

m



Instituto Politécnico Nacional

Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología

Proyecto de Investigación

**CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS TERMÓFILOS Y
EVALUACIÓN DE SU CAPACIDAD PARA DEGRADAR
COMPUESTOS POLICLORADOS**

Que para obtener el Título de Ingeniero Biotecnólogo

Presenta

GRAJEDA SANDOVAL VERÓNICA. SELENE

DIRECTOR EXTERNO: Dra. Claudia Guerrero Barajas

DIRECTOR INTERNO: Dr. Enrique Durán Páramo

México, D.F. mayo 2007

Agradecimientos

Dedico este trabajo a todas aquellas personas que han colaborado en su realización.

A la Dra. Claudia Guerrero Barajas por haberme aceptado en su proyecto durante los últimos 3 semestres de mi licenciatura.

Debo agradecer sin duda al Dr. Enrique Duran Páramo por el apoyo tanto financiero como emocional aportado a la realización del proyecto, al IBT César Jiménez por el apoyo técnico brindado durante el desarrollo del proyecto, a la M. en C. Paola Zarate por dedicar gran parte de su tiempo en la difícil tarea que resulto ser la Biología Molecular.

A la maestra Elvira Ríos por facilitarnos el cromatógrafo de gases y poder llevar a cabo las lecturas de metano.

A Isaac, Clemente, Cuauhtémoc y a la Dra. Rosa María del Ángel por brindarme su apoyo en el momento que el panorama del ADN no se mostraba alentador.

A la M. en C. Gloria López por que a pesar de tener tantas ocupaciones, siempre que lo necesite me brindo su apoyo, tanto académico como emocional.

Al M. en C. Leobardo Ordaz Contreras por que además de ser mi profesor fue un buen amigo.

A Ely, por haberme ofrecido su amistad y por haberme acompañado a lo largo del difícil camino de ser estudiante, por haber soportado las crisis, por escucharme, por comprenderme, también por hacerme reír, por ser mi único equipo durante 2 ½ años.

A Ruthcita y Giulianita que en todo momento me brindaron su apoyo y amistad, fundamentales para llegar a este momento tan importante en mi vida 1000 gracias amiguis.

A la gran familia que es UPIBI, de la cual me siento orgullosa y agradecida de pertenecer.

A mi padre y hermanos Rodrigo y Javier.

Muy en especial a mi cómplice, compañera de desvelos, paño de lágrimas, mi porrista número uno, mi mejor amiga, mi ejemplo a seguir, a quien le debo lo que soy y lo que seré, a quien me dio la vida y quien daría la vida por mi, que en todo momento me brindó su paciencia y comprensión, su apoyo incondicional. Gracias mamá!

ÍNDICE

	Página
1. Introducción	1
1.1 Compuestos clorados	2
1.2 El tricloroetileno (TCE)	2
2. Antecedentes	2
2.1 Biodegradación anaeróbica de TCE	3
3. Justificación	5
4. Objetivos	6
4.1 Objetivos generales	7
4.2 Objetivos específicos	7
5. Métodos	8
5.1 Condiciones experimentales	8
5.1.1 Actividad metanogénica (Experimento I)	8
5.1.2 Actividad metanogénica (Experimento II)	8
5.1.3 Actividad metanogénica (Experimento III)	8
5.1.4 Actividad sulfato reductora	8
5.1.5 Enriquecimiento con TCE (Toxicidad)	9
5.2 Identificación de microorganismos mediante detección de dehalogenasas.	9
5.2.1 Extracción de ADN total	9
5.2.2 Electroforesis de ADN en gel de agarosa	10
5.2.3 Elección de oligonucleótidos para buscar la enzima dehalogenasa	12
6. Resultados	12
6.1 Caracterización de los sedimentos	15
6.2 Actividad sulfato reductora	16
6.3 Enriquecimiento con TCE (Toxicidad)	17
6.4 Patrones electroforéticos	
6.5 Experimentos de Biodegradación de TCE	18
7. Discusión	20
7.1 Caracterización de los sedimentos	20
7.1.2 Actividad metanogénica	20
7.1.3 Actividad sulfato reductora	20
7.1.4 Enriquecimiento con TCE (Toxicidad)	20
7.1.5 Extracción de ADN total	21
7.1.6 Experimento de biodegradación de TCE	21
8. Conclusiones parciales	22
9. Anexo	23
9.1 Materiales	23
9.2 Curvas Patrón	24
9.2.1 Curva patrón de mediadores redox	24
9.2.2 Curva patrón de metano	25
9.2.3 Curva patrón de sulfuro	27
9.2.4 Curva patrón de TCE, <i>cis</i> 1,2, DCE, <i>trans</i> 1,2 DCE	29
9.3 Caracterización de los sedimentos	30
9.3.1 Determinación de pH	30
9.3.2 Porcentaje de humedad	30
9.3.3 Porcentaje de materia orgánica	31
9.4 Preparación de medios	31
9.4.1 Medio basal	31
9.4.2 Solución de metales traza	
9.4.2 Medio A (medio para actividad sulfato-reductora)	31
10. Referencias	33

Índice de tablas

Tabla 1. Determinación de pH de cada sedimento	12
Tabla 2. Determinación de materia orgánica y humedad (S1)	12
Tabla 3. Determinación de materia orgánica y humedad (S2)	13
Tabla 4. Sólidos volátiles suspendidos por sedimento	13
Tabla 5. Experimento 1 de actividad metanogénica	14
Tabla 6. Experimento 2 de actividad metanogénica	14
Tabla 7. Experimento 3 de actividad metanogénica	14
Tabla 8. Experimento 1 actividad sulfato reductora	15
Tabla 9. Experimento de actividad sulfato reductora	15
Tabla 10. Actividad específica sulfato reductora en el cultivo enriquecido a concentraciones constantes de tricloroetileno.	16
Tabla 11. Actividad sulfato reductora en el cultivo enriquecido con TCE	16
Tabla 12. Actividad sulfato reductora del experimento de biodegradación.	19
Tabla 13. Datos de actividad de degradación en presencia de 15 g de sedimento en adición de 300 μ M TCE	19
Tabla 14. Datos de actividad de degradación y actividad sulfato-reductora sin presencia de mediadores REDOX	19
Tabla 15. Curva patrón de hidroxocobalamina	24
Tabla 16. Curva patrón de riboflavina	25
Tabla 17. Áreas ocupadas por el Metano en la Curva Tipo ($\text{CH}_4 - \text{N}_2$)	
Tabla 18. Áreas ocupadas por el Metano en la Curva Tipo ($\text{CH}_4 - \text{aire}$)	26
Tabla 19. Datos de la curva patrón de sulfuro	27
Tabla 20. Datos de la curva patrón de TCE	28
Tabla 21. Condiciones del experimento de disolventes al que se le realizó la extracción de ADN	29
	32

Índice de figuras

Figura A1. Mecanismo de degradación que sugiere respiración	4
Figura A2. Ruta de biodegradación del tricloroetileno	4
Figura A3. Procedimiento experimental	7
Figura A4. Parámetros experimentales de PCR	11
Figura A5. Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% de S2.	12
Figura A6. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de S2.	12
Figura A7. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de S1.	13
Figura A8. Curva patrón Hidroxocobalamina	19
Figura A9. Curva patrón de Riboflavina	20
Figura A10. Curva patrón de metano ($\text{N}_2 - \text{CH}_4$)	21
Figura A11. Curva patrón de metano	22
Figura A12. Curva patrón de sulfuro	24
Figura A13. Curva patrón de Tricloroetileno (TCE)	25

1. INTRODUCCIÓN:

Para muchos microorganismos el hábitat en el que se desenvuelven, viven y multiplican es totalmente extremo. Los microorganismos termófilos tienen temperaturas de crecimiento que oscilan entre los 50-70°C y los hipertermófilos, que resisten temperaturas de hasta 113 ° C (Lozano Teruel,, 1997).

