

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

---

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA  
DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS  
(TERMÓFILAS) EN LA DEGRADACIÓN DE  
CONTAMINANTES RECALCITRANTES

INFORME TÉCNICO DE OPCIÓN CURRICULAR EN LA  
MODALIDAD DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
INGENIERO (A) BIOTECNÓLOGO

PRESENTA:

**LILIANA ELIZABETH ROSAS ROCHA**

DIRECTOR INTERNO: Dr. Enrique Durán Páramo

DIRECTOR EXTERNO: Dr. Claudia Guerrero Barajas

México, D. F. Mayo de 2007 .

## ÍNDICE

	Página
1. Introducción	4
2. Antecedentes	5
2.1 Bacterias Termófilas	5
2.2 Ventilal Hidrotermales	5
2.3 Dehalogenación	6
2.3.1 Mecanismos de Dehalogenación	6
2.4 Compuestos clorados	7
2.5 Degradación de compuestos clorados	8
2.5.1 Microorganismos que degradan compuestos clorados	9
3. Justificación	10
4. Objetivos	11
5. Materiales y Métodos	12
5.1 Experimentos de Actividad Metanogénica	12
5.1.1 Primer Experimento	12
5.1.2 Segundo Experimento	12
5.1.3 Tercer Experimento	13
5.2 Experimentos de Actividad Sulfato Reductora	13
5.3 Experimentos de Enriquecimiento	13
5.4 Experimentos de Toxicidad	14
5.5 Extracción de ADN	14
5.6 Electroforesis en Gel de Agarosa	14
5.7 Amplificación de Genes RDH (PCR)	15
6. Resultados	16
6.1 Determinación de Actividad Metanogénica	16
6.2 Determinación de Actividad Sulfato Reductora	18
6.3 Determinación de Toxicidad	21
6.4 Extracción de ADN	23
6.5 Biodegradación de TCE en presencia de sedimentos vivos	23
7. Análisis y Discusión	25
7.1 Actividad Metanogénica	25
7.2 Actividad Sulfato Reductora	25
7.3 Experimentos de Enriquecimiento	27
7.4 Efectos de Toxicidad	28
7.5 Extracción de ADN	28
7.6 Biodegradación de TCE en presencia de sedimentos vivos	29
8. Conclusiones	30
9. Agradecimientos	31
10. Bibliografía	31
Anexo 1 Caracterización de Sedimentos	34
Anexo 2 Preparación de Medios	35
Anexo 3 Curvas Tipo	36
Anexo 4 Extracción de Cobalamina	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Fig. 1.1 Ejemplo de la dehalogenación vía enzimática por <i>Dehalococcoides ethenogenes</i>	7
Fig. 5.1 Diseño de oligonucleótidos y PCR	15
Fig. 6.1 Gel de Electroforesis de Extracción de ADN	23

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico No. 1 Actividad Metanogénica	17
Gráfico No. 2 Actividad Sulfato Reductora a experimentos de enriquecimiento	20
Gráfico No. 3 Efectos de Toxicidad a 25 $\mu\text{M}$ <i>cis-trans</i> DCE	21
Gráfico No. 4 Efectos de Toxicidad a 50 $\mu\text{M}$ <i>cis-trans</i> DCE	22
Gráfico No. 5 Efectos de Toxicidad a 100 $\mu\text{M}$ TCE y 100 $\mu\text{M}$ <i>cis-trans</i> DCE	22
Gráfico No. 6 Actividad sulfato reductora durante la biodegradación de TCE	24
Gráfico No. 7 Curva Tipo Riboflavina	37
Gráfico No. 8 Curva Tipo Hidroxocobalamina	38
Gráfico No. 9 Curva Tipo Metano (Aire – $\text{CH}_4$ )	39
Gráfico No. 10 Curva Tipo Metano ( $\text{N}_2$ – $\text{CH}_4$ )	40
Gráfico No. 10 Curva Tipo Sulfuro	41
Gráfico No. 11 Curva Tipo TCE	42

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla No. 1 Actividad Metanogénica Primer Experimento	16
Tabla No. 2 Actividad Metanogénica Primer Experimento (Controles)	16
Tabla No. 3 Actividad Metanogénica Segundo Experimento	17
Tabla No. 4 Actividad Metanogénica Tercer Experimento	17
Tabla No. 5 Actividad Metanogénica Experimento Enriquecimiento	18
Tabla No. 6 Actividad Sulfato – Reductora del 1° Exp. actividad metano.	18
Tabla No. 7 Actividad Sulfato – Reductora del 2° Exp. actividad metano	19
Tabla No. 8 Actividad Sulfato – Reductora del 3° Exp. actividad metano	19
Tabla No. 9 Actividad Sulfato – Reductora del Exp. sulfato reducción	19
Tabla No. 10 Actividad Sulfato – Reductora del Exp. Enriquecimiento	20
Tabla No. 11 Efectos de Toxicidad a concentración de 25 $\mu\text{M}$ DCE	21
Tabla No. 12 Efectos de Toxicidad a concentración de 50 $\mu\text{M}$ DCE	21
Tabla No. 13 Efectos de Toxicidad a la actividad sulfato reductora	22
Tabla No. 14 Biodegradación- Actividad sulfato reductora	23
Tabla No. 15 Concentración de sulfuro experimentos de biodegradación.	24
Tabla No. 16 Resultados de la biodegradación de TCE	24
Tabla No. 17 % de humedad y % de Materia orgánica (Sedimentos 1)	35
Tabla No. 18 % de humedad y % de Materia orgánica (Sedimentos 2)	35
Tabla No. 19 Curva Tipo de Riboflavina (Abs 450 nm)	36
Tabla No. 20 Curva Tipo de Hidroxocobalamina (Abs 560 nm)	37
Tabla No. 21 Curva Tipo Aire – Metano	39
Tabla No. 22 Curva Tipo $\text{N}_2$ - Metano	39
Tabla No. 23 Curva Tipo de Sulfuro	41
Tabla No. 24 Curva Tipo TCE	42

# 1. INTRODUCCIÓN

Bacterias anaerobias estrictas tienen la capacidad de degradar por reducción compuestos clorados por vías catabólicas, obteniendo de esto energía para su crecimiento (dehalorespiración). Esta actividad es realizada por enzimas dehalogenasas, las cuales están presentes en muchas bacterias sulfato reductoras. Se sabe que gran parte de la degradación de compuestos clorados se realiza por medio de estos microorganismos bajo condiciones anaerobias. En el proceso de dehalogenación las bacterias utilizan los compuestos organoclorados como aceptores de electrones y de esta manera son reducidos mientras que los microorganismos obtienen energía para crecer. Se ha encontrado que en ventilas hidrotermales se generan las condiciones ideales para que existan bacterias sulfato reductoras. En el presente trabajo se propone determinar la presencia de enzimas dehalogenasas involucradas en la degradación de compuestos clorados (Tricloroetileno, (TCE)) al enriquecer sedimentos marinos de ventilas hidrotermales de Punta Mita (Nayarit, Méx.) con dichos compuestos bajo condiciones de sulfato- reducción. Los sedimentos marinos se incubaron a 37° C en medio basal adicionado con ácidos grasos volátiles AGV en proporción 1:1:1 de DQO en condiciones anaerobias por aproximadamente un mes para promover la producción de sulfuro. Se analizó el contenido de sulfuro por el método de azul de metileno de Trueper *et. al.* 1964; y la presencia de metano en la atmósfera de los cultivos por medio de cromatografía de gases cada semana. Cuando la producción de sulfuro fue constante se evacuó la atmósfera con N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> y se añadió TCE a una concentración de 50 µM, se analizó el contenido de sulfuro a intervalos regulares de tiempo con el fin de determinar la toxicidad a la actividad sulfato reductora. Aproximadamente después de 3 meses de incubación de los experimentos se realizó la extracción de ADN por método de fenol-cloroformo. Los datos de la actividad sulfato reductora presentan evidencia de que conforme pasa el tiempo de incubación la actividad sulfato reductora se incrementa alrededor de 3.5 veces para los tratamientos después de haberse adicionado el compuesto clorado (incrementa de 0.7 mgS<sup>-2</sup>/gSSV a 2.47 mgS<sup>-2</sup>/gSSV después de la adición de TCE), durante todo este tiempo la adición de AGV así como de TCE es constante. Para los controles esta permanece considerablemente baja (no se vuelve a recuperar los 0.128 mgS<sup>-2</sup>/gSSV que se produjeron antes de la adición de TCE). Habiendo entre ambos una gran diferencia de la actividad cuando está presente el sustrato en el medio. La tendencia en los tratamientos de la actividad sulfato reductora es que al momento de la adición de TCE la actividad decrece, pero la actividad se va recuperando y llega a ser muy superior, para los controles la actividad se recupera pero nunca a sus niveles iniciales. Hay evidencia de haber *cis* y *trans* 1,2-dicloroetilenos en los experimentos. Al haber incremento de la actividad sulfato reductora en presencia de TCE es muy posible que se esté realizando la degradación del compuesto clorado, ya que resultados obtenidos en experimentos de degradación muestran una reducción considerable de TCE (aprox. 70%) bajo condiciones sulfato reductoras en cortos períodos de tiempo. Se espera encontrar las enzimas responsables de la dehalogenación. En caso de detectarse se podrá confirmar que el proceso se debe a respiración (dehalorespiración).

## 2. ANTECEDENTES

### 1.1 Bacterias Termófilas

Existen microorganismos que viven y se desarrollan de manera óptima en ambientes que resultan ser extremos para la vida humana, este es el caso de aquellas bacterias que se desarrollan en lugares donde las temperaturas son altas. De acuerdo a esta característica se designa a este tipo de bacterias como **termófilas**. Es bien conocido que en cualquier ambiente donde existan temperaturas extremas existe presencia de bacterias, muchas de ellas muy poco conocidas o relativamente nuevas para el hombre. De acuerdo con eso existen en lugares como géiseres, cráteres volcánicos o chimeneas hidrotermales en las profundidades de los mares, por mencionar algunos.

Se considera bacterias termófilas a aquellas que pueden crecer a partir de los 45° C, no importando la presión del medio o la disponibilidad de oxígeno a la que se encuentre siempre que exista agua en estado líquido [13].

### 1.2 Ventilias Hidrotermales

Las ventilias hidrotermales son, de acuerdo con los estudios isotópicos, el resultado de la mezcla de dos corrientes de agua, la primera corriente se debe al agua de mar y la segunda es la corriente creada por el agua meteórica [29].

Las ventilias hidrotermales ubicadas en Punta Mita en el oeste de las costas de Jalisco y Nayarit, México presentan actividad tectónica a consecuencia del régimen relacionado con la subducción y el volcanismo de la actividad de las placas del lugar, por lo que presentan grandes fallas a nivel del suelo.

Entre las características de Punta Mita destacan que el agua de las ventilias presenta concentraciones inferiores de metales basales ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Mg}^+$ ,  $\text{SO}_4^{-2}$ ) con respecto al agua de mar; el gas que se encuentra dentro de las chimeneas está compuesto principalmente por nitrógeno (80%) y metano (12%). La presencia de metano se ha atribuido a un origen termogénico de acuerdo a los isótopos de carbón presentes en el lugar. Pero además existen depósitos de carbonatos, sulfitos, sulfatos y fosfatos alrededor de las ventilias, así como calcita y pirita precipitadas por procesos biogénicos.

Generalmente las ventilias hidrotermales se encuentra a una profundidad de 10 m y una temperatura de 85° C en promedio [29].

Un dato de gran relevancia es que las ventilias hidrotermales generan el medio ideal para favorecer la presencia de bacterias, pues se han identificado microorganismos preservados y fosilizados cerca de las ventilias; así como evidencia de actividad biológica, la cuál es la responsable de la textura de los depósitos, en estudios realizados a estromatolitos alrededor de las chimeneas

hidrotermales (dentro de los cuales se encontraron posiblemente cocos y esporas) [8]; así como actividad de **bacterias sulfato reductoras** (BSR) a causa de los radios isotópicos del sulfuro medidos en el lugar [2].

Las comunidades microbianas pueden tener actividad en las ventilas oxidando el metano y reduciendo el sulfato del agua de mar y subsecuentemente la calita y pirita precipitadas [29]. El sulfuro proviene de los fósiles submarinos que se han formado por la reducción bacteriana del sulfato del agua de mar [10]. La pirita es producida por combinación de H<sub>2</sub>S producido por la reducción bacteriana del sulfato y el hierro oxidado por reacciones con materiales orgánicos.

El carbono orgánico disponible es importante pues de acuerdo a la cantidad que este presente en el medio, las bacterias pueden reducir el sulfuro de mejor forma, además de que esta capacidad se incrementa con la temperatura [27].

### 1.3 Dehalogenación

Desde hace años han sido aisladas bacterias anaerobias estrictas, las cuáles tienen la capacidad de dechlorar por reducción compuestos alifáticos clorados y aromáticos por vías catabólicas. Esta dechloración por vía reductiva está acoplada a la conservación de energía de las bacterias para su crecimiento; a este proceso se le denomina dehalorespiración [13]; la cual generalmente va acoplada al cometabolismo [11].

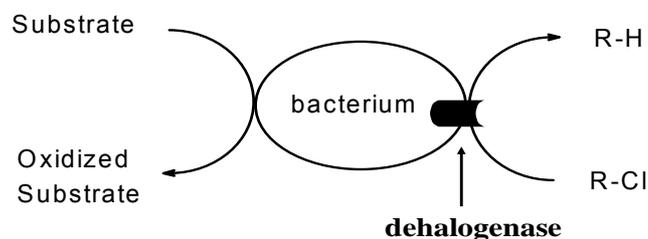
La dehalorespiración también es conocida como **dehalogenación**, es un proceso acoplado a la síntesis de ATP. Esta actividad es realizada por enzimas denominadas **dehalogenasas**, las cuales son empleadas para remover iones y metabolizar compuestos que ayuden al crecimiento celular. Las dehalogenasas están presentes en la mayoría de las bacterias sulfato reductoras (BSR); estas enzimas se derivan de las diferentes superfamilias de enzimas [11,13].

Para que se lleve a cabo la dehalogenación las bacterias toman a su sustrato, el cual es oxidado y al mismo tiempo reduce a otro compuesto, siendo este último el aceptor final de electrones [11]. El prerrequisito para el acoplamiento de la conservación de la energía para la dechloración reductiva es que la reacción  $R - Cl + 2[H] \rightarrow R - H + H - Cl^-$  sea termodinámicamente favorable. [13]

#### 1.3.1 Mecanismos de dehalogenación [34]

- Dehalogenación oxigenolítica: con incorporación de uno o dos átomos de oxígeno en la molécula, comúnmente en la vía un intermediario epóxido.
- Dehalogenación reductiva: un halógeno típico es remplazado por el H.
- Dehalogenación hidrolítica: sustitución nucleofílica con un grupo OH- derivado del solvente (H<sub>2</sub>O).
- Dehalogenación tiolítica: sustitución nucleofílica con un grupo sulfidrilo (-SH) derivado del glutationato.
- Hidratación: adición de agua en el halógeno sustituido de doble enlace.

## Dehalogenación reductiva **Enzimática directa**



### ***Dehalococcoides Ethenogenes***

Fig. 1.1 Ejemplo de la dehalogenación vía enzimática por *Dehalococcoides ethenogenes* [11].

*Dehalococcoides ethenogenes* de la variedad 195 fue el primer microorganismo en ser aislado capaz de dechlorar tricloroetileno hasta cloruro de vinilo (VC) por medio de respiración [24].

