

BACTERIAS REDUCTORAS DE Cr⁺⁶ Y SU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

Marina ISLAS-ESPINOZA* y Rocío BOJÓRQUEZ-AGUILAR

Centro Interamericano de Recursos del Agua, Universidad Autónoma del Estado de México, Carretera Toluca-Atlacomulco Km. 14.5, Toluca 50200, Edo. de México, México. *Correo electrónico; marinaislas@ymail.com

(Recibido junio 2010, aceptado junio 2011)

Palabras clave: bacterias resistentes, Cr⁺⁶, aislamiento, curso alto del río Lerma, reducción de Cr

RESUMEN

Las bacterias que sobreviven a las condiciones de mezcla de contaminantes del curso alto de la cuenca alta del río Lerma (CARL) requieren de un metabolismo especializado para poder sobrevivir. Bajo este precepto se tomaron sedimentos de tres sitios del CARL como fuente de bacterias resistentes a Cr⁺⁶. En el sitio identificado como Lerma se aislaron la mayor variabilidad de especies reductoras de Cr⁺⁶ dentro del grupo de bacterias seleccionadas. En Tultepec se aisló la mayor cantidad de bacterias reductoras de Cr⁺⁶. Se aislaron seis cepas morfológica y bioquímicamente diferentes de los sedimentos capaces de resistir concentraciones de hasta 1000 mg L⁻¹ de Cr⁺⁶ en medio líquido. Las cepas estudiadas fueron Gram negativas y presentaron una concentración mínima inhibitoria superior a la encontrada en otros trabajos. Estas cepas fueron capaces de reducir Cr⁺⁶ a Cr⁺³ en porcentajes entre 7 y 40, después de 7 días, sometidas a 200 mg L⁻¹ de Cr⁺⁶. La capacidad de transformación de cada cepa en orden descendente fue: F, A, B, C, E y D. Se estableció la cinética de reducción de la cepa F que presentó la mayor transformación de Cr⁺⁶ a Cr⁺³, obteniéndose una reducción del 33.59 % a los 12 días. La biomasa de la cepa F no fue afectada por la presencia de Cr⁺⁶. Es importante señalar que el medio de cultivo por sí mismo representó un medio abiótico de reducción de Cr⁺⁶ (17.21 %). La utilización del equipo API-20E fue útil en la determinación de algunas reacciones bioquímicas de las cepas, sin embargo, esta identificación no resultó concluyente ya que presentó porcentajes de similitud bajos (83.1 a 90.7 %). Estas cepas representan un potencial biotecnológico para su aplicación en sistemas de tratamiento para reducción de Cr⁺⁶ a Cr⁺³ e incluso en ensayos sobre otros metales pesados.

Key words: resistant bacteria, Cr⁺⁶, isolation, Cr⁺⁶-reduction, contaminated water body

ABSTRACT

Bacteria that survive the pollutant mixing conditions of the upper basin of the Lerma river (CARL) require a specialized metabolism for survival. Under this postulation, sediment was taken from three sites of the CARL as a source of bacteria resistant to Cr⁺⁶. At the site identified as Lerma, greater variability of species was found in the group of selected bacteria that reduced Cr⁺⁶. In Tultepec, the highest population of Cr⁺⁶ reducing bacteria was isolated. Six strains with different morphological and biochemical characteristics were isolated from the sediments. These strains tolerated concentrations up to 1000 mg L⁻¹ of Cr⁺⁶ in liquid media. Also they reduced Cr⁺⁶ to

Cr^{+3} in percentages between 7 and 40, following 7 days, supplemented with 200 mg L^{-1} of Cr^{+6} . The strains studied were Gram negative and showed a minimum inhibitory concentration greater than that found in other studies. The transformation capacity of each strain in descending order were: F, A, B, C, E and D. The kinetics of reduction of strain F showed the highest transformation of Cr^{+6} to Cr^{+3} , obtaining a reduction of 33.59 % at 12 days. The biomass of strain F was not affected by the presence of Cr^{+6} . It is important to note that the medium itself represented a reduction of Cr^{+6} (17.21 %). The use of the API-20E kit was helpful in determining some biochemical reactions of strains, however, this identification was not conclusive because it presented low percentages of similarity (83.1 to 90.7 %). These strains represent a potential of biotechnology for use in treatment systems to reduce Cr^{+6} to Cr^{+3} , and even in trials of other heavy metals.

