JB, Neelima MD, Seema SS (2004) Biodegradation of organophosphorus pesticides. *Proc. Indian natn Sci Acad* 70(1):57-70
- Rani NL & Lalithakumari D (1994) Degradation of methyl parathion by *Pseudomonas putida*. *Can. J. Microbiol.* 40:1000–1006
- Romanenko VI & Korenkov VN (1977) A pure culture of bacteria utilizing chromates and dichromates as hydrogen acceptors in growth under anaerobic conditions. *Mikrobiologiya* 46(3):414-417

- Sahayam AC (2002) Speciation of Cr(III) and Cr(VI) in potable waters by using activated neutral alumina as collector and ET-AAS for determination. *Anal. Bioanal. Chem.* 372:840–842
- Singh BK & Walker A (2006) Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* 30:428–471
- Sotelo Esthela, Cardona Nayeli, Fregoso Alejandra, Enriquez Carlos, Garrido Arturo, Caire Georgina, Cotler Helena (2005) Acciones estratégicas para la recuperación de la cuenca Lerma-Chapala: Recomendaciones técnicas para las diecinueve subcuencas Instituto Nacional de Ecología.
- Srinath T, Verma TP, Ramteke W, Garg SK (2002) Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. *Chemosphere* 48:427-435
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. Mega versión 4 © software 1993-2008
- Thúy HL, Quynh HK, Phương AV, Thi HP, Thu HNT (2003) Studying on microorganisms in heavy metal contaminated wastewater in the vùn chàng craft-settlement, nam đình. Institute of Biotechnology, NCST, URL: [http://www.idm.gov.vn/nguon\\_luc/xuat\\_ban/2003/21/t72.htm](http://www.idm.gov.vn/nguon_luc/xuat_ban/2003/21/t72.htm). Consultado en octubre 2011
- Vidali M (2001) Bioremediation. An overview. *Pure Appl. Chem.* 73(7):1163-1172
- Wang PC, Mori T, Komori K, Sasatsu M, Toda K, Ohtake H (1989) Isolation and characterization of an *Enterobacter cloacae* strain that reduces hexavalent chromium under anaerobic conditions. *Appl. Env. Microb.* 55:1665-1669
- Wang YT & Shen H (1995) Bacterial reduction of hexavalent chromium. *J. Ind. Microbiol.* 14:159-163
- WHO. World Health Organization (1986) Environmental Health Criteria, 63: Organophosphorus insecticides: a general introduction. Geneva, p. 112-140
- WHO. World Health Organization (1996) Chromium in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Geneva, 1996.
- Ying-Fei M, Yun Z, Jia-Yue Z, Dong-Wei C, Yongqian Z, Huajun Z, Sheng-Yue W, Cheng-Ying J, Guo-Ping Z, Shuang-Jiang L (2009) The complete genome of *Comamonas testosteroni* reveals its genetic adaptations to changing environments. *Appl. Env. Microbiol.* (75)21:6812-6819
- Zarazúa OG (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. México