#### 1.4 Compuestos clorados

Los compuestos clorados como el tetracloroetano (PCE) y el tricloroetileno (TCE) son solventes intensamente usados en la industria eléctrica, partes electrónicas y ropa, entre otros. Estos pertenecen a los contaminantes más abundantes en el ambiente del suelo marino en países desarrollados. Su alta toxicidad y capacidad de acumulación en tejidos biológicos y ambientes hacen que sean de gran preocupación para el ser humano y el planeta [7,30].

La acumulación que presenta este tipo de compuestos es debido a su estabilidad química y su resistencia a la degradación. Dentro de las repercusiones que puede ocasionar a la salud humana están irritación y quemaduras en piel y ojos, pérdida de memoria y conocimiento, vómito, daño a hígado y riñones y otras alteraciones genéticas, ya que es un agente mutagénico, así como trastornos endocrinos, actúan como agentes teratogénicos además de ser carcinógenos, y se distribuyen a través de la cadena alimenticia [1, 12, 36].

En México se reportan concentraciones de compuestos orgánicos (disolventes) altamente clorados, entre ellos el TCE (se le considera como uno de los principales agentes contaminantes de suelos y agua por diversas instituciones como la Agencia de Protección Ambiental (Environmental Protection Agency, EPA) y el NTP), de 0.1µg/L-23.5 µg/L. Los niveles permisibles de éstos contaminantes,

aunque no están regulados por norma (en la recarga artificial de acuíferos), en especial para TCE, son de 50 µg/L [3].

Estos compuestos clorados que se resisten a la degradación de manera aeróbica pueden ser transformados dentro de condiciones anóxicas por reacciones reductoras [7,30].

Organismos complejos en dehalorespiración, un proceso de decloración reductiva biológica muy eficiente, son capaces de utilizar compuestos clorados como aceptor terminal de electrones y acoplar la reacción de dehalogenación con conservación de energía [13]. La enzima fundamental involucrada en la degradación anaeróbica de compuestos clorados es la cloroeteno dehalogenasa reductiva (RDHasa) [21].

Los metanógenos y sulfato reductores han estado implicados en la reducción de los compuestos clorados, aunque no anaerobios han podido aislarse organismos decloradores. Se conoce poco acerca de la fisiología de los decloradores en general, aunque recientemente se han identificado microorganismos que están filogenéticamente relacionados con reductores de compuestos clorados y se conoce que hacen dehalorespiración [5].

#### 1.5 Degradación de compuestos clorados

Se sabe que gran parte de la degradación de compuestos clorados se realiza por medio de microorganismos y es más eficiente si estos son anaerobios. Las bacterias utilizan estos compuestos como donadores de electrones y de esta manera son reducidos.

El hidrógeno (H<sub>2</sub>) es utilizado como donador de electrones para los anaerobios estrictos y el tetracloroeteno y tricloroeteno son aceptores de electrones, los cuales son declorados a *cis*-1,2-dicloroeteno en los procesos de respiración anaeróbica. El acetato sirve como fuente de carbono en un medio definido con el hierro como único elemento traza. [14]

La decloración reductiva, se ha demostrado que ocurre a partir de bacterias sulfato reductoras como *Desulfomonile tiedjei*, entre otras bacterias del género *Desulfitobacterium*. Estos organismos cuentan con propiedades de respiración anaerobia con etenos clorados, y están asociados a diferentes grupos filogenéticos y tienen propiedades fisiológicas completamente diferentes [9, 26].

Existen cuatro diferentes grupos filogenéticos que degradan compuestos clorados: bajo G+C Gram-positivos, δ -Proteobacterias, ε -proteobacterias y bacterias verdes no sulfuradas.

Se ha observado que la presencia de metano es necesaria para mejorar la biodegradación de compuestos clorados como el TCE o el DCE, pero el exceso de metano inhibe la remoción de estos compuestos [4]. La metanogénesis ha sido

reportada en gran variedad de sedimentos marinos. Bajos rangos de producción de metano ocurren en sedimentos marinos ricos en sulfato [32, 33], donde las bacterias sulfato reductoras compiten con los organismos metanogénicos por el H<sub>2</sub> y el acetato. [17, 18, 19, 20]. El metano producido en estos sedimentos marinos ricos en sulfato puede ser derivada de aminas metiladas, las cuales no son utilizadas por las bacterias sulfato reductoras (BSR) [15, 28, 39]. La producción de metano predomina en sedimentos marinos pobres en sulfato que reciben altas cantidades de materia orgánica [16, 25].

#### 1.5.1 Microorganismos que degradan compuestos clorados

Los compuestos clorados pueden reducirse por medio de bacterias anaeróbicas, la diversidad de este tipo de bacterias reductoras es muy grande. Algunos microorganismos metanogénicos y acetogénicos bajo condiciones reductoras degradan los compuestos clorados en reacciones cometabólicas. Mientras que otros utilizan los compuestos clorados como aceptores de electrones en su energía metabólica. Se ha caracterizado de excelente forma la dehalorespiración en cloroetenos como aceptor de electrones [13].

Dentro de los microorganismos que degradan compuestos clorados se encuentran metanógenos [14]; bacterias sulfato reductoras (SRB) [9, 14]; microcosmos de sedimentos enriquecidos en decloradores anaeróbicos con hidrógeno como donador de electrones (como dehalorespiración en *Dehalococcoides ethenogenes*). [31]

### 3. JUSTIFICACIÓN

Los compuestos altamente clorados como lo es el tricloroetileno (TCE) y el tetracloroetileno (PCE) son contaminantes potenciales tanto para la salud humana como para el bienestar de todos los ecosistemas del planeta. Son compuestos que tienen la capacidad de acumularse principalmente en los mares.

La degradación de los contaminantes se ha podido hacer de manera microbiana aerobia, mientras que bajo condiciones anaerobias los resultados son mucho más satisfactorios.

Dicha degradación de los compuestos recalcitrantes se realiza por medio de actividad biológica realizada por consorcios microbianos (metanógenos, sulfato reductores, entre otros); a esta actividad se le conoce como dehalogenación. Los microorganismos utilizan los contaminantes como fuente de energía y los reducen haciéndoles menos tóxicos y mucho más fácil de degradar.

Para que se lleve a cabo la dehalogenación es necesario que los microorganismos contengan enzimas llamadas dehalogenasas, las cuales son las encargadas de realizar dicha actividad. Se presume que estas enzimas están presentes en bacterias sulfato reductoras, las cuales a su vez se han detectado en sedimentos de ventilas hidrotermales de las costas de Nayarit y Jalisco, México.

En estos lugares se conoce de la presencia de bacterias Sulfato Reductoras y microorganismos metanógenos. Debido a que las características del lugar permiten condiciones anaerobias y proporcionan una temperatura alrededor de 85°C la cual favorece la sulfato reducción. Estos sistemas pueden favorecer la dehalogenación a temperaturas mesofílicas y termofílicas.

Es de gran importancia poder determinar si es que estos consorcios contienen el gen que codifica para las enzimas dehalogenasas, y su relación con la degradación de compuestos clorados. Pues estos consorcios microbianos presuntamente nunca han estado expuestos a contaminantes clorados, y de ser posible verificaremos que nuestras bacterias puedan desarrollar actividad reductora implicando para ello sistemas enzimáticos.

De ser así los conocimientos que se aportaran serán importantes para el campo de la biotecnología ambiental y una base sólida e importante para el desarrollo de sistemas de biorremediación *in situ* utilizando este tipo de consorcios microbianos. Pues se podría utilizar los sedimentos vírgenes para colocarlos en biorreactores sin necesidad de aclimatación previa y con la certeza de que degradaran compuestos organoclorados.

#### 4. OBJETIVOS

➤ GENERAL

**Evaluar la capacidad enzimática dehalogenasa de microorganismos termófilos durante la degradación de compuestos clorados.**

➤ ESPECÍFICOS

- **Evaluar el enriquecimiento de sedimentos de ventilas hidrotermales de las costas de Baja California y Nayarit (Océano Pacífico), México, en microorganismos sulfato reductores con capacidad de dechloración.**
- **Determinar la existencia del gen que codifica para la enzima dehalogenasa por técnicas de biología molecular.**

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Para llevar a cabo todos los experimentos se emplearan 2 tipos de sedimentos de las ventilas hidrotermales de Punta Mita (costas de Jalisco y Nayarit, México). Difiriendo únicamente en el punto de recolección de la muestra, pues las características físicas fueron muy similares.

### 5.1 Experimentos de Actividad Metanogénica

#### 5.1.1 Primer Experimento

Se emplearon botellas serológicas, previamente determinado su volumen, de 125 mL aproximadamente. Posteriormente se agregó 0.74 g de sedimento húmedo, 10 mL de medio Basal (Anexo 2), 10 mL de buffer de fosfatos ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.01 M), ácidos grasos volátiles (AGV) [0.1 g de butirato, 1 mL acetato-propionato de sodio 1:1:1 equivalentes a 250 mg DQO/L] y por último la cantidad necesaria de agua destilada para completar 50 mL. Posterior a esto las botellas fueron evacuadas con  $\text{N}_2$  durante 3 minutos, para después sellarlas inmediatamente y volver a evacuar su atmósfera por 2 minutos más. Fueron incubadas a 37°C con agitación constante. Paralelo a este experimento se colocaron botellas control, las cuales carecían de solución de AGV. Se estuvo monitoreando la producción de metano leyendo el gas de la atmósfera de las botellas en cromatógrafo de gases de ionización a la flama (Perkin Elmer Autosystem) a partir de la primera semana de incubación. Además de agregar 250 mgDQO/L de AGV a los experimentos cada semana. Tanto los tratamientos como los controles se realizaron por cuadruplicado.

#### 5.1.2 Segundo Experimento

Se emplearon botellas serológicas, previamente determinado su volumen, de 125 mL aproximadamente. Posteriormente se agregó 0.74 g de sedimento húmedo, 10 mL de medio Basal(Anexo 2), 10 mL de buffer de fosfatos ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.01 M), 1.25 mL ácidos grasos volátiles (AGV) [butirato-acetato-propionato de sodio 1:1:1 equivalentes a 250 mgDQO/L] y por último la cantidad necesaria de agua destilada para completar 50 mL. Posterior a esto las botellas fueron evacuadas con  $\text{N}_2$  durante 3 minutos, para después sellarlas inmediatamente y volver a evacuar su atmósfera por 2 minutos más. Fueron incubadas a 37°C con agitación constante. Paralelo a este experimento se colocaron botellas control, las cuales carecían de solución de AGV. Se estuvo monitoreando la producción de metano leyendo el gas de la atmósfera de las botellas en cromatógrafo de gases de ionización a la flama (Perkin Elmer Autosystem) a partir de la primera semana de incubación. Además de agregar 250 mgDQO/L de AGV a los experimentos cada semana. Tanto los controles como los tratamientos se realizaron por cuadruplicado.

### 5.1.3 Tercer Experimento

Se emplearon botellas serológicas, previamente determinado su peso y volumen, de 125 mL aproximadamente. Posteriormente se agregó 0.74 g de sedimento húmedo, 10 mL de medio Basal (Anexo 2), 10 mL de buffer de fosfatos ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.01 M), 1.25 mL de ácidos grasos volátiles (AGV) [butirato, acetato-propionato de sodio 1:1:1 equivalentes a 250 mgDQO/L] y por último la cantidad necesaria de agua destilada para completar 50 mL. Posterior a esto las botellas fueron evacuadas con  $\text{N}_2$  durante 3 minutos, para después sellarlas inmediatamente y volver a evacuar su atmósfera por 2 minutos más. Fueron incubadas a 75° C con agitación constante. Paralelo a este experimento se colocaron botellas control, las cuales carecían de solución de AGV. Se estuvo monitoreando la producción de metano leyendo el gas de la atmósfera de las botellas en cromatógrafo de gases de ionización a la flama (Perkin Elmer Autosystem) a partir de la primera semana de incubación. Además de agregar 250 mgDQO/L de AGV a los experimentos cada semana. Los experimentos se realizaron por cuadruplicado. Al cabo de 5 meses de incubación los experimentos fueron enriquecidos, tratados de la misma manera que los experimentos de enriquecimiento agregándoles TCE a 350 mgDQO/L.

### 5.2 Experimentos de Actividad Sulfato Reductora

En 4 botellas serológicas, se determinó su volumen para posteriormente colocar 5 g de sedimento húmedo (1.7 g SSV), añadir 10 mL de Medio Basal (Anexo 2), 10 mL de buffer de fosfatos y 1 mL de  $\text{CH}_2\text{COONa}$  (Acetato de Sodio como sustrato a una concentración de 2 g/L equivalente a 350 mgDQO/L) y completar un volumen de 50 mL con agua destilada. Las botellas fueron evacuadas con gas nitrógeno por 3 minutos, se sellaron y se evacuaron nuevamente por 2 minutos más. Se incubaron a 37°C. Cada semana se añadió acetato de sodio a una concentración de 350 mgDQO/L.

### 5.3 Experimentos de Enriquecimiento

Para este experimento se determinó el volumen a 8 botellas serológicas, y se les colocó 10 g de sedimento (3.4 g SSV), a 4 de ellas 48 mL de medio A (Anexo 2) y 2 mL de AGV (350 mgDQO/L). A las 4 restantes además de los sedimentos se les colocó 50 mL de medio A. Cada semana se añadió AGV a una concentración de 350 mgDQO/L. Pasada una semana se les añadirá 50  $\mu\text{M}$  de TCE (0.5 mL de la solución madre 5000  $\mu\text{M}$ ) y 0.3 mL de solución de vitaminas (Anexo 2). Cada semana se agregó las cantidades correspondientes de AGV a concentración de 350 mgDQO/L. El TCE se siguió añadiendo a una concentración de 20  $\mu\text{M}$ , además de adicionar 2 mL de una solución de vitaminas para enriquecer más el medio.

## 5.4 Experimentos de Toxicidad

Para la realización de este experimento primeramente se determinaron los volúmenes de 8 botellas serológicas, los cuáles fueron de 125 mL aproximadamente cada uno. Para luego colocar dentro de cada una de ellas 10 g de sedimento húmedo (6.2 g SSV), 48 mL de medio A (Anexo 2) y por último 2 mL de Ácidos Grasos Volátiles (350 mgDQO/L como sustrato) en los tratamientos correspondientes a 4 botellas, además de colocar 4 más con ausencia de sustrato como controles. Todos los experimentos se incubaron a 37°C. Al cabo de 29 días de incubación la atmósfera de las botellas fue evacuada con gas (concentración 80% N<sub>2</sub> - 20% CO<sub>2</sub>) durante 2 minutos para posteriormente agregar aleatoriamente a 2 controles y 2 tratamientos una concentración de 50 µM de una mezcla de *cis* - *trans* Dicloroetileno (DCE) y a la par a los restantes controles y tratamientos 25 µM de mezcla de *cis* - *trans* Dicloroetileno (DCE). Luego de colocar los compuestos clorados a los experimentos se procedió a medir el sulfuro presente en cada botella y este se monitoreó por alrededor de 26 horas para observar los efectos que causan los compuestos clorados en la actividad de los sedimentos.