INTRODUCCIÓN

Los problemas de contaminación de acuíferos a nivel mundial son motivo de preocupación y requieren opciones tecnológicas de remediación que permitan cubrir las demandas futuras y crecientes de agua. Uno de estos sitios contaminados corresponde al curso alto de la cuenca alta del río Lerma (CARL) que está ubicado dentro de la subcuenca Antonio Alzate (Cuenca río Lerma 1, según denominación publicada en el DOF con fecha 15 de octubre de 2003). Esta subcuenca se ubica al sur-oriente de la cuenca Lerma-Chapala y comprende el área de aportación al río Lerma, desde su nacimiento en la Laguna de Chignahuapan, municipio de Almoloya del Río, hasta la cortina de la presa José Antonio Alzate. Esta subcuenca está integrada por 22 municipios correspondientes al Estado de México, entre los que destaca la zona metropolitana de Toluca, conformada por los municipios de Toluca, Lerma, Metepec, Ocoyoacac, Xonacatlán y Zinacantepec. En esta subcuenca se ubica el corredor industrial Valle de Toluca-Lerma que es la segunda concentración industrial más grande en el Estado de México. La industria asentada alrededor de dicho corredor muestra un proceso de crecimiento acelerado y los tipos de actividad industrial de esta subcuenca se caracterizan por un consumo alto de agua durante sus procesos productivos, provocando con ello un aumento en los niveles de extracción registrados. Destacan en este corredor industrial la producción de alimentos, productos químicos derivados del petróleo y productos metálicos. También se observa una producción importante de textiles, madera, bebidas, hule y plástico, entre otros. Al elevado patrón industrial de consumo de agua, se agrega el problema del aporte de contaminantes al CARL, ocasionado por la insuficiente capacidad de tratamiento de las descargas industriales, los insuficientes niveles de reuso y la gran producción de aguas residuales municipales (SEMARNAT *et al.* 2007).

La contaminación del agua en el CARL se ha convertido en un problema de salud pública y a su vez han surgido diversas propuestas para su saneamiento. Los organismos públicos reguladores de agua han sugerido que los principales productores de aguas residuales en la subcuenca desarrollen sistemas de saneamiento, independientemente de su cuerpo receptor. Hasta el momento, no se ha vislumbrado la posibilidad de aislar a los microorganismos que se han adaptado a este medio acuático contaminado para aplicaciones en otros procesos. Dichos microorganismos resistentes a concentraciones elevadas de contaminantes podrían ser adaptables a procesos de tipo industrial o para el tratamiento de aguas residuales. En un tratamiento biológico de agua eficiente se requiere una acción microbiana especializada, la cual probablemente se pueda encontrar como una forma de adaptación biológica en el mismo río. Particularmente, las bacterias son ampliamente utilizadas en biotecnología debido a que poseen altas tasas de reproducción y de mutación, lo cual resulta en una gran diversidad de subespecies, adaptaciones y sistemas enzimáticos especializados.

En la subcuenca del CARL se han detectado fuertes concentraciones de metales en varias secciones del río. La zona que presenta la mayor cantidad de metales es la de México-Toluca y Tultepec, en donde se encuentra la máxima acumulación de metales en sedimento y se considera que la contaminación es principalmente industrial (Fall *et al.* 2007). La concentración de metales está controlada principalmente por las variaciones de caudales en el río, por los arrastres de suelos aludaños y sedimentos de ríos tributarios, así como por aportes antrópicos. Los metales en el CARL se encuentran asociados principalmente a los sólidos suspendidos y a los sedimentos (Colombo *et al.* 1990), de ahí que se eligieran los sedimentos para el análisis prospectivo y así aprovechar el potencial de encontrar bacterias resistentes a metales,