Su supervivencia es posible debido a que sus células tienen componentes y propiedades particulares que les permiten mantenerse estables en el entorno en el que viven, como por ejemplo las enzimas que poseen no se desnaturalizan a altas temperaturas y protegen el ADN para evitar su degradación.

Muchas de estas bacterias se encuentran en su estado natural en ventilas hidrotermales en algunas de las costas de nuestro país.

Las ventilas muestran evidencia de actividad de bacterias sulfato reductoras (BSR) en la formación de pirita (FeS) dados los ratios de sulfuro isotópico obtenidos de mediciones llevadas a cabo en el lugar (P. Alfonso *et. al.*, 2003).

Las bacterias sulfato reductoras (BSR) son anaerobias estrictas que tienen la facultad de reducir sulfato, sulfito o tiosulfato de manera no asimilatoria y los utilizan como aceptores de electrones. Este tipo de bacterias requieren de un ambiente reducido para su crecimiento

Las velocidades de reducción de sulfato por BSR se incrementan con la temperatura y la disponibilidad de carbón orgánico (Ohmoto & Goldhaber *et. al.*, 1997)

Algunos investigadores han estudiado microorganismos capaces de efectuar la degradación de los compuestos policlorados son:

- Metanógenos (Ye *et. al.*, 1995)
- Bacterias sulfato reductoras (BSR) (Zwiernik *et. al.*, 1998)
- Microcosmos de sedimentos enriquecidos en microorganismos de cloradores anaeróbicos con hidrógeno como donador de electrones. – dehalorespiración *Dehalococcoides ethenogenes* (Rysavy *et. al.*, 2005)

En este trabajo se pretende enriquecer sedimentos recolectados de áreas cercanas a las ventilas hidrotermales en microorganismos sulfato reductores y evaluarlos en su capacidad de degradación de tricloroetileno (TCE) como un modelo de compuesto policlorado recalcitrante. Se asume que el proceso de degradación se llevará a cabo en principio por cometabolismo, también llamado sintrofia, en la cual los microorganismos no utilizan el compuesto tóxico como fuente de carbono ni como fuente de energía, obteniendo ambas a partir de otras sustancias. En el caso del sintrofismo, la degradación no reporta un beneficio aparente para el microorganismo y es el producto de reacciones catalizadas por enzimas que tienen otros usos en el organismo. Por ejemplo; la degradación aerobia del TCE por metanótrofos y por *Nitrosomonas europaea*, es la oxidación de este tóxico por las monooxigenasas que los organismos usan para metabolizar sus sustratos naturales, metano y amoníaco respectivamente.

1.1 Compuestos clorados

Los organoclorados son tóxicos, su persistencia en el ambiente sin ser destruidos llega a ser de años y se bioacumulan, es decir, van aumentando su concentración al ir ascendiendo en la cadena trófica.

Los cloruros orgánicos se absorben en varios grados en el intestino, pulmón y piel. Después de la exposición a algunos cloruros orgánicos (en particular el DDT), una parte importante de la dosis absorbida se almacena en el tejido graso, como el compuesto principal inalterado. La mayoría de los organoclorados son, en cierto grado, declarados, oxidados y, después conjugados.

Los compuestos orgánicos, que pueden ser utilizados por organismos para obtener energía para su crecimiento, son los más susceptibles de ser biodegradados en el medio ambiente.

1.2 El tricloroetileno (TCE)

Es un disolvente altamente clorado y está incluido en la Lista de Sustancias Peligrosas, líquido incoloro, por sus propiedades fisicoquímicas es una molécula estable, hidrocarburo halogenado que forma parte de la composición de distintos productos de uso doméstico, se usa principalmente como solvente para remover grasa de partes metálicas, aunque también es un ingrediente en adhesivos, líquidos para remover pintura, en las tintorerías, preservación de madera, industria electrónica, industria eléctrica, talleres de impresión, En México se reportan concentraciones de compuestos orgánicos (disolventes) altamente clorados 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 5µg/L (PROYECTO NOM-014-CNA-2003).

El tricloroetileno es poco soluble en agua (0.11 g/100 ml @ 25 °C), puede permanecer en agua subterránea por largo tiempo.

Se evapora rápidamente de aguas superficiales, de manera que se encuentra comúnmente como vapor en el aire.

2. ANTECEDENTES

La reducción de compuestos clorados por cometabolismo involucra metanógenos y sulfato reductores por lo que se considera que regiones cercanas a ventilas hidrotermales son una fuente rica en estos microorganismos potencialmente capaces de degradar los compuestos mencionados. Los reportes incluyen biodegradaciones catalizadas por riboflavina y cobalaminas indicando que estos compuestos son buenos mediadores redox. (Guerrero-Barajas *et. al.* 2005)

Se han observado depósitos de Cinnabar en ventilas hidrotermales a 10 m de profundidad en el área de Punta Mita, Nayarit. Los respiraderos están en rocas basálticas y descargan una mezcla del líquido y del gas a una temperatura de 85° C. La descarga del agua por los respiraderos es más diluida que el agua de mar y los contenidos del metal están debajo de los límites de detección se han observado depósitos de carbonatos (calcita y aragonita), sulfuros (pirita, cinnabar, sulfuro de talio, y galeno), sulfatos (barita) y fosfatos (carbonato de hidroxilapatita). Se encuentra cinnabar en asociación con sulfuro de talio dentro de las cortezas de la pirita que alinean los canales del flujo y cubren el área de salida cerca de las ventilas.

La actividad hidrotermal en Punta Mita se relaciona con la circulación profunda del agua subterránea de la calefacción terrestre y convectiva en el alto gradiente geotérmico del área. La interacción de agua caliente con el material orgánico en las capas de rocas sedimentarias produce el nitrógeno, el metano, el mercurio y otros elementos lixiviados de las rocas volcánicas y sedimentarias. el mercurio permanece en la solución en el líquido termal hasta que alcanza el fondo del mar.