## 5.5 Extracción de ADN

Para realizar la extracción de ADN se utilizó el método de fenol-cloroformo. Se tomó 0.5 mL de muestra de sedimentos de los diferentes experimentos y se colocó en un tubo Ependorff. Posteriormente se le agregó un volumen de fenol y se calentaron ambos a 60° C durante 10 min., se colocaron en el vortex durante 2 minutos para después centrifugar a 11000 rpm a 4° C por 5 min. Posteriormente se agrega un volumen más de cloroformo para volver a centrifugar bajo las mismas condiciones. Tomar el sobrenadante y colocarlo en un tubo Ependorff para agregarle un volumen de etanol absoluto y 10% v/v de acetato de sodio (2.7 M). Centrifugar por 2 horas a 4° C. Por ultimo por decantación quitar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 60 µL de agua bidestilada (estéril por filtración). Conservar a -20° C.

## 5.6 Electroforesis en Gel de Agarosa

Colocar 0.7% w/v de agarosa en 25 mL de TBE. Fundir la agarosa en una placa calefactora, esperar que se enfríe y colocarla en la cubeta de electroforesis. Cubrir perfectamente el gel con la solución de TBE. Mezclar perfectamente 10 µL de la muestra problema con 0.1 µL de buffer de corrimiento 2x. Inmediatamente después cargar las muestras en el gel y permitir que se lleve a cabo la electroforesis a 90 mA. Cuando frente de corrimiento este a  $\frac{3}{4}$  partes del gel aproximadamente apagar la corriente y tomar el gel con cuidado para traspasarlo y sumergirlo en solución de bromuro de etidio para que se tiña por 10 minutos. Por último retirar el exceso de bromuro de etidio (alternativamente se puede teñir con Syber Safe, ya que es no tóxico, durante el mismo tiempo) con agua bidestilada. Fotodocumentar.

## 5.7 Amplificación de los genes RDH (PCR)

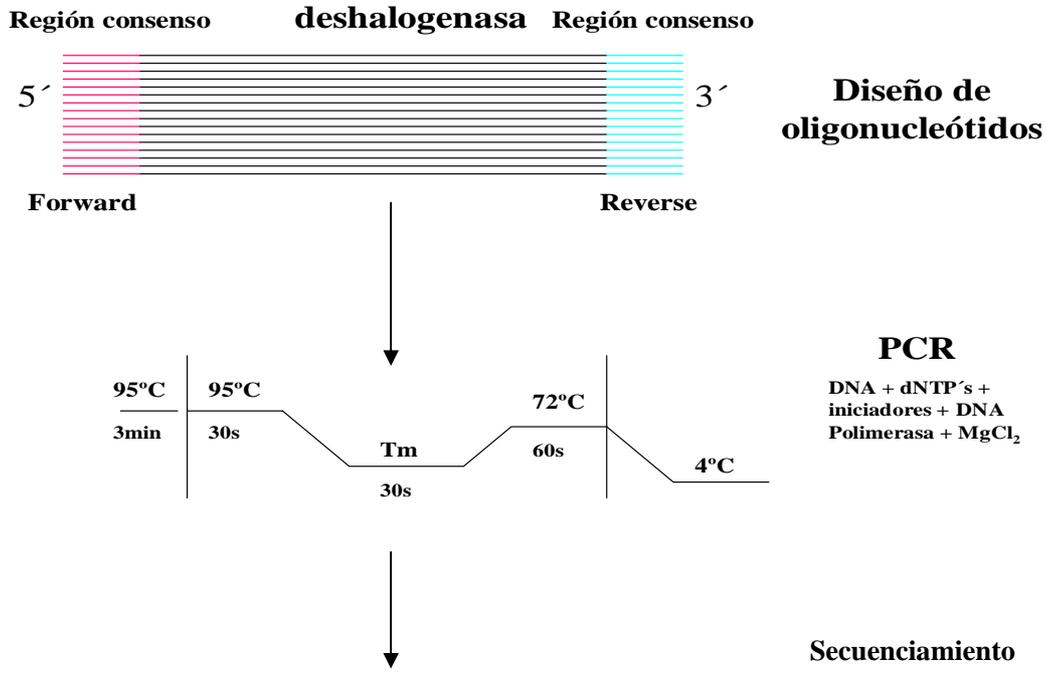


Fig. 5.1 Diseño de oligonucleótidos y PCR

Se emplearon dos oligonucleótidos: la secuencia del péptido N-terminal de la TCE RDH fue usado para el diseño de 128 oligonucleótidos plegados degenerados TFOR (PM ( $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ ) 9574.6 y un % GC 39 con una secuencia 5' – 3' GCIAAYAARGTIAAYAAYCAYCCNTGGTGGG). La secuencia del péptido interno fue diseñada para 256 oligonucleótidos plegados degenerados TREV (PM ( $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ ) 7928.6 y un %GC 42, la secuencia 5' – 3' CCYTCCCAYYTIGGRTARTTNGTNGT) [23].

Posteriormente se llevó a cabo la reacción de PCR y la secuenciación de los genes de Dehalogenasas Reductivas (RDH); para lo cual se cuenta con una mezcla (mix Roche Applied Science) de PCR que contiene 100 ng de ADN 2.5  $\mu\text{L}$  Buffer PCR 10x, 0.8  $\mu\text{L}$  MgCl<sub>2</sub>(2mM), 0.5  $\mu\text{L}$  dNTP, 0.5  $\mu\text{M}$  de cada primer, 0.2  $\mu\text{L}$  de *Taq Polimerasa* en 25  $\mu\text{L}$  de reacción completa. PCR fue corrida con el termociclador usando los parámetros: 28 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s a 60° C y 30 s a 72° C.

Por último se realiza el análisis de la secuencia, para ello se cuenta con acceso a la secuencia del genoma de sulfato reductoras con capacidad de dehalorespiración para secuencias de dehalogenasas.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Determinación de Actividad Metanogénica

Para estos experimentos se tomaron muestras de la atmósfera de las botellas y se inyectaron en el cromatógrafo de gases para determinar la presencia de gas metano.

Tabla No. 1 Actividad Metanogénica Primer Experimento

	Tiempo (días)	3	5.91	12.7	21.2
Sedimento 1	CH <sub>4</sub> (%V/V)	-0.192	-0.1934	-0.1931	Trazas
	mgDQOCH <sub>4</sub> /g SSV	-0.041 ± 0.001	-0.041 ± 0.00	-0.0746 ± 0.001	-
Sedimento 2	CH <sub>4</sub> (%V/V)	-0.192	-0.193	-0.192	-0.01
	mgDQOCH <sub>4</sub> /g SSV	-0.096 ± 0.001	-0.097 ± 0.00	-0.078 ± 0.012	-0.004 ± 0.001

Datos correspondientes a tratamientos con 250 mgDQO/L AGV como sustrato

Tabla No. 2 Actividad Metanogénica Primer Experimento (Controles)

	Tiempo (días)	3	5.91	12.7	21.2
* Sedimento 1	CH <sub>4</sub> (%V/V)	-0.1934	-0.1934	-0.1931	Trazas
	mgDQOCH <sub>4</sub> /g SSV	-0.041 ± 0.0	-0.041 ± 0.00	-0.0746 ± 0.001	-
* Sedimento 2	CH <sub>4</sub> (%V/V)	-0.192	-0.192	-0.194	-0.0115
	mgDQOCH <sub>4</sub> /g SSV	-0.090 ± 0.011	-0.090 ± 0.011	-0.074 ± 0.001	-0.004 ± 0.001

\* Datos correspondientes a los controles, los cuales carecen de AGV.

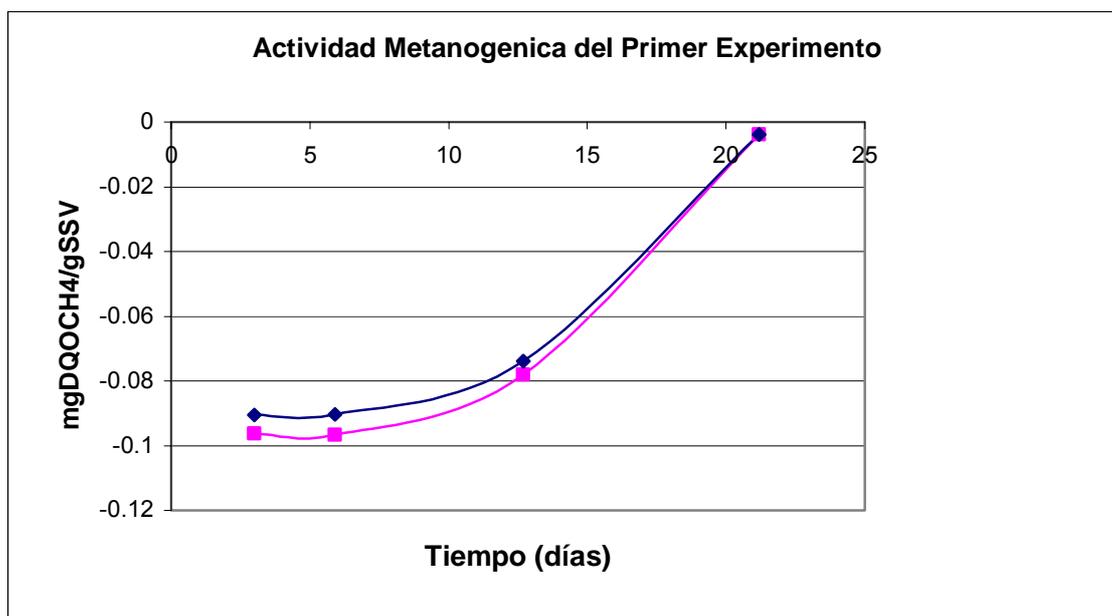


Gráfico No. 1 Actividad Metanogénica. Controles carentes de AGV (rombos), tratamientos con AGV como sustrato (cuadrados).

Tabla No. 3 Actividad Metanogénica Segundo Experimento

Tiempo (días)		3	*3	25	*25
Sedimento 1	CH <sub>4</sub> (%V/V)	-0.1903	-0.1908	-0.1903	-0.1908
	mgDQOCH <sub>4</sub> /gSSV	-0.0386 ± 0.0006	-0.0389±0.0002	-0.0386 ± 0.0006	-0.0389±0.0002
Sedimento 2	CH <sub>4</sub> (%V/V)	-0.194	-0.193	-0.1908	-0.1908
	mgDQOCH <sub>4</sub> /gSSV	-0.073 ± 0.005	-0.0718 ± 0.004	-0.0711 ± 0.005	-0.0711±0.0002

\* Controles carentes de AGV.

Tabla No. 4 Actividad Metanogénica Tercer Experimento

Tiempo (días)		9	*9
Sedimento 1	CH <sub>4</sub> (%V/V)	-0.1919	-0.1936
	mgDQOCH <sub>4</sub> /gSSV	-0.0989 ± 0.002	-0.0395 ± 0.0002
Sedimento 2	CH <sub>4</sub> (%V/V)	-0.14245	-0.1428
	mgDQOCH <sub>4</sub> /gSSV	-0.07123 ± 0.0033	-0.0714 ± 0.0023

\* Controles carentes de AGV.

Tabla No. 5 Actividad Metanogénica al Experimento de Enriquecimiento

	Tiempo (días)	13	*13
Sedimento 1	CH <sub>4</sub> (%V/V)	Trazas	Trazas
	mgDQOCH <sub>4</sub> /gSSV	0	0
Sedimento 2	CH <sub>4</sub> (%V/V)	-0.13811	-0.14465
	mgDQOCH <sub>4</sub> /gSSV	-0.00383 ± 0.002	-0.00398 ± 0.0004

\* Controles carecen de AGV.

## 6.2 Determinación de Actividad Sulfato Reductora

La actividad sulfato reductora fue evaluada para los experimentos de actividad metanogénica, los experimentos de enriquecimiento y los experimentos de actividad sulfato reductora, los datos obtenidos fueron:

Tabla No. 6 Actividad Sulfato – Reductora del 1° Experimento Act. metanogénica

Experimento	Tiempo Incubación (días)	mgS <sup>-2</sup> /gSSV
● Controles	35	0.2882 ± 0.0462
● Tratamientos	35	20.7447 ± 3.2955
● * Controles	50	13.2452 ± 0.9902
● * Tratamientos	50	60.1537 ± 4.1089
Controles	35	0.00575 ± 0048
Tratamientos	35	0.581351 ± 0.35
* Controles	50	3.136854 ± 1.69
* Tratamientos	50	3.05887 ± 2.81

\*A partir de este tiempo de incubación se agregó TCE (20 µM) ● Experimentos pertenecientes a Sedimentos 1. Los restantes pertenecen a Sedimentos 2. Controles carecen de AGV.

Tabla No. 7 Actividad Sulfato – Reductora del 2° Experimento Act. metanogénica

Experimento	Tiempo Incubación (días)	mgS <sup>-2</sup> /gSSV
* Controles	23	1.6470 ± 0.3596
* Tratamientos	23	1.6893 ± 0.1857
Controles	23	0.05955 ± 0.043
Tratamientos	23	0.09158 ± 0.045

\* Experimentos pertenecientes a Sedimentos 1. Los restantes pertenecen a Sedimentos 2. Controles carecen de AGV.

Tabla No. 8 Actividad Sulfato – Reductora del 3° Experimento Act. metanogénica

Experimento	Tiempo Incubación (días)	mgS <sup>-2</sup> /gSSV
* Controles	29	4.4108 ± 1.1438
* Tratamientos	29	5.0630 ± 1.4515
Controles	29	0.6395 ± 0.162
Tratamientos	29	0.9903 ± 0.317

\* Experimentos pertenecientes a Sedimentos 1. Los restantes pertenecen a Sedimentos 2. Controles carecen de AGV's.

Tabla No. 9 Actividad Sulfato – Reductora Exp. Sulfato reducción

Experimento	Tiempo Incubación (días)	mgS <sup>-2</sup> /gSSV
* Tratamientos	16	1.59 ± 0.06
* Tratamientos	21	4.40 ± 0.16
Tratamientos	16	0.66 ± 0.812
Tratamientos	21	1.078 ± 0.321

\* Experimentos pertenecientes a Sedimentos 1. Los restantes pertenecen a Sedimentos 2.

Tabla No. 10 Actividad Sulfato – Reductora del Exp. Enriquecimiento

Experimento	Tiempo Incubación (días)	mgS <sup>-2</sup> /gSSV
* Controles	14	0.13±0.006
* Tratamientos	14	0.56±0.09
* ● Controles	27	0.07±0.01
* ● Tratamientos	27	3.24±0.10
Controles	14	0.129 ± 0.22
Tratamientos	14	0.703 ± 0.92
● Controles	20	-0.024 ± 0.0039
● Tratamientos	20	0.3818 ± 0.031
● Controles	27	0.0405 ± 0.055
● Tratamientos	27	2.479 ± 0.478
● Controles	111	-0.004 ± 0
● Tratamientos	111	5.96 ± 0
● Controles	119	0.037 ± 0
● Tratamientos	119	12.07±0

\* Experimentos pertenecientes a Sedimentos 1. Los restantes pertenecen a Sedimentos 2. ● A partir de este tiempo de incubación se agregó TCE (50 µM). Todos los controles carecen de AGV.