particularmente al cromo hexavalente (Cr⁺⁶). El cromo hexavalente es un metal pesado ampliamente utilizado en la industria del corredor Valle de Toluca-Lerma (dentro del área del CARL), lo cual incluye curtido de pieles, electrogalvanizado, manufactura de pinturas y pigmentos, e industria de fertilizantes. El Cr⁺⁶ es muy soluble y tóxico para muchas plantas, animales y bacterias que habitan sistemas acuáticos, principalmente vertebrados mayores (McGrath y Smith 1990). La dosis letal 50 (LD₅₀) en ratones es de 137-177 mg kg⁻¹ de peso corporal (Saxena *et al.* 1990). Dada su peligrosidad, diversas agencias reguladoras como: International Agency for Research on Cancer (IARC), World Health Organization (WHO), Environmental Protection Agency (EPA) y Food and Drugs Administration (FDA), clasifican al Cr⁺⁶ como un tóxico prioritario (IARC 2008, WHO 2000, 2004, EPA 2008, FDA 2007, 2008). En el tratamiento de aguas residuales la concentración umbral inhibitoria sobre microorganismos heterotróficos para Cr total es de 10 mg L⁻¹ y para Cr⁺⁶ es de 1 mg L⁻¹ (Tchobanoglous *et al.* 2003). El Cr⁺⁶ inhibe la mayoría de las actividades enzimáticas bacterianas e induce mutaciones (Ehrlich 1986). Sin embargo, algunas especies de bacterias han sido encontradas sobreviviendo en sitios contaminados con Cr⁺⁶: *Pseudomonas putida* MK1 y *Escherichia coli* (Cheung y Gu 2007), *Pseudomonas aeruginosa* (Aguilera *et al.* 2004), *Shewanella alga* BrY-MT (Camargo *et al.* 2003), *E. coli* ATCC 33456 (Guha *et al.* 2001) y *Bacillus* spp. (Shakoori *et al.* 1999) y *Staphylococcus cohnii* que bioacumula Cr⁺⁶ a una concentración inicial de 1000 mg L⁻¹ (Donmez y Kocberber 2004).

En un estudio realizado por la Universidad Autónoma del Estado de México en colaboración con el Instituto de Investigaciones Nucleares (ININ), se determinó que las tres zonas de mayor contribución y acumulación de Cr en el CARL son: Tultepec, Mezapa y el puente de la carretera México-Toluca, en los meses de febrero y mayo. La concentración promedio de Cr en sedimento de la CARL durante el estudio fue de 297 mg kg⁻¹ (Zarazúa, 2008).

En este sentido, el objetivo de la presente investigación fue cultivar, aislar y seleccionar bacterias reductoras de Cr⁺⁶. Primeramente se hizo un análisis prospectivo de bacterias resistentes a altos niveles de Cr⁺⁶, tomando muestras de sedimentos de las tres zonas de mayor contribución y acumulación de Cr en el CARL. La composición química del agua en el CARL es compleja debido al origen variable de las aguas residuales que lo contaminan, por lo cual sólo se eligieron los tres sitios con mayor presencia

de Cr para la selección de las bacterias. En segundo lugar, se seleccionaron aquellas bacterias capaces de reducir el Cr⁺⁶ del agua. La intención de obtener bacterias resistentes y capaces de reducir el Cr⁺⁶, es explorar su potencial biotecnológico para depurar aguas residuales que contengan Cr en las plantas de tratamiento y así obtener aguas ya tratadas antes de ser descargadas al río.

MATERIALES Y MÉTODOS

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 del compuesto de interés. Gracias a esto se pueden obtener cultivos bacterianos en medios selectivos determinados. Dados los diversos orígenes de las descargas de agua en el CARL, se seleccionaron solamente los tres sitios registrados con la mayor contaminación por Cr⁺⁶ en los sedimentos (Ávila *et al.* 1999, Fall *et al.* 2007, Zarazúa 2008). Los sedimentos se han convertido en un gran almacén de metales pesados pues es donde se precipitan y acumulan debido a la mayor cantidad de materia orgánica. Además, 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. El muestreo de sedimento se realizó en abril del 2009 y los puntos de muestreo se ubicaron en: a) Tultepec: calle Alfredo del Mazo y Villa Mar, Puente peatonal Tultepec b) Lerma: puente peatonal, Col. Isidro Fabela, 500 m aguas arriba de la empresa Reciclagua y c) Toluca: puente de la carretera Toluca-Naucalpan (**Cuadro I**).

Las muestras de sedimento se colectaron con una draga tipo ponar. 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).

$$\frac{\text{UFC}}{\text{g sedimento}} = \frac{\text{UFC x placa}}{\text{lg sedimento inicial}} \times \frac{10\text{mL dilución}}{1\text{mL x placa}} \times \frac{1}{\text{Factor de dilución}} \quad (1)$$

CUADRO I. SITIOS DE OBTENCIÓN DE SEDIMENTO DEL RÍO LERMA

Ubicación del sitio de muestreo	Coordenadas			
	UTM		Geográficas	
	X	Y	Latitud	Longitud
(a) Tultepec, Edo. Méx.	2117578	448303	19°9'.044"	99°29'.044"
(b) Lerma, Edo. Méx.	2132630	431052	19°17'.174"	99°39'.373"
(c) Toluca, Edo. Méx.	2142669	441678	19°22'.637"	99°33'.323"