La actividad hidrotérmica submarina baja se ha observado en la bahía de Concepción, situada en la costa del golfo de la península de Baja California, a lo largo de las averías relacionadas probablemente con la extensión tectónica del golfo de la región de California. La expresión difusa y enfocada del agua y del gas hidrotérmicos ocurre en las áreas subtidal e intertidal y a una profundidad de 15 m a lo largo de una avería terrestre-costa. Las temperaturas en el área de descarga varían a partir de 50° C en el fondo del mar hasta 87° C a una profundidad de 10 centímetros en los sedimentos.

Los análisis químicos revelaron que el agua termal está enriquecida en Ca, As, Hg, Mn, Ba, HCO₃, Li, Sr, B, I, Cs, Fe y Si y tiene concentraciones más bajas de Cl⁻, del Na, de SO₄⁻² y del Br que el agua de mar. Las características químicas de las muestras de agua indican la ocurrencia de mezclarse entre el agua de mar y el agua termal (R.M. Prol-Ledesma *et al.*, 2002.)

Derivado del análisis fisicoquímico de las aguas cercanas a las ventilas hidrotermales se confirma que son una fuente adecuada de microorganismos que pueden ser aptos para degradar contaminantes recalcitrantes y en este trabajo se investiga si existe la habilidad de dechloración.

Las principales reacciones de dechloración que se llevan a cabo bajo condiciones anaeróbicas son hidrogenólisis reductiva, reducción hidrolítica y dicloroeliminación (van Eekert, 2001; van Eekert, 1999, Fetzner, 1998, Dolfing, 2000, Holliger, 1994; Holliger, 1998, Picardal, 1992), éstas son realizadas mediante métodos abióticos, con intermediarios como el fosfógeno (en el caso de halometanos) (Bartnicki, 1994) y por métodos bióticos realizando bioconversiones por medio de consorcios bacterianos en cometabolismo (Freedman, 1996; Freedman, 2001). Estos microorganismos se han encontrado en los lodos de las plantas de tratamiento de aguas residuales (Nedalco BV, Bergen op Zoom, The Netherlands) y se han catalogado como consorcios metanogénicos (Guerrero – Barajas *et al.* 2004).

2.1 Biodegradación anaeróbica de TCE

Todos los cloroetenos, baja y altamente clorados (cloruro de vinilo VC, 1,1-Dicloroetenos DCE's, *cis* y *trans*, 1,2- DCE's, tricloroetenos TCE's y policloroetenos PCE's) pueden desempeñarse como aceptores de electrones en procesos de halorespiración. Ésta es un proceso enzimático que utiliza a las dehalogenasas para reducir los compuestos clorados mientras son utilizados como aceptores de electrones para la producción de energía para el crecimiento del microorganismo (Guerrero – Barajas, 2004).

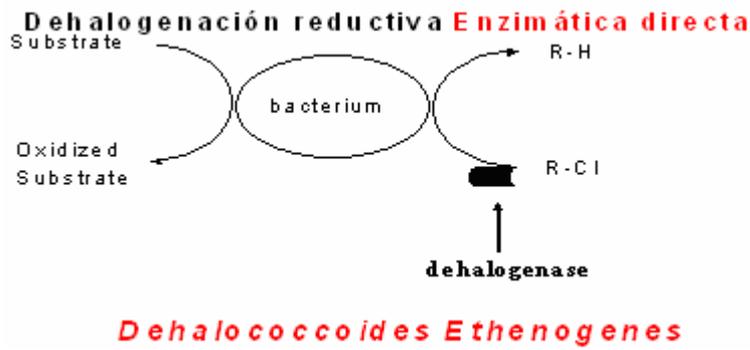


Figura A1. Mecanismo de degradación que sugiere respiración (Guerrero-Barajas, 2004)

Mediante el aislamiento de las dehalogenasas reductoras se descubrió que muchas de estas enzimas contenían un cofactor corrinoide de cobalto, hierro o componentes sulfuro. Éstas fueron aisladas de diferentes especies de *Dehalococcoides*, *Desulfomonas*, *Desulfobacterium*, *Desulfobacter* y *Dehalospirillum* intra y extracelularmente (Holliger, 1998).

En la Figura A2 pueden observarse diferentes rutas de degradación del TCE (tricloroetileno) y del PCA (tetracloroetano) por mecanismos bióticos y/o abióticos, marcando aquellas rutas que son predominantes.

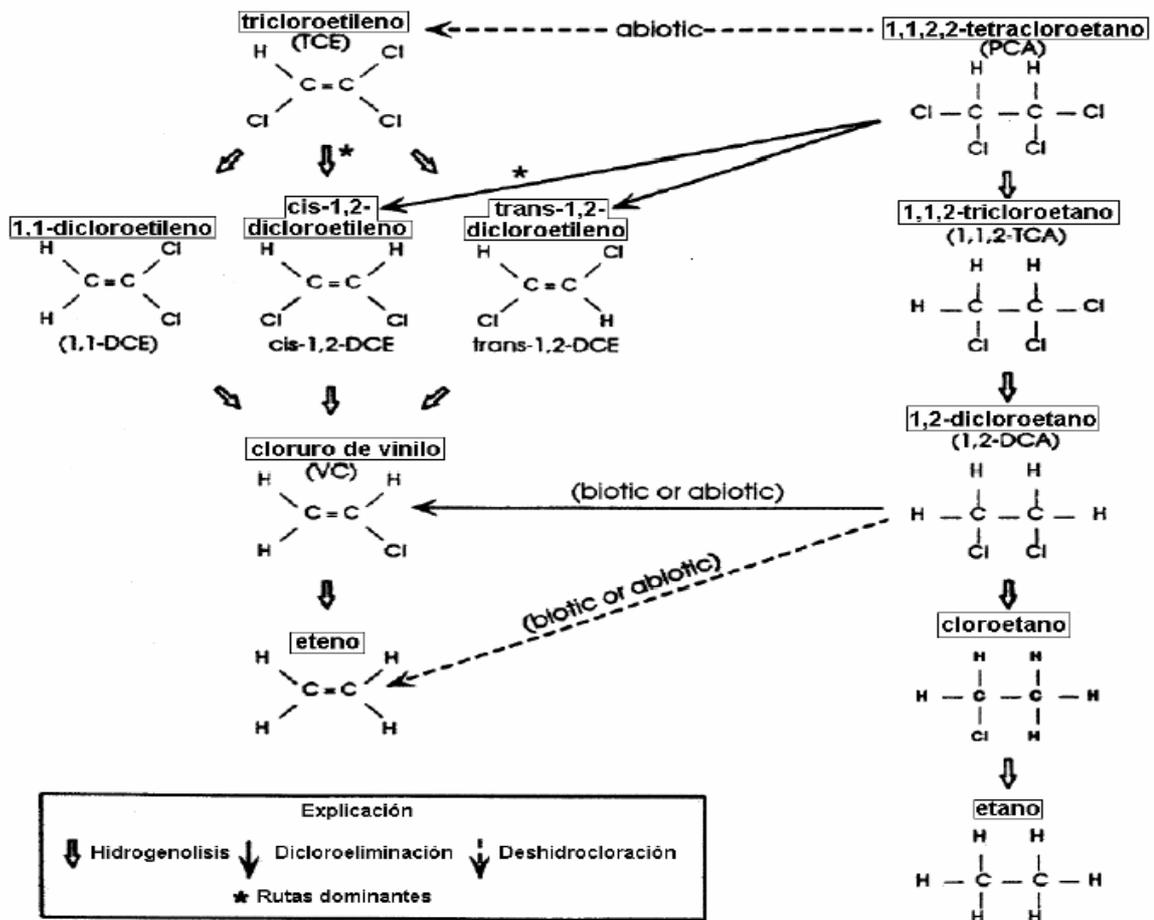


Figura A2. Ruta de biodegradación del tricloroetileno (Román, 2005)

3. JUSTIFICACIÓN

El acelerado desarrollo industrial ha provocado la presencia de agentes que por sus características o alta concentración son dañinos tanto para los organismos biológicos como para los ambientes en donde aquellos se desarrollan.