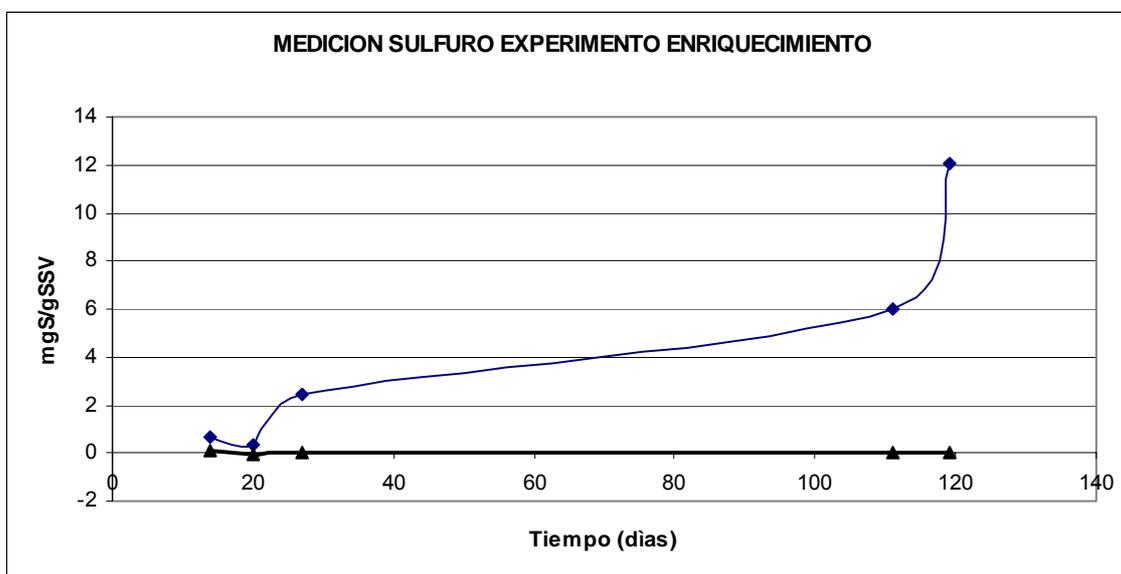


Gráfico No. 2 Actividad Sulfato Reductora a experimentos de Enriquecimiento Producción de sulfuro en presencia de 50 µM de TCE. Tratamientos con disolvente y AGV (rombos), controles con disolvente y sin AGV (triángulos).

### 6.3 Determinación de Toxicidad

Para la determinación de los efectos de toxicidad de los compuestos clorados se emplearon los experimentos de toxicidad con *cis-trans* DCE, paralelo a esto se realizaron pruebas con los experimentos de actividad sulfato reductora con *cis-trans* DCE y TCE; para lo cual los resultados fueron los siguientes:

Tabla No. 11 Efectos de Toxicidad a la actividad sulfato reductora usando concentración de 25  $\mu\text{M}$  *cis-trans* DCE

Tiempo (horas)	0	3	5	7	20	26
$\text{mgS}^{-2}/\text{gSSV}$	1.29 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.218	1.25 $\pm$ 0.233	1.15 $\pm$ 0.09	1.26 $\pm$ 0.01	1.38 $\pm$ 0.122
* $\text{mgS}^{-2}/\text{gSSV}$	0.07 $\pm$ 0.01	0 $\pm$ 0.005	-0.09 $\pm$ 0.012	0.05 $\pm$ 0.04	0.2 $\pm$ 0.002	-0.02 $\pm$ 0.005

\* Controles no contienen AGV. Todos los datos corresponden a Sedimento 2

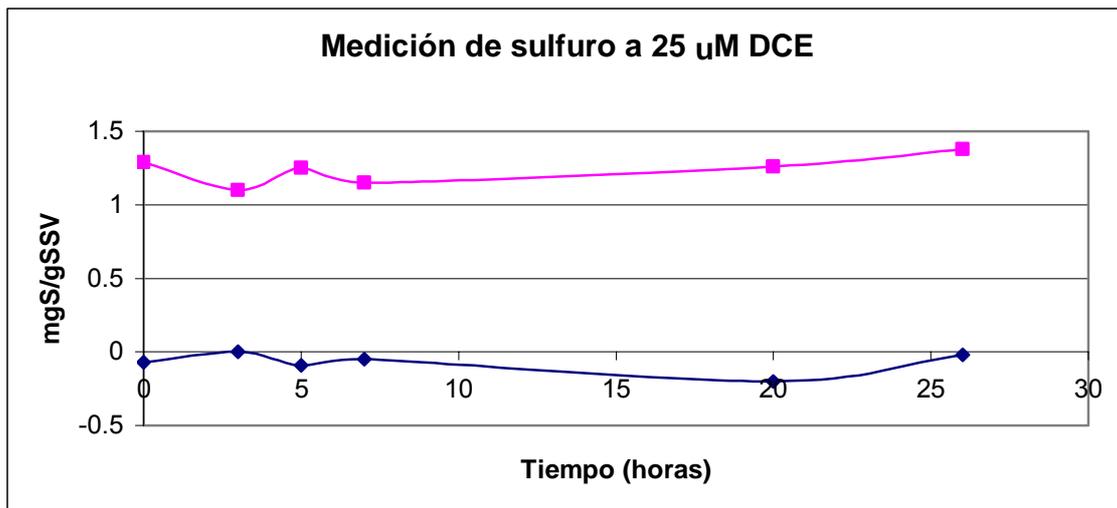


Gráfico No. 3 Efectos de Toxicidad con 25  $\mu\text{M}$  *cis-trans* DCE. Tratamientos con AGV y disolvente clorados (cuadros), controles sin sustrato (AGV) y con disolvente clorado (rombos).

Tabla No. 12 Efectos de Toxicidad a la actividad sulfato reductora a concentración de 50  $\mu\text{M}$  *cis-trans* DCE

Tiempo (horas)	0	3	5	7	20	26
$\text{mgS}^{-2}/\text{gSSV}$	1.08 $\pm$ 0.179	1.01 $\pm$ 0.057	1.12 $\pm$ 0.053	1.11 $\pm$ 0.024	1.13 $\pm$ 0.105	1.28 $\pm$ 0.07
* $\text{mgS}^{-2}/\text{gSSV}$	-0.07 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.011	0.09 $\pm$ 0.003	0.04 $\pm$ 0.012	-0.2 $\pm$ 0.011	0.02 $\pm$ 0.011

\* Controles no contienen AGV. Experimentos de Toxicidad

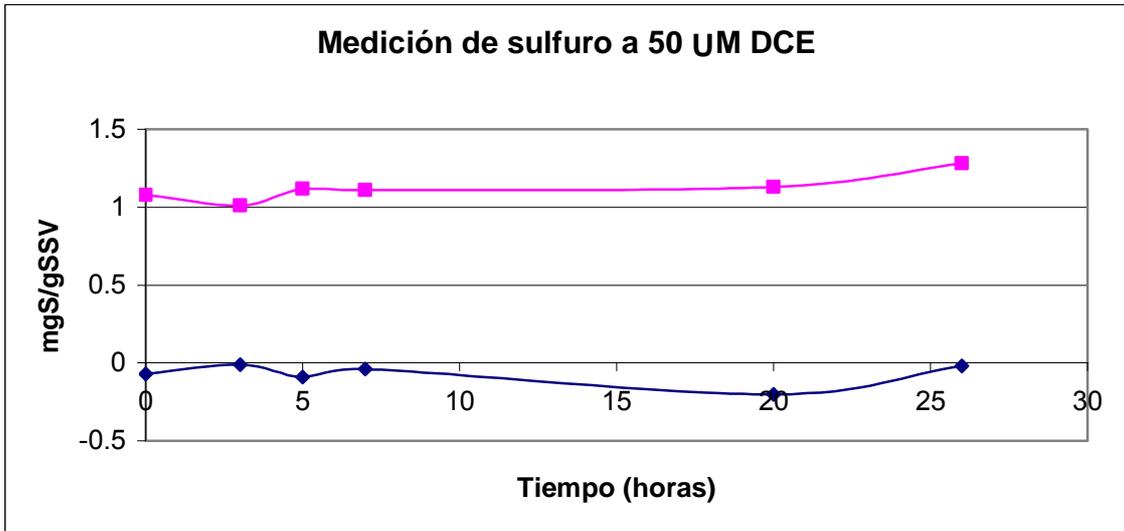


Gráfico No. 4 Efectos de Toxicidad con 50  $\mu\text{M}$  *cis-trans* DCE. Tratamientos con AGV y disolvente clorados (cuadros), controles sin sustrato (AGV) y con disolvente clorado (rombos).

Tabla No. 13 Efectos de Toxicidad a la actividad sulfato reductora con 50  $\mu\text{M}$  *cis*DCE, 50  $\mu\text{M}$  *trans*DCE y 100  $\mu\text{M}$  TCE

Tiempo (horas)	0	3	5	7	9	21.5	28
mgS <sup>2-</sup> /gSSV DCE (50 $\mu\text{M}$ <i>cis</i> DCE y 50 $\mu\text{M}$ <i>trans</i> DCE)	14.94 $\pm$ 4.45	22.45 $\pm$ 14.15	19.24 $\pm$ 10.33	16.99 $\pm$ 16.35	20.79 $\pm$ 17.66	20.36 $\pm$ 17.81	18.31 $\pm$ 10.54
mgS <sup>2-</sup> /gSSV TCE (100 $\mu\text{M}$ de TCE)	21.03 $\pm$ 0.92	46.88 $\pm$ 0.92	31.86 $\pm$ 3.8	24.63 $\pm$ 3.78	31.25 $\pm$ 2.22	33.28 $\pm$ 0.86	29.21 $\pm$ 0.71

Experimentos de actividad Sulfato Reductora

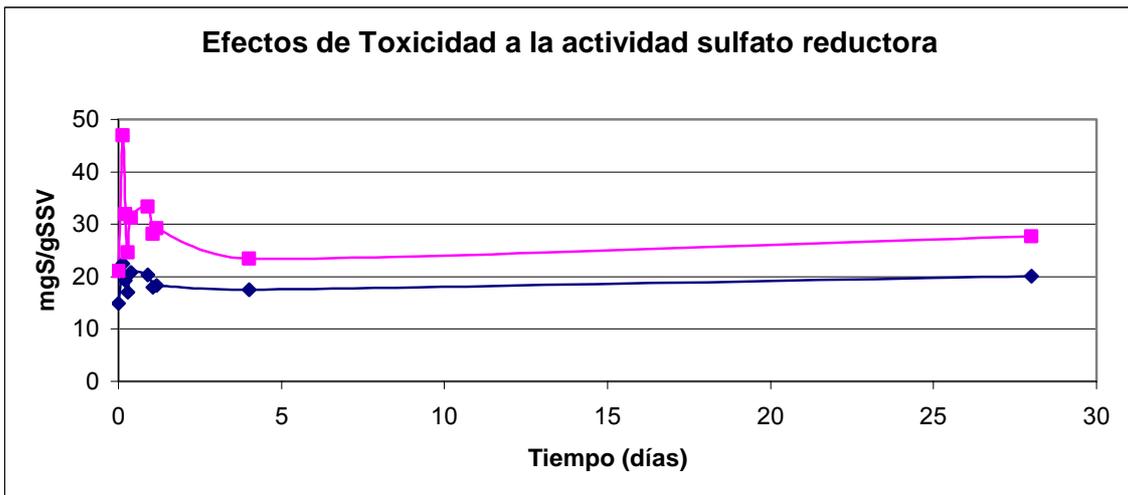


Gráfico No. 5 Efectos de Toxicidad a la actividad sulfato reductora a 100  $\mu\text{M}$  TCE (cuadros) y 100  $\mu\text{M}$  *cis-trans* DCE (rombos).

## 6.4 Extracción de ADN

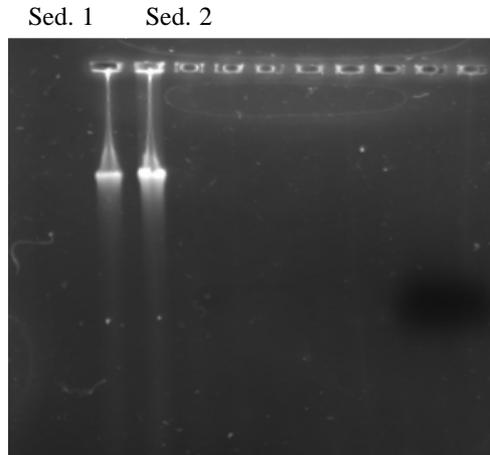


Fig. No. 6.1 Gel de Electroforesis de Extracción de ADN

Las dos bandas mostradas en la figura 5.1 pertenecen a la extracción de ADN de tratamientos del experimento de enriquecimiento a los 120 días de incubación. Son dos bandas debido a que se realizó la extracción de sedimento 1 y sedimento 2.

## 6.5 Biodegradación de TCE en presencia de sedimentos vivos

A los 32 días de incubación se añadió TCE en una concentración de 300  $\mu$ M, previamente se realizó una lectura de la actividad sulfato reductora, posteriormente se continuó con dichas lecturas.

Tabla No. 14 Biodegradación – Actividad Sulfato Reductora

Tiempo (días)	Control químico $\text{mgS}^{-2}/\text{gSSV}$	Control biótico $\text{mgS}^{-2}/\text{gSSV}$	Sin Redox $\text{mgS}^{-2}/\text{gSSV}$	Cianocobalamina $\text{mgS}^{-2}/\text{gSSV}$	Riboflavina $\text{mgS}^{-2}/\text{gSSV}$
21	0 $\pm$ 0	1.27 $\pm$ 0.07	1.47 $\pm$ 0.08	1.96 $\pm$ 0.09	1.50 $\pm$ 0.08
32	0.19 $\pm$ 0.05	2.14 $\pm$ 0.09	1.93 $\pm$ 0.09	3.61 $\pm$ 0.12	3.3 $\pm$ 0.12
38	0.03 $\pm$ 0.005	2.17 $\pm$ 0.09	2.27 $\pm$ 0.09	2.95 $\pm$ 0.11	2.14 $\pm$ 0.09
49	0.04 $\pm$ 0.01	1.65 $\pm$ 0.08	2.91 $\pm$ 0.1	2.82 $\pm$ 0.1	2.18 $\pm$ 0.09
66	0.05 $\pm$ 0.03	2.05 $\pm$ 0.09	2.64 $\pm$ 0.1	1.82 $\pm$ 0.09	2.15 $\pm$ 0.09
77	1.1 $\pm$ 0.06	0.9 $\pm$ 0.07	2.04 $\pm$ 0.09	1.71 $\pm$ 0.08	1.61 $\pm$ 0.08
92	1.8 $\pm$ 0.06	1.71 $\pm$ 0.06	2.6 $\pm$ 0.08	2.2 $\pm$ 0.07	2.22 $\pm$ 0.07

El experimento se realizó con 15 g de sedimento en adición de 300  $\mu$ M TCE

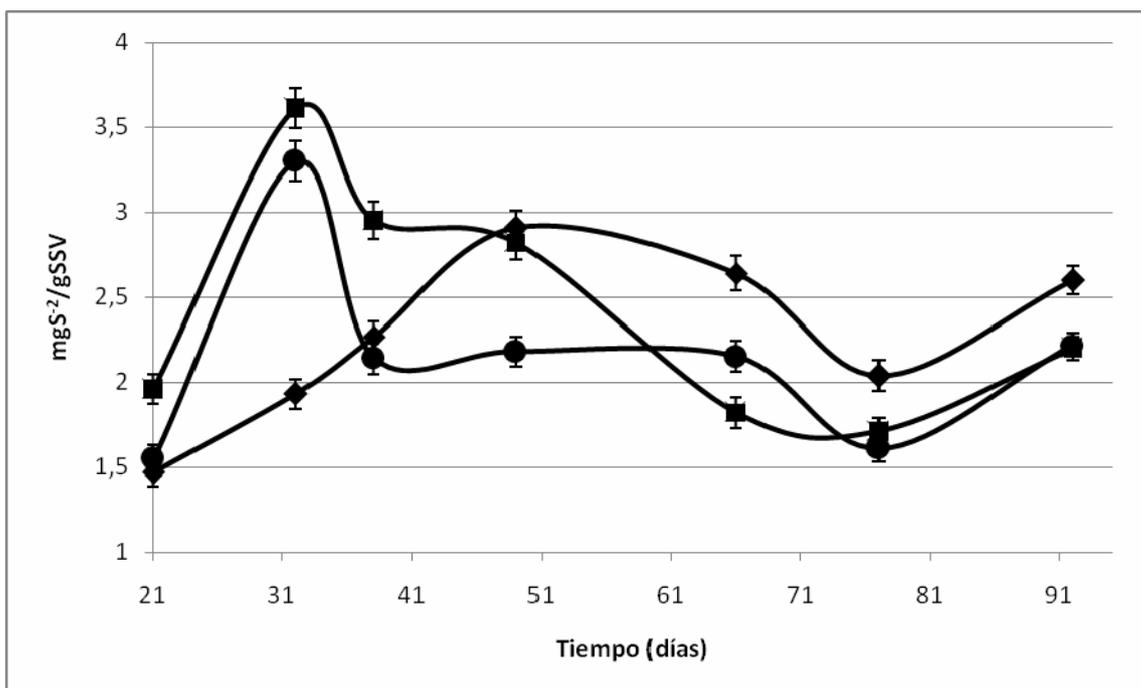


Gráfico No. 6 Actividad sulfato reductora durante la biodegradación de TCE (AGV como sustrato). Sin mediadores redox (rombos), Cianocobalamina (cuadros) y Riboflavina (círculos). La adición de TCE se realizó a los 32 días de incubación.