Inicialmente se sembró 20 % de cada muestra de sedimento en 50 mL de medio mínimo de sales (MSM), composición (mg L^{-1}): 11, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 14, CaCl_2 ; 340, KH_2PO_4 ; 670, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 22, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; y 500, NH_4Cl . La incubación en medio líquido se llevó a cabo en un agitador orbital a 100 rpm a temperatura ambiente (20-23 °C). Antes de aclimatar a la comunidad bacteriana al Cr^{+6} , se realizaron 6 resiembras para eliminar las partículas de sedimento. Después de esta etapa y en adelante se utilizó para el cultivo, medio tripticaseína y soya (MTS) composición (g L^{-1}): 15, peptona de caseína; 5, peptona de soya; 5, NaCl . Para la selección de bacterias resistentes se realizaron 5 resiembras en MTS con 50 mg L^{-1} de Cr^{+6} , posteriormente se inocularon con 10 % de cultivo en matraces con MTS estéril adicionados con 100, 250, 500 y 1000 mg L^{-1} de Cr^{+6} . La obtención de bacterias resistentes a Cr^{+6} se llevó a cabo por ciclos de siembra en placa en MTS más 15 g L^{-1} de agar-agar y 50 mg L^{-1} de Cr^{+6} , hasta obtener colonias morfológicamente distintas.

Para determinar la concentración mínima inhibidora (CMI), que es la concentración de contaminante en la cual no se observa crecimiento bacteriano, se sembraron las cepas puras con 1 % de inóculo en MTS por triplicado en concentraciones de 250, 300, 500, 750 y 1000 mg L^{-1} de Cr^{+6} y se contaron las células los días 0 y 7 de cultivo utilizando una cámara de Neubauer.

Para determinar el porcentaje de reducción de Cr^{+6} se sembraron las cepas por triplicado en MTS con 200 mg L^{-1} de Cr^{+6} y 1 % de inóculo, un testigo positivo (MTS+ Cr^{+6} sin inóculo), un testigo positivo con agua ($\text{H}_2\text{O}+\text{Cr}^{+6}$) y un testigo negativo (MTS). Las concentraciones de Cr^{+6} y Cr total se midieron los días 0 y 7 de cultivo, conforme a la APHA (APHA 1998).

Después de obtener el porcentaje de reducción de Cr^{+6} a Cr^{+3} , se eligió la cepa con mayor capacidad de reducción y se realizó su cinética, utilizando MTS con una concentración de 200 mg L^{-1} de Cr^{+6} . Se midieron las concentraciones de Cr^{+6} (Conc) y densidad óptica (DO) a 600 nm en un espectrofotómetro UV-Visible, Varian® modelo Cary 1E, para cuantificar el crecimiento bacteriano.

Para la caracterización bioquímica de las cepas aisladas se utilizó el equipo API 20E bioMerieux, Inc.®. El tamaño de las células se obtuvo con una retícula calibrada a $1 \mu\text{m}$. Se realizó además tinción de Gram y prueba oxidasa, así como observación *in vivo* en microscopio de contraste de fases y crecimiento sobre agar MacConkey. La identificación se llevó a cabo aplicando la base de datos incluida en el equipo API 20E contrastando con las características de cada especie dadas en el manual de clasificación de bacteriología sistemática de Bergey (Brenner *et al.* 2008).

RESULTADOS

Cuantificación de las comunidades bacterianas iniciales

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

CUADRO II. NÚMERO DE UFC/g DE SEDIMENTO

Muestra	UFC/g sedimento
(a) Tultepec, Edo. Méx.	294 118
(b) Lerma, Edo. Méx.	2 857 143
(c) Toluca, Edo. Méx.	1 904 762

Se obtuvieron un total de 12 cepas resistentes a Cr^{+6} , en los tres sitios de muestreo, de las cuales seis resultaron tener características distintas (A, B, C, D, E y F). Las cepas A, B, y F se aislaron del sitio denominado Lerma, las cepas D y E fueron aisladas del sitio denominado Tultepec, y la cepa C se encontró en el sitio denominado Toluca. En el sitio identificado como Lerma se encontró una mayor variabilidad de especies resistentes a Cr, dentro del

grupo de bacterias seleccionadas. En el sitio identificado como Tultepec se encontró la mayor cantidad de bacterias resistentes a Cr⁶⁺ dentro del grupo de bacterias seleccionadas. A continuación se muestra la proporción de la diversidad de especies resistentes a Cr⁶⁺ seleccionadas (**Cuadro III**).