El océano es el destino final de la mayoría de los contaminantes producidos y vertidos por el ser humano y, por ello, resulta especialmente afectado por una amplia gama de compuestos. Los sedimentos de acuíferos y de mar son por lo tanto un lugar ideal para buscar microorganismos con capacidad de biodegradación de contaminantes.

Los compuestos organoclorados, y en particular el percloroetileno (PCE), tricloroetileno (TCE) y los bifenilos policlorados (BPC's), constituyen uno de los grupos de compuestos químicos sintéticos con mayor impacto en el medio marino.

La utilización de estos agentes nocivos provocan alteraciones en la estructura y función de los organismos expuestos, ya que son de difícil biodegradación, persistentes en el medio ambiente, pueden encontrarse en el aire, agua, suelo, sedimentos de lagos, ríos y arroyos; en el mar, peces, aves y otros animales.

Cuando entran la cadena alimenticia tienen la tendencia de absorberse en el tejido graso de peces y fauna. Cuando una persona consume pescado que ha acumulado el compuesto policlorado, el cual es traspasado por medio del alimento y se acumulan en sus cuerpos, con el tiempo, los niveles mas altos de algunos compuestos clorados son hallados en aquellas especies en la cima de la cadena alimenticia.

Los efectos a la salud que causan los compuestos policlorados dependen del grado de exposición a los mismos, estos efectos son: (PNUMA, 1999)

- Agentes carcinogénicos.
- En menor exposición a estos compuestos pueden causar irritación de piel y ojos.
- Provocan insuficiencia renal y trastornos en otros órganos humanos.
- Cianosis.
- Hemorragias digestivas.
- Obstrucción pulmonar.
- Depresión

Por otro lado se desea investigar a los microorganismos que se encuentran cerca de las ventilas hidrotermales en su capacidad de degradar compuestos recalcitrantes con el fin de conocer el potencial biotecnológico de los mismos máxime cuando se trata de un sitio que en principio no ha sido expuesto a una contaminación directa por este tipo de compuestos. De ser posible, se hará un intento por promover la biodegradación de los clorados mediante la adición de mediadores redox a los medios de cultivo.

La degradación microbiana de los contaminantes se hace por vía aerobia con bajos porcentajes de reducción, 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 haciéndolos 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 se encargan de realizar dicha

actividad (Holliger, 1999). Se presume que estas enzimas están presentes en algunas bacterias sulfato reductoras (Holliger, *et.al.*, 1999), 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 del tipo sulfato reductoras y microorganismos metanógenos, y debido a las condiciones del lugar son microorganismos que se encuentran en condiciones anaerobias y bajo condiciones de temperatura alrededor de 85°C. Estas condiciones en los sistemas microbianos son favorables para que se lleve a cabo la reducción, ya que las altas temperaturas y la ausencia de oxígenos permiten que se lleve a cabo con mayor eficiencia la dechloración de los contaminantes.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Identificar algunos de los microorganismos presentes en sedimentos marinos (ventilas hidrotermales) y evaluar su capacidad para degradar algunos compuestos policlorados (tricloroetileno).

4.2 Objetivos particulares

- Evaluar la capacidad de los microorganismos sulfato reductores (BSR) en la degradación de compuestos policlorados en presencia de ácidos grasos volátiles (AGV's) como fuente de carbono orgánico.
- Identificar el género y familia de algunos microorganismos sulfato reductores (BSR) que presenten la capacidad de biodegradación de compuestos clorados.

5. Métodos

Biología molecular identificación de microorganismos

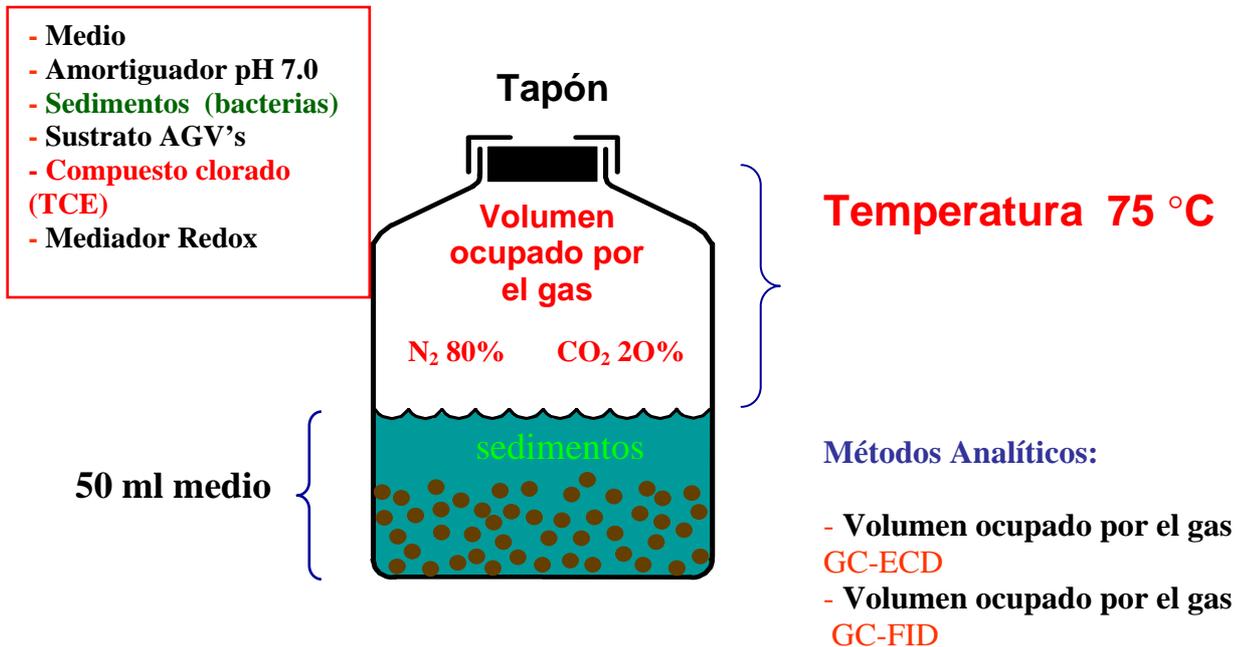


Figura A3. Procedimiento Experimental.