Se realizaron mediciones de sulfuro en el *espacio de cabeza* a los 86 días de incubación, los resultados fueron:

Tabla No. 15 Concentración de sulfuro en el espacio de cabeza de los experimentos de biodegradación.

Tratamiento	Concentración mgS <sup>2</sup> /gSSV
Control Químico	7.95±1.44
Control Biótico	72.95±2.4
Sin Redox	96.25±5.78
Cianocobalamina	88.63±7.23
Riboflavina	72.54±3.84

En la Tabla No. 16, se presentan los resultados de la biodegradación de TCE (350mgDQO/L de AGV como sustrato)

Tiempo (días)	Control químico (concentración μM TCE)	Sin Redox (concentración μM TCE)	Cianocobalamina (concentración μM TCE)	Riboflavina (concentración μM TCE)
32	300	300	300	300
47		53.6±5.3	70.04±11.67	41.36±4.57
69	46.08±7.9	45.56±5.91	42.33±0.02	21.22±2.35
78	19±0.33	20±0.87	20±1.25	21±1.25
93	16±0.12	17±1.08	16±1.7	17±0.8
108	10±0.06	8±0.66	13±2.69	14±5.57

## 7. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Actividad Metanogénica

Los microorganismos metanógenos cohabitan con los sulfato reductores, y se deseaba conocer la producción de metano utilizando AGV como sustrato para determinar si existía competencia entre ambos tipos de microorganismos.

El primer experimento de actividad metanogénica se realizó a 37 ° C, y debido a los resultados obtenidos por medio del análisis del gas de la atmósfera de las botellas por medio de cromatografía de gases de inyección a la flama (Ver tablas No. 1, 2) fue posible verificar que la actividad metanogénica presente en los sedimentos fue considerablemente baja, es decir que solo se encontraron trazas; pues al interpolar los datos obtenidos en la curva tipo (tiempo de retención del metano 2.9 min) los resultados observados fueron negativos. Es por ello que la actividad metanogénica presente en dichos experimentos es despreciable.

Para el segundo experimento de actividad metanogénica las condiciones fueron muy similares a las cuales el primer experimento, y el análisis de los resultados permite comprobar que el metano presente en la atmósfera corresponde a valores bajos, considerados como trazas debido a que son prácticamente despreciables (Ver tabla No. 3).

Para el tercer experimento se tenía la variante de la temperatura, pues éste se desarrolló a 75° C y esto podría ser de importancia, pues los sedimentos provenían de ventilas hidrotermales por lo que era posible que a una mayor temperatura tuvieran una mayor actividad. Los resultados obtenidos fueron similares a los experimentos anteriores, pues el metano obtenido correspondió únicamente a trazas (Ver Tabla No. 4) y por lo tanto la temperatura no incrementó la actividad metanogénica.

Con respecto a los experimentos de enriquecimiento se monitoreó la producción de metano, siendo ésta de trazas únicamente (Ver Tabla No. 5), por lo que no sería una actividad que intervendría a las actividades de nuestro interés.

En todos los experimentos fueron colocados a la par controles, los cuales carecían de sustrato y como se pudo observar esto no fue un factor que influyera para que disminuyera o aumentara de manera notable la actividad metanogénica, pues las variaciones entre controles (Sin AGV como sustrato) y tratamientos (con sustrato) no fue notable (Ver Gráfico No. 1).

### 7.2 Actividad Sulfato Reductora

Referente a los experimentos de actividad metanogénica la actividad sulfato reductora estuvo presente pues aunque las condiciones no eran las más óptimas para la reducción se detectó la presencia de sulfuro.

Para el primer experimento de actividad metanogénica, se obtuvieron a 35 días de incubación concentraciones de entre 0.006 y 0.3 para los controles, mientras para los tratamientos fue de entre 0.6 y 20  $\text{mgS}^{-2}/\text{gSSV}$  (Ver Tabla No. 6). Tomando en cuenta que los controles no tienen AGV como sustrato.

A un tiempo de incubación de 35-40 días se adicionó 20  $\mu\text{M}$  de TCE, y posteriormente a los 50 días se volvió a medir la concentración de sulfuro. Esta se incrementó considerablemente pues para los controles los valores oscilaron entre 3 y 13  $\text{mgS}^{-2}/\text{gSSV}$  y para los tratamientos de entre 4 y 60  $\text{mgS}^{-2}/\text{gSSV}$  (Ver Tabla No. 6). El incremento de las concentraciones de sulfuro después de la adición de TCE muy probablemente corresponde a que los microorganismos están tomando al compuesto clorado como aceptor de electrones, provocando que tengan gran actividad al estar reduciendo el TCE y obteniendo energía para su crecimiento.

En el segundo experimento de actividad metanogénica a 37° C la concentración de sulfuro presente después de 23 días de incubación fue de 0.06 a 1.6  $\text{mgS}^{-2}/\text{gSSV}$ . Y en los tratamientos de 0.09 a 1.6  $\text{mgS}^{-2}/\text{gSSV}$  (Ver Tabla No. 7).

Para el tercer experimento de actividad metanogénica en los controles las concentraciones de sulfuro detectadas fueron entre 0.7 y 4  $\text{mgS}^{-2}/\text{gSSV}$ . Para los tratamientos las concentraciones fueron alrededor de 1 y 5  $\text{mgS}^{-2}/\text{gSSV}$  (Ver Tabla No. 8). Estas determinaciones se hicieron durante los 29 días de incubación. Recordando que la temperatura de incubación es de 75° C.

Como podemos observar las concentraciones de sulfuro presente en los experimentos a 75° C con considerablemente mayores a los experimentos colocados a 37° C. Con esto nos podemos dar cuenta que efectivamente como se ha reportado la temperatura es un buen catalizador para la actividad sulfato reductora. Tomando en cuenta los resultados hasta antes de la adición de TCE en el primer experimento. Pues aunque los experimentos colocados a 37° C tenían un mayor tiempo de incubación que los colocados a 75° C, estos últimos con una mayor actividad sulfato reductora.

Los experimentos que fueron exclusivamente para actividad sulfato reductora el sustrato empleado fue acetato de sodio a la concentración indicada. Además de que para este experimento se indujeron las condiciones para que se favoreciera la actividad sulfato reductora, es por ello que agregamos al medio 4 g/L de  $(\text{SO}_4)^{-2}$ . Y por otra parte también agregamos NaCl (2.5 g/L) debido a que los sedimentos fueron extraídos de aguas marinas, por lo que en su ambiente natural están expuestos a cierta concentración de salinidad por lo que necesitábamos agregarle sal a los experimentos para igualar las condiciones naturales.

Las concentraciones obtenidas de sulfuro fueron de entre 0.68 y 1.5  $\text{mgS}^{-2}/\text{gSSV}$  para 29 días de incubación. Y para los experimentos a 21 días de incubación la concentración de sulfuro osciló entre 1 y 4  $\text{mgS}^{-2}/\text{gSSV}$  (Ver Tabla No.9).

### 7.3 Experimentos de enriquecimiento

En el experimento de enriquecimiento se colocó más cantidad de sedimento (10 g) aunque la concentración de sustrato (350 mgDQO/L) igualmente se aumentó. Con respecto a los otros experimentos, tratando de conservar la misma proporción entre sedimentos y sustrato.

Para el experimento de enriquecimiento primeramente se colocó los sedimentos con el sustrato por dos semanas para la aclimatación de los microorganismos; para luego realizar el enriquecimiento con la adición de 50  $\mu\text{M}$  de TCE.

La producción de sulfuro medida antes de la adición de TCE fue de aproximadamente 0.13  $\text{mgS}^{-2}/\text{gSSV}$  a los 14 días de incubación para controles, mientras que para los tratamientos a las mismas características de incubación fue de 0.5 a 0.7  $\text{mgS}^{-2}/\text{gSSV}$ . Luego se realizó la adición del compuesto clorado y la actividad sulfato reductora fue de trazas para los controles y para los tratamientos de 0.38  $\text{mgS}^{-2}/\text{gSSV}$  a 20 días de incubación. A las 2 semanas de haber agregado el TCE se volvió a medir sulfuro y las concentraciones fueron de 0.4 a 0.7 en controles y 2.5 a 3  $\text{mgS}^{-2}/\text{gSSV}$  en tratamientos a 28 días de incubación (Ver Tabla No. 10).

En el experimento de enriquecimiento pudimos observar como afecta la adición de TCE a los microorganismos, pues hasta antes de adicionarlo se tenía una buena producción de sulfuro, pero al adicionar el clorado la concentración bajó, lo cual hipotéticamente fue porque los microorganismos nunca antes habían estado expuestos a compuestos clorados y tuvieron que adaptarse para volver a reiniciar su actividad reductora. Pero después de un tiempo de agregado el compuesto clorado la actividad sulfato reductora se incrementó de manera muy considerable. Y de igual manera como en el primer experimento de actividad metanogénica que se le colocó TCE la actividad aumentó lo mismo que para el experimento de enriquecimiento después de unos días de colocado el TCE. La alta producción de sulfuro después de esto hace pensar que quizá fue porque después de adaptarse los microorganismos empezaron a utilizar al clorado como aceptor de electrones y es por ello que se incrementó tanto su actividad.

Hay que considerar que para la actividad sulfato reductora sí afecta de manera considerable la ausencia o presencia de sustrato en el medio, es por ello que para tener una actividad constante reductora es importante mantener concentraciones de nutrientes en los experimentos. Es por ello que se continuó con la adición de sustrato y de compuesto clorado permanentemente (a intervalos de 8 días). Al continuar el monitoreo de la actividad sulfato reductora se pudo observar que al cabo de aproximadamente 4 meses de colocado el experimento, esta incrementó casi 3.5 veces en comparación con los valores iniciales (alrededor de 12  $\text{mgS}^{-2}/\text{gSSV}$  en tratamientos).

## 7.4 Efectos de Toxicidad

Debido a los resultados obtenidos se puede apreciar que el efecto que se tiene en ambas concentraciones (25  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ ) del compuesto clorado es similar.

Pues en los tratamientos después de 3 horas aprox. de adicionar el compuesto la actividad sulfato reductora disminuye pero después de este tiempo la actividad se comienza a recuperar, incluso llega a ser mayor en el lapso de las 26 horas de monitoreo que lo que se había logrado en 29 días. (Ver Tabla No. 11, 12)

Por otro lado al comparar controles con tratamientos se puede ver que en los primeros se llega a un punto crítico después de 20 horas que es donde se tiene una menor actividad pero de igual manera alcanza a recuperar su actividad inicial. Además de que se mantiene la relación que existe entre la actividad de los controles con respecto a la de los tratamientos (Ver Gráficos 3, 4).

Es por ello que se puede decir que el efecto causante en ambas concentraciones del compuesto clorado es prácticamente el mismo, pues los experimentos siguen el mismo patrón de comportamiento durante la medición de la actividad de sulfuro.

Respecto a los experimentos que contenían 100  $\mu\text{M}$  de TCE y 100  $\mu\text{M}$  DCE, las cantidades de sulfuro presente fueron relativamente grandes (valores entre 18 y 30  $\text{mgS}^{-2}/\text{gSSV}$ ), aunque en algún momento parecía disminuir la actividad esta se recuperó. (Ver Tabla No. 13). Además de que al parecer los microorganismos aprovecharon mejor el TCE, pues los valores de sulfuro fueron mayores con respecto a los de DCE.

Por lo que aunque los sedimentos nunca había estado expuestos a contaminantes clorados, estos han sido utilizados por los microorganismos como una fuente de energía para tener una mayor actividad reductora, es por ello que los efectos tóxicos que podrían provocar este tipo de compuestos han sido empleados en beneficio de los microorganismos. Al incrementarse la actividad sulfato reductora, después de la adición de los compuestos clorados, estos contribuyen de manera positiva al metabolismo de las bacterias presentes en los sedimentos.

Esto refuerza los resultados obtenidos por los experimentos de enriquecimiento, ya que en ambos se puede observar primero una disminución de la actividad, pero al cabo de un determinado tiempo esta se recupera e incluso llega a ser muy superior a la actividad inicial. Pero de igual forma los compuestos clorados tienen un efecto más positivo cuanto más clorado este (el aprovechamiento del TCE fue mayor que para el DCE).

## 7.5 Extracción de ADN

Los resultados obtenidos de la extracción de ADN, no fueron los óptimos, ya que la extracción tuvo muchísimas complicaciones. Se emplearon distintas variantes

del método de extracción, incluso la utilización de kit para extracción; pero no se obtuvieron buenos resultados.

Al realizar las extracciones, únicamente se extraían sales o proteínas, ya que la consistencia que presentaban era de una pastilla rígida y no de una tela muy ligera como usualmente se observa el ADN.

Los problemas que se tuvieron en la extracción muy probablemente se deban a la naturaleza de la muestra, pues como se mencionó son sedimentos marinos, los cuales tienen una gran cantidad de componentes, que quizá sea difícil separar y llegar hasta las células bacterianas.

Hasta la fecha se ha seguido intentando realizar extracciones exitosas probándose distintos reactivos. El gel mostrado ha sido una de las pocas extracciones que se han podido llevar a cabo, pero el ADN obtenido no es de gran calidad pues se observa degradado.

Con estos resultados se han intentado llevar a cabo la amplificación del ADN bajo las condiciones mencionadas, pero debido a las características del material genómico no se han obtenido resultados satisfactorios.

## 7.6 Biodegradación de TCE en presencia de sedimentos vivos

La actividad sulfato reductora en los experimentos de biodegradación es constante (Ver Tabla No. 14) y muy similar a la obtenida en los experimentos de actividad sulfato reductora. Pues la actividad oscila entre 1 y 3  $\text{mgS}^{-2}/\text{gSSV}$  dependiendo del tiempo de incubación, algunos experimentos fueron colocados sin mediadores redox y mientras que otros contenían en el medio cianocobalamina o riboflavina; aunque esto no fue un factor importante pues los resultados entre todos los experimentos dependiendo el tiempo de incubación fue similar.