CUADRO III. PROPORCIÓN DE BACTERIAS RESISTENTES A Cr⁶⁺ DE LAS CEPAS SELECCIONADAS EN LOS TRES SITIOS DE MUESTREO

Cepas bacterianas (ID)	Proporción (%)
A	14
B	14
C	5
D	29
E	24
F	14

Concentración mínima inhibidora de Cr⁶⁺ en cepas seleccionadas

La CMI para las bacterias resistentes a Cr⁶⁺ fueron: para la cepa D, 250 mg L⁻¹; para las cepas A, C, E y F, 500 mg L⁻¹ y para la cepa B, 1000 mg L⁻¹. Estas concentraciones fueron superiores a las reportadas por Srinath *et al.* (2002) que registran una CMI de 151 mg L⁻¹ (3.0 mM) sólo en el 13 % de las cepas aisladas, a diferencia del presente estudio en donde las CMI fueron mayores a 250 mg L⁻¹ (4.8 mM) para las 6 cepas aisladas.

Cinética de crecimiento y reducción de Cr⁶⁺

En la determinación del porcentaje de reducción de Cr⁶⁺ a Cr³⁺ (**Cuadro IV**), se obtuvo que la cepa más eficiente fue la F. Por lo que fue seleccionada para determinar el modelo cinético de reducción.

CUADRO IV. REDUCCIÓN DE Cr⁶⁺ (%) DE LAS CEPAS PURAS, DESPUÉS DE 7 DÍAS

Origen de la muestra	ID	%Reducción Cr ⁶⁺ →Cr ³⁺
Lerma	A	37.69 %
Lerma	B	36.93 %
Toluca	C	15.82 %
Tultepec	D	7.54 %
Tultepec	E	15.46 %
Lerma	F	40.80 %
	MTS+Cr ⁶⁺	17.21 %
	H ₂ O+Cr ⁶⁺	9.93 %

En la cinética de crecimiento y reducción de Cr⁶⁺ de la cepa F (**Fig. 1**) se observó que después del

doceavo día las concentraciones de Cr⁶⁺ se estabilizaron. La cepa F creció adecuadamente en presencia del contaminante, sin embargo, su crecimiento fue más lento en comparación con la misma cepa sin contaminante (testigo negativo). El porcentaje de reducción total de Cr⁶⁺ por la cepa F fue de 66 % al doceavo día, mientras que el del medio de cultivo se estableció entre 14 y 18 % de reducción máxima a partir del quinto día.

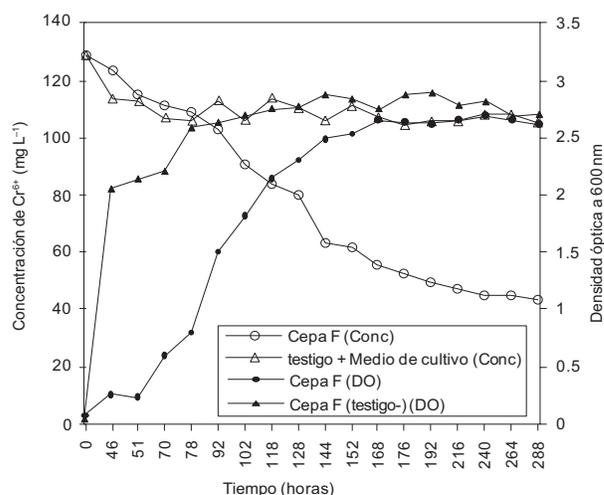


Fig. 1. Cinética de crecimiento y transformación de Cr⁶⁺ a Cr³⁺ de la cepa F

La presencia de Cr⁶⁺ aumentó la fase Lag (etapa de adaptación al medio) de la cepa F sembrada en el medio adicionado con Cr⁶⁺, esta reacción estuvo directamente relacionada con una mayor concentración del contaminante en el medio.

Caracterización morfológica, fisiológica y bioquímica de las cepas reductoras de Cr⁶⁺

En el grupo de bacterias reductoras de Cr⁶⁺ se encontraron bacterias entéricas en forma de bacilos (A, B, D, E, F) y cocobacilos (C) clasificadas como Gram negativas metabólicamente distintas. Algunas de estas bacterias fueron móviles (A, D, F) y otras inmóviles (B, C, E) (**Cuadro V**).