Los experimentos se llevan a cabo utilizando consorcios recolectados en sedimentos del Océano Pacífico (Punta Mita, Nayarit, México).

El primer paso es la determinación del porcentaje de humedad y de materia orgánica de los sedimentos.

Previo a los experimentos de biodegradación se efectúan experimentos de actividad metanogénica y sulfato reductora de los microorganismos.

Los medios de cultivo incluyen rezarsurina que es un indicador de potencial redox para mostrar que existe una atmósfera anaeróbica.

Antes de llevar a cabo los experimentos de biodegradación se llevarán a cabo experimentos de toxicidad de los disolventes sobre la comunidad de microorganismos.

Los experimentos de biodegradación se realizaron de acuerdo a Guerrero-Barajas *et al.* (2004).

5.1 Condiciones experimentales

5.1.1 Actividad metanogénica (Experimento I)

En botellas serológicas de 125mL, previamente pesadas y determinado su volumen, se añadieron 0.4g de sedimento húmedo 10mL de Medio Basal, 10mL de buffer de fosfato, AGV's (0.1g de butirato de sodio y 1.mL de solución acetato-propionato de sodio 1:1:1 equivalentes a 250 mgDQO/L) y se aforó con agua destilada para obtener 50mL, posteriormente se evacuó el oxígeno presente utilizando nitrógeno por 3 minutos, inmediatamente se sellaron y se evacuan por 2 minutos más, las botellas se incuban a 37°C, por cuadruplicado; de forma paralela se elaboró un control sin AGV's, también por cuadruplicado. Trascorrida una semana se realizaron lecturas de metano en el cromatógrafo de gases (Perkin Elmer Autosystem) En intervalos de una semana se añadieron AGV's en un volumen que garantizara 250 mgDQO/L y se realizaron lecturas de metano durante un mes.

5.1.2 Actividad metanogénica (Experimento II)

En 8 botellas serológicas de 125mL, previamente pesadas y determinado el volumen de cada una de estas, se añadieron 0.4g de sedimento húmedo, 10mL de Medio Basal, 10mL de buffer de fosfato y 1.25mL de AGV's (solución de acetato-butirato-propionato de sodio 1:1:1, equivalentes a 250 mg DQO/L) y se aforó con agua destilada para obtener 50mL, posteriormente se evacuó el oxígeno presente utilizando nitrógeno por 3 minutos, inmediatamente se sellaron y evacuan por 2 minutos más y se incubaron a 37°C, por cuadruplicado; paralelamente se elaboró un control sin AGV's, por cuadruplicado. Trascorrida una semana se realizaron lecturas de metano en el cromatógrafo de gases de ionización a la flama (Perkin Elmer Autosystem). En intervalos de una semana se añadieron en un volumen que garantizara 250 mg DQO/L (solución de acetato-butirato-propionato de sodio 1:1:1, equivalentes a 250 mg DQO/L) y se realizaron lecturas de metano durante un mes.

5.1.3 Actividad metanogénica (Experimento III)

Las muestras se prepararon de igual manera que el Experimento II, con la variante de la temperatura, ya que estas fueron incubadas a 70° C.

5.1.4 Actividad sulfato reductora

En 4 botellas serológicas de 125mL, previamente pesadas y determinado su volumen, se añadieron 5g de sedimento húmedo, 10mL de Medio Basal, 10mL de buffer de fosfato y 2g de CH₂COONa (equivalentes a 350 mg DQO/L) y se aforo con agua destilada para obtener 50mL, posteriormente se evacuó el oxígeno presente utilizando nitrógeno gaseoso por 3 minutos, inmediatamente se sellaron y nuevamente se evacuan por 2 minutos más, para ser incubadas a 37°C, por cuadruplicado.

5.1.5 Enriquecimiento con TCE (toxicidad)

En 8 botellas serológicas de 125mL, previamente pesadas y determinado su volumen, fueron agregados 10g de sedimentos húmedos (equivalentes a 6.2gSVS), 2mL de solución de AGV's (para obtener 350 mg DQO/L) y 48mL de Medio A, paralelamente se prepararon controles carentes de AGV's de la misma manera; éstas fueron incubadas a 37°C por cuadruplicado. Trascorrida una semana se añadieron 2mL de AGV's 1:1:1, equivalentes a 350 mg DQO/L, y 0.5mL de TCE (para obtener una concentración de 50µM).

5.2 Identificación de microorganismos mediante detección de dehalogenasas reductivas (RDH por sus siglas en inglés)

5.2.1 Extracción del ADN total

De los tratamientos perteneciente a los experimentos de enriquecimientos con disolventes para cada sedimento, se agita extraen 4 ml del y se colocan en un tubo eppendorf, se centrifuga por 1 min. Y se elimina el sobrenadante, se adicionan 300 μ l de buffer de lisis y se centrifuga a 13000 rpm por 1 min. Retiramos el sobrenadante, adicionamos 1mL de PBS 1x filtrado y estéril, centrifugamos con las condiciones anteriores, retiramos el sobrenadante, agregamos 300 μ l del buffer de lisis y fenol, se mezcla suavemente por inversión y se centrifuga a 13000 rpm durante 30 s, en un tubo eppendorf nuevo y estéril se toma el sobrenadante y se le adiciona la solución fenol-cloroformo, se agita por inversión y se centrifuga con las condiciones ya mencionadas, se retira la fase superior y se le adicionan 500 μ l de cloroformo, se centrifuga durante 5 min., se toma la fase superior y se coloca en un tubo nuevo y estériles adicionan 40 μ l de acetato de sodio, centrifugar por 5 min. Se adiciona 1 ml de etanol al 100% y se guarda a -20° C durante 2 h, se descarta el etanol y se adiciona etanol al 70%, se agita por inversión y se descarta, se deja secar perfectamente la pastilla y se resuspende en 25 μ l de TE. El ADN obtenido se conserva a una temperatura de -20° C.

5.2.2 Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Preparar el gel de agarosa al 0.8% mezclando:

- 25 ml de tampón TBE
- 0.20 g de agarosa

Fundir la agarosa en un horno de microondas, enfriarla un poco (hasta que no queme al tacto) y verterla en la cubeta de electroforesis.

Preparar las muestras:

Añadir 1 μ l de amortiguador y mezclar perfectamente con 2 μ L de cada muestra

Cubrir el gel en la cubeta con tampón TBE y retirar el peine, aplicar las muestras con mucho cuidado, cerrar el aparato de electroforesis y conectar la corriente a 90 mA.

ATENCIÓN: EN LOS PASOS SIGUIENTES SE VA A USAR BROMURO DE ETIDIO, QUE ES UN COMPUESTO MUY CANCERIGENO. USAR GUANTES Y TRABAJAR CON EXTREMO CUIDADO.

Cuando el azul de bromofenol haya recorrido las $\frac{3}{4}$ partes del gel, apagar la corriente, sacar el gel y sumergirlo en una solución de bromuro de etidio durante 10 min.

Sacar el gel de la solución de bromuro de etidio y retirar el exceso de este con agua destilada.