Los resultados obtenidos en las mediciones del espacio de cabeza luego de 86 días de incubación para los experimentos de biodegradación muestran una mayor actividad en los tratamientos con cianocobalamina ( $88.63 \text{ mgS}^{-2}/\text{gSSV}$ ).

La presencia de TCE provoca una reducción en la actividad sulfato reductora de aproximadamente 1.5 veces en el medio. Sin embargo, las concentraciones de sulfuro en el *espacio de cabeza* a los 86 días de incubación, indican una elevada actividad sulfato reductora.

En los resultados obtenidos de la biodegradación de TCE se observa que al cabo de 15 días de exposición al disolvente, los microorganismos presentes en los sedimentos han logrado reducir la concentración de éste en un 86% (tratamientos con riboflavina). Trascorridos 76 días de incubación con TCE el mayor decremento en la concentración de TCE se presenta en los tratamientos sin mediadores redox (97.3%). Se logró detectar y cuantificar cloruro de vinilo a los 78 días de

incubación, obteniéndose a concentraciones ( $\mu\text{M}$ ) para cada tratamiento de: sin mediadores redox  $58.86\pm 2.47$ , cianocobalamina  $125.96\pm 8.8$  y riboflavina  $58.78\pm 3.5$ . Así como la identificación de *cis* y *trans* DCE (aún no cuantificable).

## 8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Al haber incremento de la actividad sulfato reductora en presencia de TCE es muy posible que se esté realizando la degradación del compuesto clorado, ya que resultados obtenidos en experimentos de degradación muestran una reducción de TCE al cabo de 76 días de incubación fue de 97%, se detectó la presencia de *cis* y *trans* DCE cloroetilenos y cloruro de vinilo bajo condiciones sulfato reductoras durante el curso del experimento. Se pretende analizar el experimento de biodegradación en su contenido de eteno, lo cual confirmaría un proceso de dehalorespiración.

En general en el transcurso de todo el experimento la producción de sulfuro se mantuvo constante y similar a aquella reportada durante los experimentos preparados para medir actividad sulfato reductora; la producción más alta de sulfuro tanto en el líquido como en el espacio de cabeza se detectó en los tratamientos que no contenían mediadores redox, en los cuales la degradación de TCE resultó ser más rápida y en una mayor extensión.

La influencia de la cianocobalamina y riboflavina puede ser relativamente baja en catalizar la degradación del TCE a cloroetenos y eteno, pero se planea evaluar su influencia cuando el compuesto inicial en los experimentos de degradación sean *cis* y *trans* DCE.

Se logró detectar y cuantificar cloruro de vinilo a los 78 días de incubación, obteniéndose las siguientes concentraciones ( $\mu\text{M}$ ) para cada tratamiento: Sin mediadores redox  $58.86\pm 2.47$ , cianocobalamina  $125.96\pm 8.8$  y riboflavina  $58.78\pm 3.5$ . También se logró identificar la presencia de *cis* y *trans* DCE (aunque este no ha sido cuantificado).

Se llevarán a cabo extracciones de ADN en los experimentos de biodegradación para identificar la presencia de dehalogenasas. Se realizarán comparaciones entre dehalogenasas presentes en los experimentos de biodegradación y de enriquecimiento con el fin de detectar la dehalogenasa más abundante y posteriormente identificar el microorganismo al que corresponde.

Se espera que al encontrar las enzimas responsables de la dehalogenación se podría confirmar que el proceso se debe a respiración y se pueda escalar a biorreactores con el fin de procesar concentraciones más elevadas de cloroetenos.

## 9. AGRADECIMIENTOS

Financiamiento por Dr. Enrique Durán Páramo, M.C. Paola Zárate, laboratorio de Biotecnología Molecular (UPIBI-IPN), Dra. Claudia Guerrero Barajas dirección y financiamiento del proyecto.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Agency of Toxic Substances and Disease Registry, Department of Health and Human Services, Polychlorinated Biphenyls, 2001.
2. Alfonso P., Prol-Ledesma R.M., Canet C., et al. (2003) Sulfur isotope geochemistry of the submarine hydrothermal coastal vents of Punta Mita, México. *Journal of Geochemical Exploration* (78-79): 301-304.
3. *Anteproyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-014-CNA-2003 Requisitos para la Recarga Artificial de Acuíferos*, Comisión Nacional del Agua, Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
4. Arcangeli, J. P. and E. Arvin (2004). "Methanotrophic biodegradation of cis-1,2-dichloroethylene in a continuously fed fixed-film bioreactor." *Water Science and Technology* 49(11-12): 231-236.
5. Atlas Ronald M., Bartha Richard. *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental*. Editorial Addison Wesley, 4° Edición.2002.
6. Berkaw Mary, Sowers Kevin, May Harold (1996). Anaerobic *ortho* Dechlorination of Polychlorinated Biphenyls by Estuarine Sediments from Baltimore Harbor. *Applied and Environmental Microbiology*. p. 2534–2539 Vol. 62, No. 7.
7. Bouwer, E.J., McCarty, P.L., (1983). Transformation of 1- and 2- carbon halogenated aliphatic organic compounds under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1286–1294.
8. Canet Carles, Prol-Ledesma Rosa, Torres Ignacio, Gilg Albert, Villanueva Ruth, Lozano-Santa Cruz Rufino. (2005) Silica-carbonate stromatolites related to coastal hidrothermal venting in Bahya Concepción, Baja California Sur, México. *Sedimentary Geology* 174 : 97– 113
9. De Weerd K.A, Mandelco L, Tamer R.S.. *Desulfomonile tiedjei* gen. nov. and sp. nov. a novel anaerobic, dehalogenating, sulfate reducing bacterium. *Arch Microbial* 154:23-30.
10. Fallick, A.E., Ashton, J.H., Boyce, A.J., Ellam, R.M., Russell, M.J. (2001). Bacteria were responsible for the magnitude of the world-class hydrothermal base metal sulfide orebody at Navan, Ireland. *Econ. Geol.* 96, 885–890.
11. Guerrero Bajas Claudia, Field Jim. Riboflavin and Cobalamin Mediated Biodegradation of Chloroform in a Methanogenic consortium. 2004. Published Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/bit.20379

12. Hoja Informativa Sobre Sustancias Peligrosas, New Jersey Department of Health and Senior Services, Enero 2002.
13. Holliger Christof, Wohtfarth Pert, Diekert Gabriele (1999). Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 22: 383-398.
14. Holliger Christof, Hahn Dittmar, Harmson Hermie, et.al. (1998) *Dehalobacter restrictus* gen – nov and sp. nov. a strictly anaerobic bacterium that reductively dechlorinates tetra and trichlorethene in an anaerobic respiration. *Arch Microbiol* 169:313-321.
15. King, G. M., M. J. Klug, and D. R. Lovley. (1983). Metabolism of acetate, methanol, and methylated amines in intertidal sediments of Lowes Cove, Maine. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:1848-1853.
16. King, G. M., and W. J. Wiebe. (1980). Tracer analysis of methanogenesis in salt marsh soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:877-881.
17. Kristjansson, J. K., P. Schoenheit, and R. K. Thauer. (1982). Different Ks values for hydrogen of methanogenic bacteria and sulfate reducing bacteria: an explanation for the apparent inhibition of methanogenesis by sulfate. *Arch. Microbiol.* 131:278- 282.
18. Laanbroek, H. J., and N. Pfennig. (1981). Oxidation of short-chainfatty acids by sulfate-reducing bacteria in freshwater and marine sediments. *Arch. Microbiol.* 128:330-335.
19. Lovley, D. R., D. F. Dwyer, and M. J. Klug. (1982). Kinetic analysis of competition between sulfate reducers and methanogens for hydrogen in sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:1373-1379.
20. Lovley, D. R., and M. J. Klug. (1983). Sulfate reducers can outcompete methanogens at freshwater sulfate concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:187-192.
21. Lee MD, Odom JM, Buchanan RJ. New perspectives on microbial dehalogenation of chlorinated solvents: Insights from the field. *Annu Rev Microbiol* 1998; 52:423 52.
22. Lozano Teruel José Antonio. (1997) Los extraños extremófilos, *Revista Ciencia y Salud*, España.
23. Magnuson J. K., Romine, M. F. Burris, D. R. and Kingsley, M. T. (2000). Trichloroethene Reductive Dehalogenase from *Dehalococcoides ethenogenes*: Sequence of *tceA* and Substrate Range Characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 5141–5147 Vol. 66.
24. Maymó-Gatell, X., Y.-T. Chien, J. M. Gossett and S. H. Zinder (1997). "Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene." *Science* 276: 1568-1571.
25. Mountfort, D. O., and R. A. Asher. (1981). Role of sulfate reduction versus methanogenesis in terminal carbon flow in polluted intertidal sediment of Waimea Inlet, New Zealand. *Appl. Environ. Microbiol.* 42:252-258.
26. Mohn W.W., Tiedje J.M (1990). Strain DCB 1 conserves enegy for growth from reductive dechlorination coupled to formate oxidation. *Arch Microbiol* 153:267-271.

27. Ohmoto, H., Goldhaber, M.B. (1997). Sulfur and carbon isotopes. In: Barnes, H.L. (Ed.), *Geochemistry of Hydrothermal Ore Deposits*, 3rd ed. Wiley, NY, pp. 517– 611.
28. Oremland, R. S., and S. Polcin. (1982). Methanogenesis and sulfate reduction: competitive and noncompetitive substrates in estuarine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:1270-1276.
29. ProlLedesma, R.M.; Canet, C.; Tolson, Gustavo; GarcíaPalomo, Armando; Miller, R.; Rubio, M.A.; Torres-de León, R.; Huicochea Alejo, J.S.(2003). Basaltic volcanism and submarine hydrothermal activity in Punta Mita, Nayarit, Mexico. *Guidebook for the field trips of the 99<sup>th</sup> Geological Society of America Cordilleran Section Annual Meeting, Publicación Especial 1, Field trip 7*, p. 169–182
30. Parsons, F., Wood, P.R., DeMarco, J., (1984). Transformation of tetrachloroethene and trichloroethene in microcosms and ground-water. *J. Am. Water Works Assoc.* 76, 56– 59.
31. Rysavy Jaon, Yan Tao, Novak Paige. (2005). Enrichment of anaerobic polychlorinated biphenyl dechlorinators from sediment with iron as a hydrogen source. *Water Research* 39: 569-578.
32. Senior, E., E. B. Lindstrom, I. M. Banat, and D. B. Nedwell. (1982). Sulfate reduction and methanogenesis in the sediment of a saltmarsh on the East Coast of the United Kingdom. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:987-996.
33. Sorensen, J., D. Christensen, and B. B. Jorgensen. (1981). Volatile fatty acids and hydrogen as substrates for sulfate-reducing bacteria in anaerobic marine sediment. *Appl. Environ. Micro-biol.* 42:5-11.
34. Scientific Dossier on the Microbial Degradation of Chlorinated Compounds.
35. Trueper, H. G. an Schlegel, H. G., (1964), *Antonie van Leeuwenhoek* 30: 225-238 NEN 3235.8.3
36. University of Arizona, Center for Toxicology, *Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental*, 2004.
37. Vetriani Costantino, Reysenbach Anna-Louise, Doreè Joeël. (1998) Recovery and phylogenetic analysis of archaeal rRNA sequences from continental shelf sediments. *FEMS Microbiology Letters* 161: 83-88.
38. Wackett, L. P. (2004). Evolution of enzymes for the metabolism of new chemical inputs into the environment. *Journal of Biological Chemistry* 279:41259-41262. (7)
39. Winfrey, M. R., and D. M. Ward. (1983). Substrates for sulfatereduction and methane production in intertidal sediments. *Appi. Environ. Microbiol.* 45:193-199.

## **ANEXO 1 Caracterización de Sedimentos**

### **- Determinación de pH**

Para determinar el pH se calibró el potenciómetro (Oakton pH/CON S10 Series) con buffer pH 4 y pH 7. Se pesa 1 gramo de la muestra disolviéndola en 20 mL de agua destilada, para por último medir por triplicado el pH de la muestra. Para la toma de cada lectura de pH de las distintas muestras, estas se dejaron en agitación y a una temperatura de 25° C. El pH correspondiente al Sedimento 1 fue de pH = 3.77; mientras que para el Sedimento 2 pH = 3.04.

### **- Determinación de % humedad**

Para la determinación de los porcentajes de humedad de las muestras de los sedimentos se ocuparon 3 crisoles de porcelana, los cuales se lavaron y se secaron para después pesarlos. Estos permanecieron en un desecador para evitar que absorbieran humedad. Las muestras se homogeneizaron perfectamente, esto realizado en la campana de flujo laminar. Al homogeneizar perfectamente las muestras se pesaron y agregaron 2 gramos de esta a cada uno de los crisoles. Para la determinación de la humedad de los sedimentos se dejaron secar los crisoles en la estufa a 120°C por 18 horas. Pasado el tiempo de secado se volvieron a pesar los crisoles y se determinó la humedad con la fórmula  $\% \text{Humedad} = [(\text{peso húmedo} - \text{peso seco}) / \text{peso húmedo}] * 100$ . Los resultados se muestran en las Tablas No. 17 y 18.

### **- Determinación de % Materia orgánica.**

Después de determinar el % de humedad de los sedimentos, las muestras se metieron a la mufla (Melisa Mufla) a una temperatura de 540°C por 20 horas aproximadamente para que las muestras se convirtieran en cenizas. Al sacarlas de la mufla las muestras deberán permanecer en el desecador para evitar que absorban humedad que ha sido retirada por completo. Dejar enfriar las muestras y después volverlas a pesar. Para determinar la cantidad de materia orgánica presente en las muestras se utilizará la fórmula  $\% \text{Materia Orgánica} = [(m' - m'') / (m - m'')] * 100$ . Donde m es el peso del crisol con muestra seca, m' el peso del crisol con ceniza y m'' el peso del crisol. Los resultados se muestran en las Tablas No. 17 y 18.

Tabla No. 17 % de humedad y % de Materia orgánica (Sedimentos 1)

Muestra	W cápsula seca (g)	w cápsula + muestra seca (g)	w cápsula + muestra húmeda (g)	w cápsula + cenizas (g)	w muestra húmeda (g)	w muestra seca (g)	% Humedad	% Materia orgánica	g muestra cenizas/g muestra húmeda (SSV)
I	41.3612	42.6623	43.3662	42.5920	2.0005	1.3011	34.96	61.3865	0.6152
II	40.1368	41.4450	42.1418	41.3747	2.0005	1.3082	34.60	61.7406	0.6188
III	39.0618	40.3791	41.0665	40.3099	2.0047	1.3173	34.28	62.2586	0.6226

Tabla No. 18 % de humedad y % de Materia orgánica (Sedimentos 2)

Muestra	w cápsula seca (g)	w cápsula + muestra seca (g)	w cápsula + muestra húmeda (g)	w cápsula + cenizas (g)	w muestra húmeda (g)	w muestra seca (g)	% Humedad	% Materia orgánica	g muestra cenizas/g muestra húmeda (SSV)
A	41.4127	42.1307	44.1328	42.0752	2.0021	0.7180	24.3535	64.1393	0.3309
B	41.5274	42.2663	44.2679	42.2103	2.0016	0.7389	24.9190	63.0828	0.3412
C	42.211	42.9532	44.9602	42.8986	2.007	0.7422	25.0121	63.0194	0.3426

## ANEXO 2 Preparación de Medios

- Solución de metales traza

Esta solución se preparó para incorporar a los medios de cultivo los distintos elementos en las concentraciones necesarias para nuestras bacterias, para lo cual se prepara 1 L de solución con la formulación (en mg/L) [29]:  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2800,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  50,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  106,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  414.87,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  50,  $\text{AlK}(\text{SO}_4) \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  175,  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  113,  $\text{Na}_3\text{CO}(\text{NO}_2)_6$  3392.67,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  157, EDTA 1000, Rezarsurina 200.