La cepa C dio positivo en la prueba de agar eosina y azul de metileno para bacterias como *Escherichia coli*, y *Klebsiella sp.* La colonia E presentó una agrupación de estreptobacilus y el resto de las cepas se agruparon como diplobacilus. Las colonias A, B, C, D y F presentaron una forma circular, en tanto que la cepa E fue irregular. Las cepas A y C presentaron una elevación convexa y el resto fueron lisas o planas. La caracterización bioquímica de las cepas utilizando el equipo API 20E proporcionó porcentajes de especies

CUADRO V. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, FISIOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE LAS CEPAS AISLADAS

Características Morfológicas/fisiológicas/bioquímicas	Cepas bacterianas					
	A	B	C	D	E	F
Tinción de Gram	-	-	-	-	-	-
Forma celular	B ¹	B	CB ²	B	B	B
Tamaño celular(μm)	1x.75	1.75x1	2x.75	1.5x1	1x0.5	1x0.5
Borde	Entero	Rizado	Entero	Rizado	Lobado	Rizado
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	88.3 %	87.6 %			90.7 %
<i>Bordetella/Alcaligenes/Moraxella</i> spp.			87.5 %		83.1 %	
<i>Pantoea</i> spp. 4				86.9 %		

¹B: Bacilar; ²CB: Cocobacilar; ³Porcentaje de certeza en la identificación utilizando el sistema API 20E

relacionadas entre 81.7 y 92.0 %, lo cual es limitado para establecer una identificación concluyente; sin embargo, utilizando la clasificación del sistema API 20E y analizando las características morfológicas de cada cepa se incluye una identificación presuntiva con especies como *Bordetella*, *Alcaligenes*, *Moraxella* spp. y *Pantoea* spp. 4.

DISCUSIÓN

En el sitio identificado como Lerma se encontró una mayor variabilidad de especies resistentes a Cr, probablemente por ser un sitio de los más contaminados, ya que se encuentra afectado por las descargas de las plantas de tratamiento de la zona de Lerma y las canalizadas por el río Atarasquillo, por lo que recibe gran cantidad y diversidad de aportes bacterianos y de contaminantes. En el sitio identificado como Tultepec se encontró la mayor cantidad de bacterias

resistentes a Cr⁺⁶ dentro del grupo de bacterias seleccionadas. Esta especialización funcional de las cepas se debe tal vez a que esta zona se encuentra afectada por las descargas de zonas agrícolas como Zinacantepec, que aportan mucha materia orgánica y las de plantas industriales como las de San Mateo Atenco cuya industria metal-mecánica domina la actividad económica y, por tanto, hay una especialización en descargas de metales. Estos cambios en la diversidad bacteriana son resultado de los aportes de contaminantes que llegan al CARL. Por ejemplo, Chaerum *et al.* (2010) determinaron que en suelos contaminados con aguas residuales con elevadas concentraciones de metales durante 31 años, la diversidad funcional, biomasa microbiana y la respiración aumentaron en comparación con suelos no contaminados. Esto pudo haber sucedido en los sitios donde la presencia de Cr, compensado con los aportes de materia orgánica ha inducido la especialización y la adaptación de especies bacterianas resistentes.

De acuerdo con otros estudios (Donmez y Kocberber 2004, Bader *et al.* 1999) el 80 % de las cepas aisladas en esta investigación resultaron resistentes a concentraciones superiores a 1000 mg L⁻¹, sin embargo, la CMI fue mayor a 250 mg L⁻¹ para todas las cepas aisladas, a diferencia de la calculada por Srinath *et al.* (2002) que reportan CMI superiores a 151 mg L⁻¹ sólo en el 13 % de las cepas que aislaron. Considerando la concentración umbral inhibidora sobre microorganismos heterótrofos para Cr⁺⁶ (1 mg L⁻¹), las cepas aisladas resultaron todas resistentes. Por lo tanto es factible aplicar las cepas aisladas en sistemas de tratamiento de agua, por su resistencia y capacidad de crecimiento aun en concentraciones elevadas de Cr⁺⁶.

Las cepas resistentes a Cr⁺⁶: A, B y F, fueron capaces de reducir Cr⁺⁶ a Cr⁺³. 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) estos resultaron menores que el medio de cultivo sin inóculo. Por lo tanto, las cepas C, D y E, fueron resistentes a la presencia de Cr⁺⁶ pero no pudieron transformarlo.

En lo que concierne a la transformación de Cr⁺⁶, algunos trabajos coinciden en una reducción de la concentración de Cr⁺⁶ en el sobrenadante entre 80-98 %, con una fase estacionaria entre 24-48 h (Donmez y Kocberber 2004, Srinath *et al.* 2002), a diferencia de este estudio, en donde la fase estacionaria se inició a las 168 h y la reducción mayor de Cr⁺⁶ para la cepa F 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⁺⁶ del 17.21%, el cual fue sustraído del porcentaje de reducción de Cr⁺⁶ de la cepa F. Para este caso la cantidad de biomasa final no fue muy 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 con y sin contaminante para las cepas *Bacillus megaterium* y *B. circulans*.