5.2.3 Elección de oligonucleótidos para buscar la enzima dehalogenasa

Los microorganismos que predominan en los sedimentos extraídos de las ventilas hidrotermales y que son *Dehalococcoides* y *Desulfuroromona*, los cuales tienen la capacidad de acelerar y completar la dechloración de PCE y TCE a eteno, se han enriquecido los sedimentos para favorecer dicha dechloración y se emplearán dos oligonucleótidos:

TFOR

PM ($\mu\text{g}/\mu\text{mol}$) 9574.6

% GC 39

5' – 3' **GCIAAYAARGTIAAYAAYCAYCCNTGGTGGG**

TREV

PM ($\mu\text{g}/\mu\text{mol}$) 7928.6

%GC 42

5' – 3' **CCYTCCCAyttiggrtArtTngTngT.**

Para llevar a cabo la reacción de PCR y la secuenciación de los genes de RDH; para por último realizar el análisis de la secuencia, para lo cual se cuenta con acceso a la secuencia del genoma de sulfato reductoras con capacidad de dehalorespiración para secuencias de dehalogenasas.

Para la reacción en cadena de la polimerasa se utiliza:

La mezcla (mix Roche Applied Science) de PCR que contiene 100 ng de ADN, 2.5 μL Buffer de PCR 10x, 0.8 μL MgCl_2 (2mM), 0.5 μL de dNTP, 0.5 μM de cada primer, 0.2 μL de *Taq Polimerasa* en 25 μL de reacción completa.

Los parámetros empleados para las pruebas de estandarización de la técnica de PCR son: 28 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s a 60° C y 30 s a 72° C.

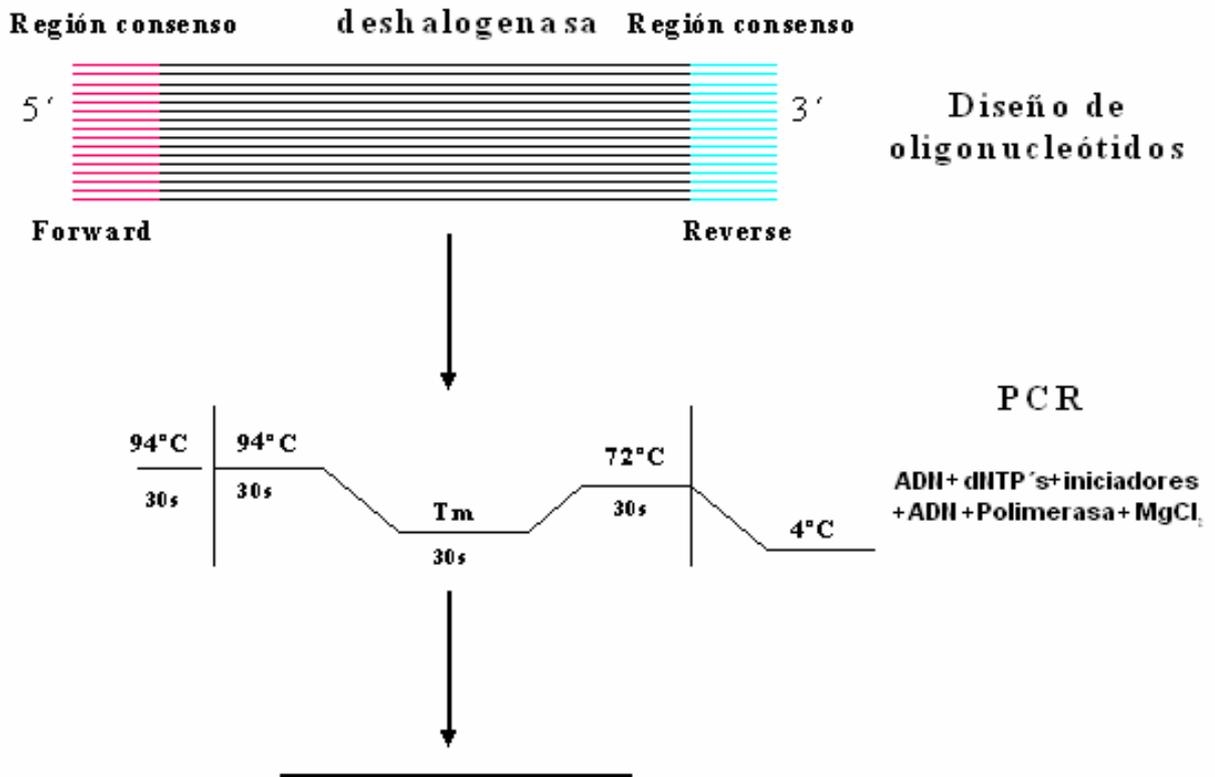


Figura A4. Parámetros experimentales de PCR

Una vez que se hayan depurado las condiciones de PCR se realizará el análisis de las secuencias, para ello se tiene acceso a la secuencia del genoma de sulfato reductoras con capacidad de dehalorespiración para secuencias de dehalogenasas.

6. Resultados

6.1 Caracterización de los sedimentos

Se determinó el pH, porcentaje de humedad y materia orgánica de las muestras a las cuales se les asignaron los siguientes nombres: S1 (Sedimento 1) y S2 (Sedimento 2). En las Tablas 1 y 2 se muestran los resultados obtenidos para cada uno.

Tabla 1. Determinación del pH de cada sedimento.

Muestra	pH
S1	3.77
S2	3.04

Tabla 2. Determinación de materia orgánica y humedad S1.

Muestra	Peso de la Cápsula (g)	Peso de Muestra Húmeda (g)	Peso de la Cápsula con muestra húmeda (g)	Peso de la Cápsula con Muestra Seca (g)	Peso de la Cápsula con Muestra Incinerada (g)	% Hum.	% Mat. Org.
I	41.36						
II	40.14	2.00	43.37	42.66	42.60	34.96	61.38
III	39.06	2.00	42.14	41.44	41.37	34.60	61.74
		2.00	41.05	40.38	40.31	34.28	62.26
					Promedio	34.61±0.3	61.8±0.44

*Tiempo y temperaturas aproximados $T_{\text{secado}}=127^{\circ}\text{C}$ por 12h, $T_{\text{incineración}}=540^{\circ}\text{C}$ por 24h, pH = 8.91.

Tabla 3. Determinación de materia orgánica y humedad S2.

Muestra*	Peso de la Cápsula (g)	Peso de Muestra Húm. (g)	Peso de la Cápsula con muestra húmeda (g)	Peso de la Cápsula con Muestra Seca (g)	Peso de la Cápsula con Muestra Incinerada (g)	% Húm.	% Mat. Org.
I	41.41	2.00	44.13	42.13	42.07	24.35	64.14
II	41.53	2.00	44.27	42.26	42.21	24.92	63.08
III	42.21	2.01	44.96	42.95	42.90	25.01	63.02
					Promedio	24.76±0.6 3	63.41± 0.36

*Tiempo y temperaturas aproximados $T_{\text{secado}}=127^{\circ}\text{C}$ por 12h, $T_{\text{incineración}}=540^{\circ}\text{C}$ por 24h, pH = 7.61.