- Preparación del medio basal

Se prepara la solución del medio basal con los compuestos descritos a continuación, para un volumen de 1 L (en concentración de g/L): 7.5  $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$ , 2  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1.5  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5  $\text{NaHCO}_3$ , 1  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , 5 mL/L Solución Metales Trazas. Además necesitamos una concentración de 200mgDQO/L en 50

mL de Ácidos Grasos Volátiles (AGV), por lo que para 1 mL deberemos tener 10000mg/LDQO en proporción 1:1:1 de demanda química de oxígeno (DQO) de AGV: acetato de sodio 1.04 mM 0.004264g, propionato de sodio 0.6mM 0.00267g, butirato de sodio 0.42mM 0.00231g.

- Medio A

La solución se elaboró conteniendo (en g/L): 1.2 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.59 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O, 0.02 CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O, 2 CH<sub>3</sub>COONa, 5.91 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (concentración final de SO<sub>4</sub><sup>-2</sup> de 4g/L), 0.166 MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O, 0.56 NH<sub>4</sub>Cl, 0.04 extracto de levadura, 2mL solución de metales traza y 2.5 NaCl. Ajustar pH a 7 con NaOH.

- Solución de Vitaminas

La solución de vitaminas contiene los siguientes compuestos (mg/L): 20 biotina, 50 p-aminobenzoato, 50 pantotenato, 20 ácido fólico dihidratado, 50 ácido lipoico, 100 piridoxina, 50 nicotinamida y 50 tiamina.

### ANEXO 3 CURVAS TIPO

- Curva Tipo Riboflavina

Se preparará 100 mL de Riboflavina (RF -Sigma Aldrich de México No. 165) al 500µM Posteriormente con la solución preparada de 500µM se prepararan unas nuevas soluciones pues se realizaran diluciones para tener a concentraciones de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100µM; para el cálculo de dichas diluciones se empleó la formula de  $C_1V_1 = C_2V_2$ . A continuación se preparará una solución buffer con la cuál se completaran los volúmenes de las diluciones, para lo cual se utilizó K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> al 0.1 M Para realizar la curva patrón se determinará por espectrofotómetro (Beckman DU650 Spectrophotometer) la riboflavina a las distintas concentraciones preparadas y se leerá a una absorbancia de 450 nm en luz visible.

Tabla No. 19 Curva Tipo de Riboflavina (Abs 450 nm)

Concentración (µM)	Abs 450 nm
0	0
2	0.0155
5	0.02625
10	0.05375
20	0.08755
40	0.1704
60	0.3317
80	0.46845
100	0.58055

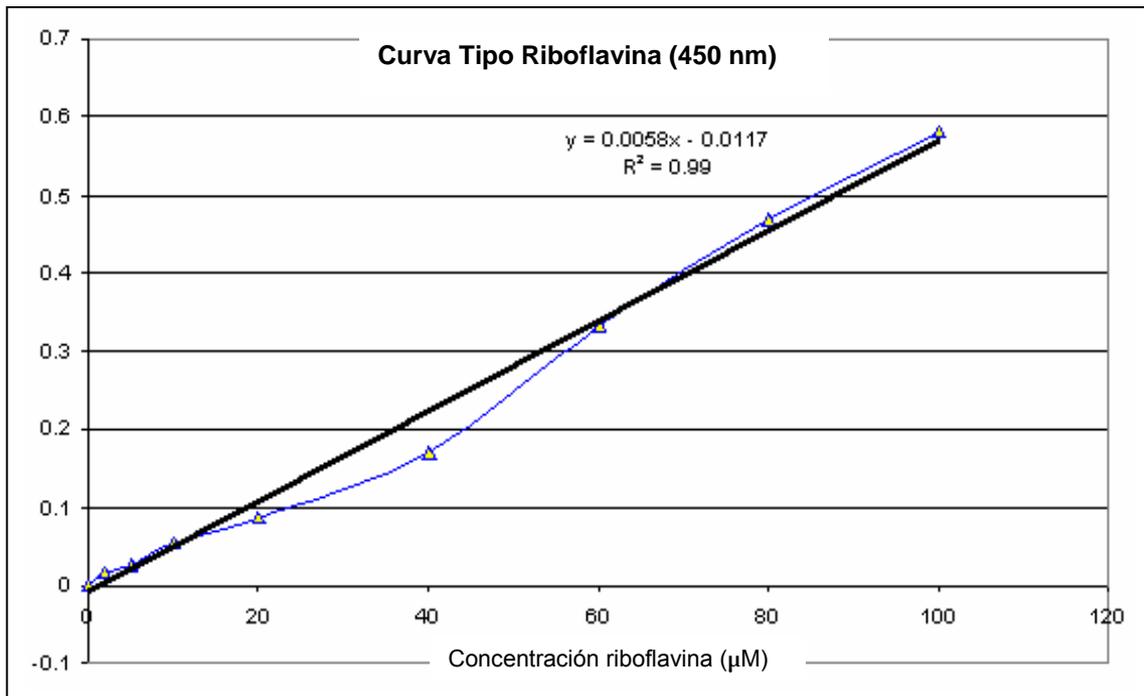


Gráfico No. 7 Curva Tipo Riboflavina

-Curva Tipo Hidroxocobalamina

Para la realización de esta curva patrón se preparó una solución multivitamínica que contiene 10000 μg de Hidroxocobalamina (OHB12) al 92.38%, 100 μg de tiamina (3.8%) y 50 μg de piridoxina (3.81%) con un volumen total de 2 mL. para posteriormente preparar a concentraciones de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 μM,; y además preparar una solución buffer de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; todo lo anterior siguiendo el mismo método para la preparación de la curva tipo de riboflavina. Para conocer la absorbancia a la que se leerá esta curva patrón se realizó un barrido en el espectrofotómetro, el cuál nos dio una lectura de la longitud de onda para nuestras soluciones de 560 nm, en la cuál se realizará nuestra curva.

Tabla No. 20 Curva Tipo de Hidroxocobalamina (Abs 560 nm)

Concentración (μM)	Abs 560 nm
0	-0.00015
2	0.014
5	0.0251
10	0.0567
20	0.1098
40	0.2102
60	0.3208
80	0.4126
100	0.5248

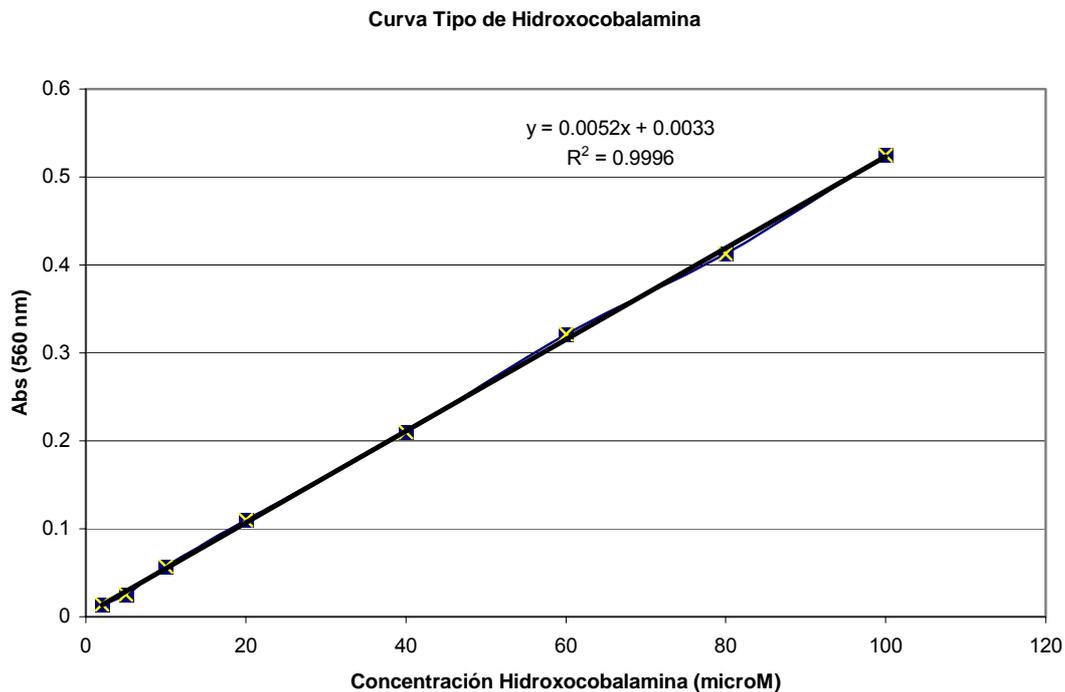


Gráfico No. 8 Curva Tipo Hidroxocobalamina

- Curva Tipo de Metano

Para la elaboración de esta curva tipo primero se tomaron 6 botellas serológicas, las cuales se levaron y se pesaron por triplicado para poder determinar el volumen exacto de cada una de ellas. Para ello previamente se pesaron las botellas secas, y después se llenaron hasta el tope con agua destilada y así volver a registrar su peso. Después se procedió a determinar la densidad del agua utilizada para así conocer el volumen exacto de cada una de las botellas. Y después se procedió a cerrar con tapones de hule y se sellaron con arillos metálicos engrapados a las botellas. Al determinar el volumen de cada botella se realizará el cálculo para que cada botella contenga determinado volumen de metano (0.1%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2% y 3%), esto se realizará primero sacando el volumen determinado de aire a cada botella con una jeringa, para después introducirles metano 99% (Supelco Scotty Analyzed Gases). Posteriormente las botellas se dejan reposar por aproximadamente 24 horas para que alcancen el equilibrio, para después inyectar las muestras en cromatógrafo (Perkin Elmer Auto System) y se puedan determinar las áreas de integración de las diferentes concentraciones de metano. De igual manera se procedió a tomar otras 6 botellas serológicas, para prepararlas nuevamente pero esta ocasión después de ser selladas las botellas se evacuaron con gas nitrógeno durante 15 minutos para eliminar el aire y poder detectar el área del metano en el cromatógrafo de gases de inyección a la flama. Las concentraciones suministradas de metano en cada botella también cambiaron y

ahora los nuevos volúmenes fueron de 0.8%, 1%, 1.5%, 2%, 2.6% y 3.6%, siendo estos más grandes para que el metano sea detectado por el cromatógrafo.

Por fines prácticos y debido a que la curva de Aire-CH<sub>4</sub> fue la que tuvo una mejor regresión, fue esa misma la que se tomó para realizar los cálculos.

Tabla No. 21 Áreas ocupadas por el Metano en la Curva Tipo 1 (Aire - CH<sub>4</sub>)

Botella	% Metano	Área
1	0.1	870665
2	0.5	3098500
3	1	5075900
4	1.5	7386900
5	2	9281700
6	3	13330500

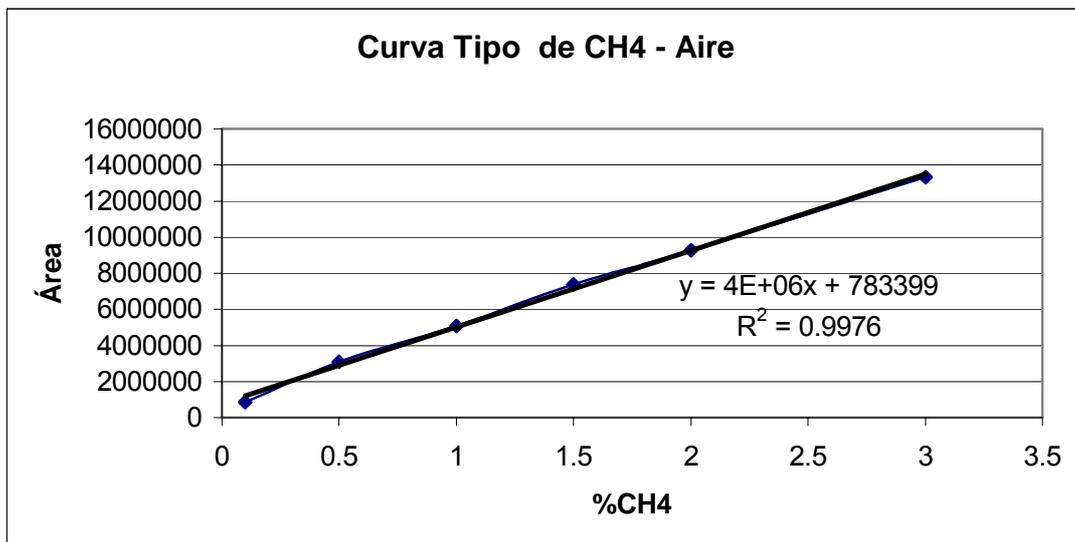


Gráfico No. 9 Curva Tipo Metano (CH<sub>4</sub> - Aire)

Tabla No. 22 Áreas ocupadas por el Metano en la Curva Tipo (N<sub>2</sub> - CH<sub>4</sub>)

Botella	% Metano	Área
1	0.8	4025700
2	1	5507966.667
3	1.5	8513250
4	2	11189666.67
5	2.6	12878500
6	3.6	17494500

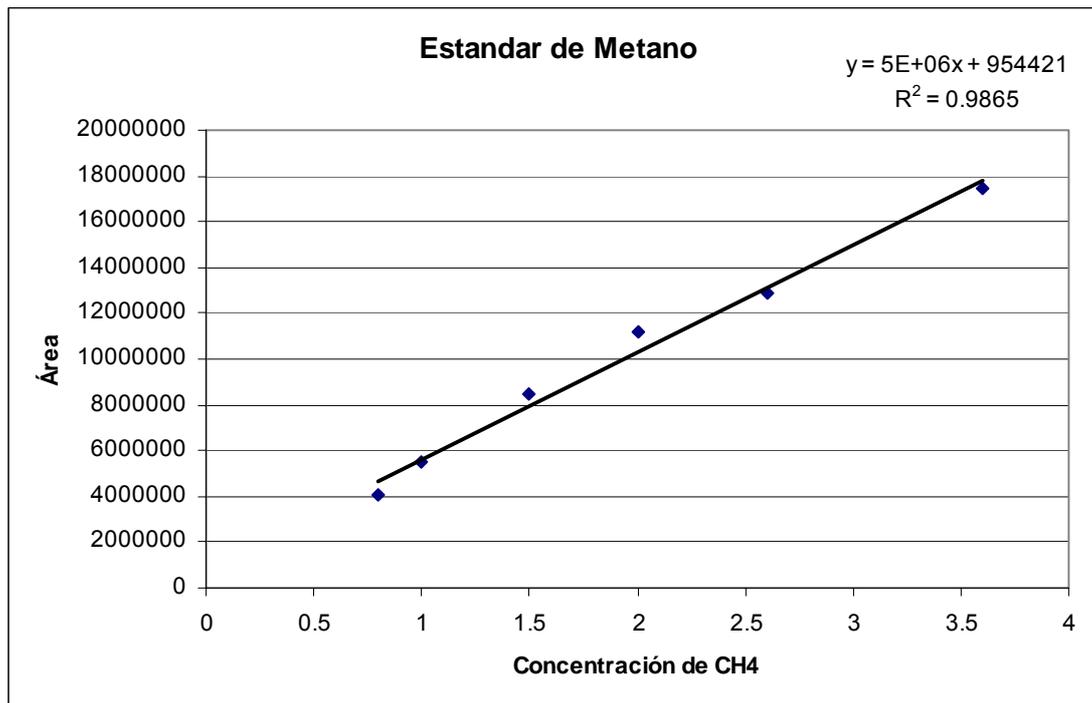


Gráfico No. 10 Curva Tipo Metano (N<sub>2</sub> – CH<sub>4</sub>)

- Curva Tipo Sulfuro

Para la elaboración de la curva tipo de Sulfuro se requirió preparar las siguientes soluciones [33]:

- Acetato de zinc. Se disolvieron 23.92g de Zn (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O en 800mL de agua destilada, posteriormente se adicionaron 2mL de ácido acético puro y se aforó a 1L.
- Sulfato de férrico amoniacal. Se disolvieron 10g de FeNH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 12H<sub>2</sub>O en 50mL de agua destilada, posteriormente se añadieron 2mL de ácido sulfúrico (18M) y se aforó a 100mL con agua destilada, luego se filtró la solución para eliminar el exceso de FeNH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 12H<sub>2</sub>O.
- Solución DMP. Se disolvió 1g de N,N-dimetil-fenil diamina oxalato en 100mL de agua destilada. En baño de hielo se añadieron 100mL de ácido sulfúrico (18M) y se aforó a 1L con agua destilada.