En este estudio la técnica de identificación bioquímica vía API 20E fue limitada y no concluyente. En este caso se sugiere realizar un análisis molecular que ayude a confirmar la identificación obtenida vía API 20E. Las características bioquímicas obtenidas en las

cepas aisladas en este estudio fueron distintas a las de las bacterias reportadas como reductoras de Cr⁺⁶ por otros autores, sin embargo, al igual que la presente investigación en varios estudios, las bacterias identificadas capaces de resistir altas concentraciones de Cr⁺⁶ pertenecen a la familia Enterobacteriaceae (Shakoori *et al.* 1999, Guha *et al.* 2001, Camargo *et al.* 2003, Aguilera *et al.* 2004, Cheung y Gu 2007). Esta familia de bacterias Gram negativas contiene más de 100 especies que pueden tener morfología de bacilos, cocobacilos y otros pleomórficos. Los miembros de esta familia forman parte de la microbiota del intestino (llamados coliformes) y de otros órganos del ser humano y de otras especies animales. Algunas especies pueden vivir en tierra, en sedimentos, plantas o en animales acuáticos. Son de fácil cultivo, oxidasa negativos, es decir, carecen de la enzima citocromo oxidasa, capaces de reducir nitrato en nitrito, son anaeróbicos facultativos, fermentadores de carbohidratos en condiciones anaeróbicas con o sin la producción de gas, muchos géneros tienen un flagelo que sirve para desplazarse, aunque algunos géneros no son móviles. Adicional a ello, las Enterobacteriaceae no forman esporas, algunas producen toxinas y pueden ser encapsuladas y son organismos catalasa positivos. Son quimioautótrofos, y necesitan para su crecimiento compuestos simples de carbono y nitrógeno, generalmente sólo con D-glucosa, aunque algunas requieren aminoácidos y vitaminas. La temperatura óptima de crecimiento es entre 22 y 37 °C.

Es importante señalar que al igual que las cepas reportadas en varios estudios como resistentes a Cr⁺⁶ (McLean *et al.* 2000, Valls *et al.* 2000, Aguilera *et al.* 2004, Donmez y Kocberber 2004, Vaneechoutte *et al.* 2004), se encontraron únicamente bacilos Gram negativos, esto puede deberse entre otros aspectos metabólicos, a la resistencia de su doble membrana celular ausente en las bacterias Gram positivas, así como a la capacidad de agruparse en pares o cadenas, común en los bacilos.

Respecto a las especies identificadas en este estudio y a 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⁺⁶. Filali *et al.* (1999) aislaron de agua residual a las cepas *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y *Staphylococcus*, bacterias que 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* muy resistente al Cd con capacidad de precipitarlo, por lo que se plantea a estos organismos como potenciales agentes para biorremediación de contaminación por metales pesados.

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. Las especies identificadas en este estudio son ambientales, saprófitas y epífitas.

CONCLUSIONES

Seis cepas Gram negativas con diferentes características morfológicas y bioquímicas fueron aisladas de sedimentos de tres sitios del CARL. Cinco de estas cepas fueron capaces de multiplicarse en concentraciones de hasta 500 mg L^{-1} de Cr^{+6} y sobrevivir a concentraciones de hasta $1,000 \text{ mg L}^{-1}$. Estas cepas resistentes a Cr^{+6} presentaron una concentración mínima inhibitoria mayor que la reportada en trabajos similares sobre microorganismos heterótrofos.

Se determinó que estas cepas redujeron Cr^{+6} a Cr^{+3} utilizando 200 mg L^{-1} de Cr^{+6} . La capacidad de reducción de cada cepa en orden descendente fue: F, A, B, C, E y D. Se eligió la cepa F para determinar la cinética de transformación del Cr^{+6} , obteniéndose una reducción a Cr^{+3} del 33.59 % a los 12 días. Es importante señalar que el medio de cultivo por sí mismo representó un medio abiótico de reducción de Cr^{+6} a Cr^{+3} del 17.21 %.

La utilización del equipo API-20E fue útil en la determinación de algunas reacciones bioquímicas de las cepas, pero no resultó concluyente para la identificación rápida de las bacterias encontradas en el presente estudio. Por ello, se usarán métodos de análisis molecular para una identificación más precisa de las cepas.