Tabla 4. Sólidos volátiles suspendidos (SSV) por sedimento.

Muestra	SSV/sedimento húmedo
Sedimento 1	0.62
Sedimento 2	0.34

Se observó que el porcentaje de materia orgánica fue mayor en la muestra S1, por tal motivo se selecciono para llevar a cabo los siguientes procedimientos experimentales.

Se montaron tres experimentos para la determinación de actividad metanogénica variando temperaturas y concentración de sustrato (secciones 5.1.1, 5.1.2 y 5.1.3), en las siguientes tablas y figura se muestran los resultados obtenidos. Paralelamente, se llevaron a cabo mediciones (dos para el Experimento 1) de actividad sulfato reductora.

***Tabla 5. Experimento 1 de actividad metanogénica .**

Muestra	Tiempo (días)	3	5.91	12.7	21.2
Sedimento 1	CH4 (%V/V)	-0.192	-0.1934	-0.1931	Trazas
	mgDQOCH4/g SSV	-0.041 ± 0.001	-0.041 ± 0	-0.0746 ± 0.001	----
Sedimento 2	CH4 (%V/V)	-0.192	-0.193	-0.192	-0.01
	mgDQOCH4/g SSV	-0.096 ± 0.001	-0.097 ± 0	-0.078 ± 0.012	-0.004 ± 0.001

*Condiciones de incubación: 37°C, 200 mgDQO/L(solución de AGV's 1:1:1), 0.4g sedimento húmedo (correspondientes a 0.62gSSV para el S1 y 0.34 gSSV para el S2). ** Experimentos realizados por cuadruplicado, solo se muestra el valor promedio. *** Los controles no contiene sustrato (AGV's).

***Tabla 6. Experimento 2 de actividad metanogénica**

Muestra	Tiempo (días)	3	*3	25	*25
Sedimento 1	CH4 (%V/V)	-0.19	-0.191	-0.1903	-0.1908
	mgDQOCH4/g SSV	-0.039 ± 0.0006	-0.04±0.0002	-0.04 ± 0.0006	-0.04±0.0002
Sedimento 2	CH4 (%V/V)	-0.194	-0.193	-0.191	-0.1908
	mgDQOCH4/g SSV	-0.073 ± 0.005	-0.072 ± 0.004	-0.07 ± 0.005	-0.07±0.0002

*Condiciones de incubación: 75° C, 250 mgDQO/L (solución de AGV's 1:1:1), 0.4g sedimento húmedo (correspondientes a 0.62 gSSV para el S1 y 0.34 gSSV para el S2). ** Experimentos realizados por cuadruplicado, solo se muestra el valor promedio. *** Los controles no contiene sustrato (AGV's).

***Tabla 7. Experimento 3 de actividad metanogénica**

	Tiempo (días)	9	*9
Sedimento 1	CH4 (%V/V)	-0.1919	-0.1936
	mgDQOCH4/g SVS	-0.0989 ± 0.002	-0.0395 ± 0.0002
Sedimento 2	CH4 (%V/V)	-0.14245	-0.1428
	mgDQOCH4/g SVS	-0.07123 ± 0.0033	-0.0714 ± 0.0023

*Condiciones de incubación: 37°C, 250mgDQO/L(solución de AGV's 1:1:1), 0.4g sedimento húmedo (correspondientes a 0.62 gSSV para el S1 y 0.34 gSSV para el S2). ** Experimentos realizados por cuadruplicado, solo se muestra el valor promedio. *** Los controles no contiene sustrato (AGV's).

Tabla 8. Experimento 1 actividad sulfato reductora.

**Muestra	Tiempo de Incubación (días)	36⁺ ppm S⁻²/mgSSV	52 ppm S⁻²/mgSSV
Sedimento 1	Control	0.04±0.01	2.60 ±0.41
	Tratamiento	1.66±0.12	7.52±0.51
Sedimento 2	Control	0.11±0.05	3.10±0.42
	Tratamiento	0.63±0.10	3.23±0.43

*Condiciones de incubación: 37° C, 200 mgDQO/L (solución de AGV's 1:1:1), 0.4g sedimento húmedo (correspondientes a 0.62gSSV para el S1 y 0.34 gSSV para el S2). ** Experimentos realizados por cuadruplicado, solo se muestra el valor promedio. *** Los controles no contiene sustrato (AGV's). † A los 35 días de incubación se añadió 0.2mL de TCE 5000 µM para obtener una concentración de 20 µM y 0.3ml de solución de vitaminas.

6.2 Actividad sulfato reductora

La determinación de la actividad sulfato reductora se realizó por medio de la técnica de DMP (Trueper, 1964), dicho valor se obtuvo realizando una curva de calibración, graficando concentración de S⁻² en ppm contra absorbancia a 670nm ($y=1.2026x+.0149$, $R^2=0.9918$); paralelamente se determinó esta concentración empleando la fórmula citada en la **Figura A12 del Anexo**.

A continuación se muestran las concentraciones de sulfuro obtenidas para diferentes condiciones de incubación.

Tabla 9. Experimento de actividad sulfato reductora.

**Muestra	Tiempo de Incubación (días)	23 ppm S⁻²/gSSV	30 ppm S⁻²/gSSV
Sedimento 1	Tratamiento	1.59 ± 0.06	4.40 ± 0.16
Sedimento 2	Tratamiento	0.45 ± 0.19	0.60 ± .004

*Condiciones de incubación: 37° C, 4gSO₄⁻²/L, 350 mgDQO/L (acetato de sodio), 5g sedimento húmedo (correspondientes a 3.1 gSSV para el S1 y 1.7 gSSV para el S2). ** Experimentos realizados por cuadruplicado, solo se muestra el valor promedio.

Tabla 10. Actividad específica sulfato reductora en el cultivo enriquecido a concentraciones constantes de tricloroetileno.

Muestra	Tiempo de Incubación (días)	13 ⁺ ppm S ⁻² /gSSV	28 ⁺⁺ ppm S ⁻² /gSSV
Sedimento 1	***Control	0.13±0.01	0.07±0.01
	Tratamiento	0.56±0.09	3.24±0.10
Sedimento 2	Control	0.07±0.01	0.03±0.01
	Tratamiento	0.12±0.00	1.35±0.4

*Condiciones de incubación: 37° C, 4gSO₄⁻²/L, 350 mgDQO/L(acetato de sodio), 10g sedimento húmedo (correspondientes a 6.2gSSV para el S1 y 3.4 gSSV para el S2).** Experimentos realizados por cuadruplicado, solo se muestra el valor promedio. *** Los controles no contienen sustrato (AGV's). *A los 13 días de incubación se añadió 0.5mL de TCE 5000µM para obtener una concentración de 50µM y 0.3mL de solución de vitaminas. **A los 28 días de incubación se añadió 0.55mL de TCE 5000µM para obtener una concentración de 50µM.

6.3 Enriquecimiento con Tricloroetileno (Toxicidad)

Trascurridos 6 días de incubación se realizaron mediciones de metano, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 10.