Para la realización de la curva tipo se añadieron de la siguiente manera las soluciones: 10 ml de acetato de zinc, sulfuro de sodio (a concentraciones de 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 ppm), 5 ml de solución de DMP y por último 0.250 sol'n de sulfato férrico amoniacal, aforar con agua destilada hasta 50 ml. Dejar pasar 30 minutos para leer las muestras en el espectrofotómetro a una abs de 670 nm.

La concentración de sulfuro (S<sup>-2</sup>) fue determinada empleando la siguiente ecuación:

$$[\text{Sulfuro}] = (\text{Es}-\text{E0}) (1/\text{Ext.f})(\text{Dil. f}) [=] \text{mg/L}$$

Donde:

Es= absorbancia de la muestra.

E0= absorbancia del blanco.

Ext. f= absorbancia de 1ppmS<sup>-2</sup>/L, asumiendo que es 1.

Dil. f= volumen total/volumen de la muestra.

Tabla No. 23 Curva Tipo de Sulfuro

ppm Sulfuro	Absorbancia 670 nm
0	0
0.1	0.12283
0.2	0.22493
0.4	0.53383
0.6	0.80566
0.8	0.97693
1	1.16806

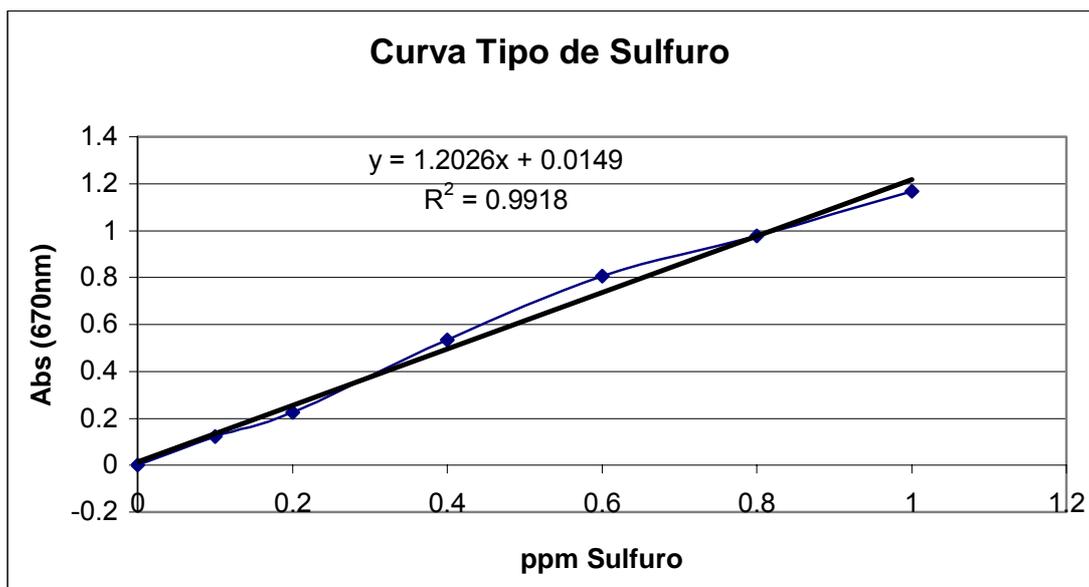


Gráfico No. 11 Curva Tipo Sulfuro

- Curvas tipo de TCE, *cis* 1,2, DCE, *trans* 1,2 DCE

Para la realización de estas curvas se empleó la ley de Henry para colocar 50 µL de TCE, 40 µL de *cis* 1,2, DCE y 42.2 µL DE *trans* 1,2 DCE en botellas serológicas y añadiendo 100 ml de agua destilada a cada una, para lograr una concentración de 5000 µM. Se sellaron y dejaron reposar para alcanzar el equilibrio.

Posterior a esto se realizaron las disoluciones para las curvas tipo, para lo cual se requirieron concentraciones de 2, 5, 10, 20, 40, y 60 µM de DCE (*cis* y *trans*),

para el TCE se requirieron concentraciones de 20, 50, 100, 200, 250, y 300  $\mu\text{M}$ ; todas en un volumen de 50 ml.

Para la obtención de las curvas tipo las muestras fueron leídas en cromatografía de gases de captura de electrones.

Tabla No. 24 Curva Tipo de TCE

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Área
300	1.63E+08
250	1.32E+08
200	1.13E+08
100	6.91E+07
50	4.69E+07
20	8.11E+06

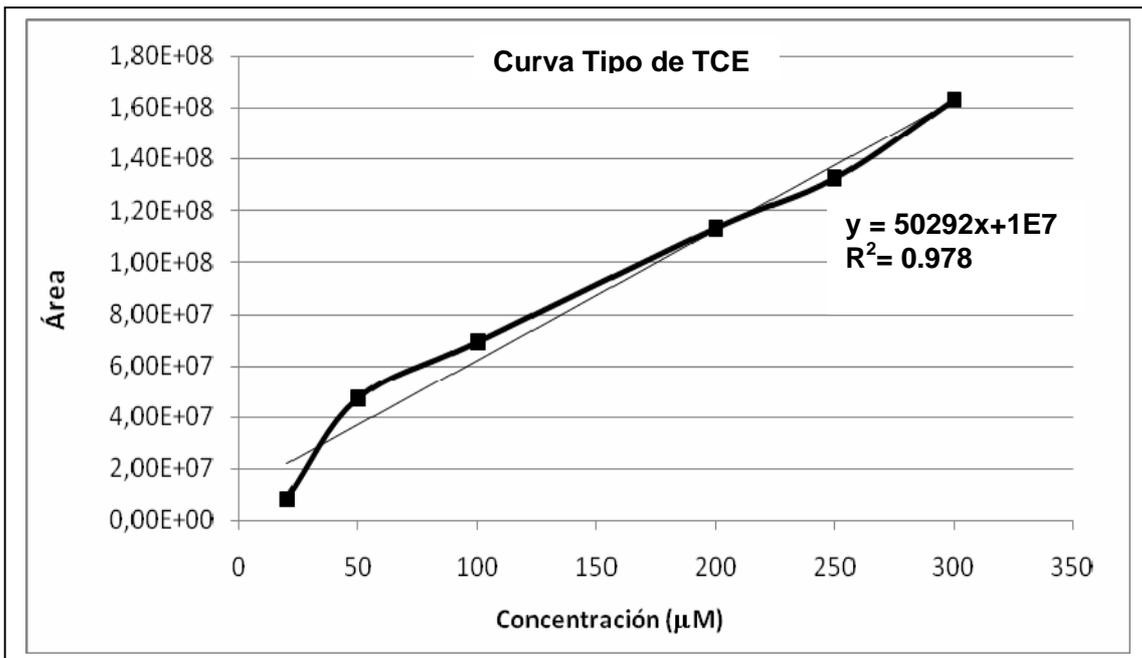


Gráfico No. 12 Curva Tipo de tricloroetileno (TCE)

#### **ANEXO 4 Extracción de cobalamina**

Se realizó la determinación de la cianocobalamina de los sedimentos siguiendo el siguiente procedimiento (por triplicado): Pesar 1.47 g de sedimento húmedo (equivalente a 0.5 g de SSV) y colocarlo dentro de 50 ml de agua destilada. Lavar los sedimentos por duplicado con 20 ml de agua destilada. Después filtrar. Colocar el filtrado en 20 ml de solución de acetato de sodio 0.08 M y 0.01% de KCN y pesar. Tomar 2 ml de la disolución, centrifugar y colocar los restos en un tubo vial tapado con papel aluminio, etiquetar como 1b, 2b, 3b para posteriormente pesarlo (estas serán las muestras extracelulares). Colocar a punto de ebullición durante 2 minutos y enfriar. Pesar por tercera ocasión. Tomar 2 ml y centrifugar para obtener las muestras intracelulares. Etiquetar como 1a, 2a y 3a.



## EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS (TERMÓFILAS) EN LA DEGRADACIÓN DE CONTAMINANTES RECALCITRANTES

Liliana Rosas Rocha, Selene Grajeda Sandoval, Enrique Durán Páramo, Claudia Guerrero Barajas\*

Dra. Claudia Guerrero Barajas, CIEMAD-IPN, Profesora Invitada - UPIBI-IPN, Av. Acueducto s/n, Col. Barrio la Laguna Ticomán. C.P. 07340, email: cguerrero@ipn.mx, Tel: 5729-6000 Ext.56342, Fax: Ext. 56305

*Palabras clave:* Bacterias sulfato reductoras, dehalogenasas, compuestos clorados, biodegradación anaerobia.

**Introducción.** Bacterias anaerobias estrictas tienen la capacidad de degradar por reducción compuestos clorados por vías catabólicas, obteniendo de esto energía para su crecimiento (dehalorespiración) (1). Esta actividad es realizada por enzimas dehalogenasas, las cuales están presentes en muchas bacterias sulfato reductoras (1). Se sabe que gran parte de la degradación de compuestos clorados se realiza por medio de estos microorganismos bajo condiciones anaerobias (1). En el proceso de dehalogenación las bacterias utilizan los compuestos organoclorados como aceptores de electrones y de esta manera son reducidos mientras que los microorganismos obtienen energía para crecer (1). Se ha encontrado que en ventilas hidrotermales se generan las condiciones ideales para que existan bacterias sulfato reductoras (2). En el presente trabajo se propone determinar la presencia de enzimas dehalogenasas involucradas en la degradación de compuestos clorados (Tricloroetileno, (TCE)) al enriquecer sedimentos marinos de ventilas hidrotermales de Punta Mita (Nayarit, Mex) con dichos compuestos bajo condiciones de sulfato-reducción.

**Metodología.** Incubar los sedimentos marinos a 37°C en medio basal adicionado con ácidos grasos volátiles AGV's en proporción 1:1:1 de DQO en condiciones anaerobias por aproximadamente un mes para promover la producción de sulfuro. Analizar contenido de sulfuro por el método de azul de metileno de Trueper *et. al.* 1964 (1). Medir la presencia de metano en la atmósfera de los cultivos por medio de cromatografía de gases cada semana. Medir la producción de sulfuro al cabo de una semana. Cuando la producción de sulfuro es constante evacuar la atmósfera con N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> y añadir TCE a una concentración de 50 µM, analizar el contenido de sulfuro a intervalos regulares de tiempo con el fin de determinar la toxicidad a la actividad sulfato reductora. Aproximadamente después de 3 meses de incubación de los experimentos se realiza la extracción de ADN por el método de fenol-cloroformo.

**Resultados y discusión.** Los datos de la actividad sulfato reductora mostrados en el cuadro 1 presentan evidencia de que conforme pasa el tiempo de incubación la actividad sulfato reductora se incrementa alrededor de 3.5 veces para los tratamientos después de haberse adicionado el compuesto clorado (incrementa de 0.7 mgS<sup>-2</sup>/gSSV a 2.47 mgS<sup>-2</sup>/gSSV después de la adición de TCE), durante todo este tiempo la adición de AGV's así como de TCE es constante; mientras que para los controles esta permanece considerablemente baja (no se vuelve a recuperar los 0.128 mgS<sup>-2</sup>/gSSV que se produjeron antes de la adición de TCE). Habiendo entre ambos una gran diferencia de la actividad cuando está presente el sustrato en el medio. De acuerdo a la figura 1 la tendencia en los tratamientos de la actividad sulfato reductora al momento de la adición de TCE la actividad decrece, pero se puede observar que la actividad se va recuperando y llega a ser muy

superior, para los controles la actividad se recupera pero nunca a sus niveles iniciales. Hay evidencia de haber *cis* y *trans* 1,2-dicloroetilenos en los experimentos (resultados no mostrados).

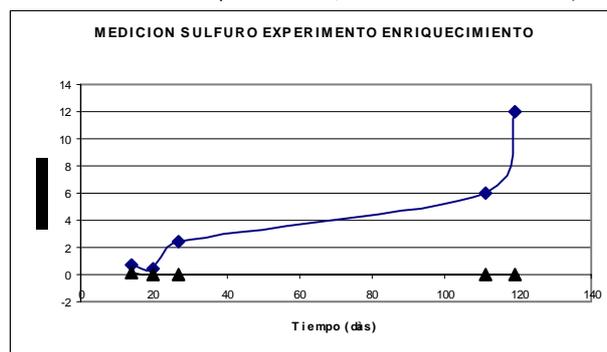


Figura 1. Producción de sulfuro en presencia de 50 µM de TCE. Tratamientos con disolvente y AGV's (rombos), controles con disolvente y sin AGV's (triángulos).

Cuadro 1. Actividad sulfato reductora de sedimentos expuestos a 50 µM TCE.

Tiempo (días)	Tratamientos	Controles
	mgS <sup>-2</sup> /gSSV	mgS <sup>-2</sup> /gSSV
14	0.703 ± 0.92	0.129 ± 0.22
* (Adición de TCE 50 µM) 20	0.38 ± 0.031	-0.024 ± 0.004
27	2.47 ± 0.0479	0.0404 ± 0.055
111	5.96 ± 0	-0.004 ± 0
119	12.07 ± 0	0.037 ± 0

**Conclusiones y perspectivas.** Al haber incremento de la actividad sulfato reductora en presencia de TCE es muy posible que se esté realizando la degradación del compuesto clorado, ya que resultados obtenidos en experimentos de degradación muestran una reducción considerable de TCE (aprox. 70%) bajo condiciones sulfato reductoras (datos no mostrados) en cortos periodos de tiempo. Se espera encontrar las enzimas responsables de la dehalogenación. En caso de detectarse se podrá confirmar que el proceso se debe a respiración (dehalorespiración).

**Agradecimientos.** Financiamiento por Dr. Durán Páramo, M.C. Paola Zárate, lab. Biotecnología Molecular (UPIBI-IPN)

### Referencias.

- Holliger Christof, *et.al.* (1998) Arch Microbial 169:313-321
- Canet Carles *et.al.* (2005) Silica-carbonate stromatolites related to coastal hydrothermal venting in Bahya Concepción, Baja California Sur, México. Sedimentary Geology 174 : 97- 113