En el sitio identificado como Lerma se encontró la mayor variabilidad de especies resistentes a Cr^{+6} . En Tultepec se obtuvo la mayor cantidad de bacterias reductoras de Cr^{+6} a Cr^{+3} . Dichas cepas presentan un potencial biotecnológico en sistemas de tratamiento de agua para reducción de Cr^{+6} a Cr^{+3} y en pruebas para otros metales pesados.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Laboratorio de Calidad del Agua del Centro Interamericano de Recursos del Agua y al Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación de Estudios de Salud Animal por su apoyo técnico.

REFERENCIAS

- 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, 107-112.
- Anderl J.N., Franklin M.J. y Stewart P.S. (2000). Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. Antimicrob. Agen. Chemother. 44, pp. 1818-1824.
- APHA. American Public Health Association. (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20^a ed. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation. Washington, DC., EUA. 1325 pp.
- Ávila P. P., Balcázar M., Zarazúa G. O., Barceló I. Q. y Díaz C. D. (1999). Heavy metal concentrations in water and bottom sediments of a Mexican reservoir. Sci. Tot. Env. 234, 185-196.
- 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. Water Air Soil Pollut. 109, 263-779.
- Brenner D. J., Krieg N.R. y Staley J.T. (2008). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2^a ed. Springer. Michigan, EUA. 1106 pp.
- Camargo F. A. O., Okeke B. C., Bento F. M. y Frankenberg 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, 569-573.
- Chaerum S. K., Pangesti P. D., Toyota K. y Whitman W. (2010). Changes in microbial functional diversity and activity in paddy soils irrigated with industrial wastewaters in Bandung, West Java Province, Indonesia. Water Air Soil Pollut. DOI: 10.1007/s 11270-010-0603-x.
- 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, 8-15.

- Colombo C., Khalil F., Amac M., Horht C. y Catoggio A. (1990). The casual of the word toxic. *Env. Sci. and Tech.* 24, 498-505.
- 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, 700-705.
- Ehrlich H. L. (1986). Interactions of heavy metals and microorganisms. En: *Mineral Exploration: Biological Systems and Organic Matter* (D. Carlisle, Ed.). Prentice-Hall. Englewood Cliffs. EUA, pp. 221-237.
- EPA (2008). Designation of hazardous substances. Environmental Protection Agency, U.S. Code of Federal Regulations. 40 CFR 116.4. URL: <http://www.epa.gov/lawsregs/search/40cfr.html>. Consultado en abril 24, 2009.
- 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. Tot. Env.* 373, 208-219.
- FDA (2007). Beverages. Bottled water. Food and Drug Administration, 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.
- FDA (2008). EAFUS: A food additive database. Food and Drug Administration, U.S. URL: <http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/eafus.html>. Consultado en abril 24, 2009.
- 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, 51-156.
- 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, 209-218.
- IARC (2008). Agents reviewed by the IARC monographs: Volumes 1-99. Agency for Research on Cancer. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>. Consultado en abril 24, 2008.
- McGrath S. P. y Smith S. (1990). Chromium and nickel. En: *Heavy Metals in Soils* (B. J. Alloway, Ed.). Wiley. Nueva York. EUA, pp. 125-147.
- 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, 611-619.
- 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. Environ. Contam. Toxicol.* 45, 430-435.
- SEMARNAT, INE, CONAGUA, CONAFOR, IMTA y CONABIO. (2007). Diagnóstico socio-ambiental de la subcuenca Antonio Alzate. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Comisión Nacional del Agua, Comisión Nacional Forestal, Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- 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, 50-54.
- 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 3083-3087.
- Srinath T., Verma T., Ramteke P.W. y Garg S.K. (2002). Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. *Chemosphere* 48, 427-435.
- Sultana N., Saeed A.M. y Afzal M. (2003). Synthesis and antibacterial activity of cephradine metal complexes: complexes with magnesium, calcium, chromium and manganese. *Pak. J. of Pharm. Sci.* 16, 59-72.
- Tchobanoglous G., Burton F. L. y Stensel H. D. (2003). *Wastewater Engineering Treatment and Reuse*. 4a ed. McGraw-Hill. Illinois, EUA. 1819 pp.
- 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.
- 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. Syst. Evol. Microb.* 54, 317-327.
- WHO (2000). Air quality guidelines. World Health Organization, 2a ed. Ginebra, Suiza. URL: http://www.euro.who.int/document/aicq/6_4chromium.pdf. Consultado en mayo 14, 2008.
- WHO (2004). Guidelines for drinking-water quality. Vol. 1. Recommendations. World Health Organization, 3ra ed. Ginebra, Suiza. URL: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3/en. Consultado en marzo 08, 2006.
- Zarazúa G.O. (2008). 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. Tesis de Doctorado en Ingeniería. ININ, CIRA-UAEM.