Tabla 11. Actividad específica de metano en el cultivo enriquecido con tricloroetileno.

	Tiempo (días)	13	*13
Sedimento 1	CH4 (%V/V)	Trazas	Trazas
	mgDQOCH4/g SSV	----	----
	CH4 (%V/V)	-0.13811	-0.14465
Sedimento 2	mgDQOCH4/g SSV	-0.00383 ± 0.002	-0.00398 ± 0.0004

*Condiciones de incubación: 37° C, 4gSO₄⁻²/L, 350 mgDQO/L(acetato de sodio), 10g sedimento húmedo (correspondientes a 6.2 gSSV para el S1 y 3.4 gSSV para el S2). ** Experimentos realizados por cuadruplicado, solo se muestra el valor promedio. *** Los controles no contienen sustrato (AGV's). *A los 13 días de incubación se añadió 0.5mL de TCE 5000µM para obtener una concentración de 50µM y 0.3mL de solución de vitaminas. **A los 28 días de incubación se añadió 0.55mL de TCE 5000µM para obtener una concentración de 50µM. El enriquecimiento con TCE se llevó a cabo tras realizar una medición de la actividad sulfato reductora después de 13 días de incubación.

6.4 Patrones electroforéticos de la extracción de ADN

Tras someter las muestras del experimento de enriquecimiento con TCE al tratamiento mencionado en los apartados **5.2.1 y 5.2.3**, se obtuvieron los siguientes patrones electroforéticos:

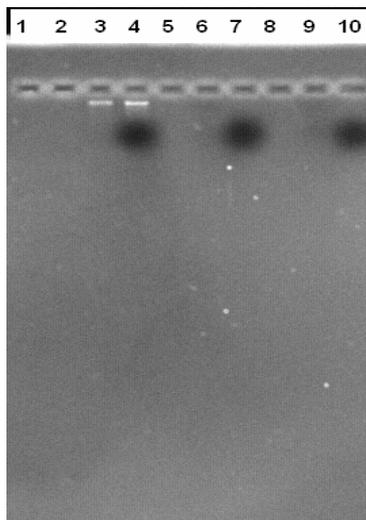


Figura A5. Electrofóresis en gel de agarosa al 0.7% (p/v) en TBE IX, teñido en TBE 1X con 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio. ADN de las bacterias de los sedimentos marinos: pozo 3 tratamiento 1 del S2, pozos 4 Control 1 del S2.



Figura A6. Electrofóresis en gel de agarosa al 0.8% (p/v) en TBE IX, teñido en TBE 1X con 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio. ADN de las bacterias de los sedimentos marinos: pozo 3 tratamiento 1 del S2.

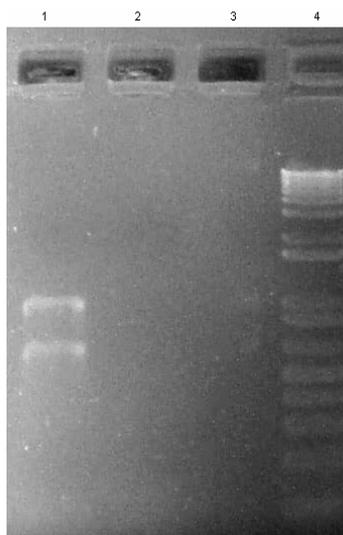


Figura A7. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (p/v) en TBE IX, teñido en TBE 1X con 3 μ l de bromuro de etidio. ADN de las bacterias de los sedimentos marinos: pozo 1 tratamiento 2 del S1, pozos 4 Marcador de peso molecular.

6.5 Experimentos de Biodegradación de TCE

Paralelamente a los experimentos de enriquecimientos con TCE se prepararon experimentos de biodegradación de TCE bajo las siguientes condiciones:

- 1) Controles químicos
- 2) Tratamientos biológicos con AGV's como sustrato y sin mediadores redox con el fin de monitorear la producción de sulfuro de los consorcios y la actividad de degradación de los mismos sobre el TCE
- 3) Tratamientos biológicos con AGV's como sustrato y con cianocobalamina y riboflavina como mediadores redox.

En este trabajo se pretendía analizar la capacidad de biodegradación de los consorcios microbianos de los sedimentos incluidos en los tratamientos a los cuales no se les agregó ningún mediador redox. A continuación se presenta la actividad sulfato reductora de este experimento de biodegradación una vez que se añadió una concentración de 300 μ M de TCE.

Al mismo tiempo que se analizó en experimento con sedimento fresco se preparó otro experimento con sedimento autoclavado para asegurar que los resultados obtenidos de la degradación no se debían a reacciones químicas.

Tabla 12. Actividad sulfato reductora del experimento de biodegradación.

Tiempo (días)	Control Químico	Control Biótico	Sin Redox	Vitamina B ₁₂	Riboflavina
	mgS ⁻² /gSSV	mgS ⁻² /gSSV	mgS ⁻² /gSSV	mgS ⁻² /gSSV	mgS ⁻² /gSSV
21	0±0	1.27±0.07	1.47±0.08	1.96±0.09	1.55±0.08
32	0.190.05±	2.14±0.09	1.93±0.09	3.61±0.12	3.3±0.12
38	0.03±0.005	2.17±0.09	2.27±0.09	2.95±0.11	2.14±0.09
49	0.04±0.01	1.65±0.08	2.91±0.1	2.82±0.1	2.18±0.09
66	0.05±0.03	2.05±0.09	2.64±0.1	1.82±0.09	2.15±0.09
77	1.1±0.06	0.9±0.07	2.04±0.09	1.71±0.08	1.61±0.08

Tabla 13. Datos de actividad de degradación en presencia de 15 g de sedimento en adición de 300 µM TCE

Tiempo (días)	Concentración TCE (µM)			
	Control químico	Sin Redox	Cianocobalamina	Riboflavina
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

Tabla 14. Datos de actividad de degradación y actividad sulfato-reductora sin presencia de mediadores REDOX

Tiempo (días)	Sin Redox mgS ⁻² /gSSV	Tiempo (días)	Sin Redox
21	1.47±0.08	32	300
32	1.93±0.09	47	53.6±5.3
38	2.27±0.09	69	45.56±5.91
49	2.91±0.1	78	20±0.87
66	2.64±0.1	93	17±1.08
77	2.04±0.09	108	8±0.66

7 Discusión

7.1 Caracterización de los sedimentos

La caracterización las muestras permitió establecer que “S1 y S2” son ideales para los experimentos de biodegradación por su alto contenido de materia orgánica, misma que se interpreta como el contenido de microorganismos totales contenidos en los sedimentos.

7.1.2 Actividad metanogénica

El Experimento 1 (200 mgDQO/L) se llevó a cabo a 37° C para aclimatar a las microorganismos presentes en los sedimento ya que las muestras se encontraban inicialmente congeladas, los sedimentos utilizados fueron extraídos de ventilas hidrotermales, por lo que es posible afirmar que son termófilos. Tras monitorear por 21.2 días (Tabla 5) se observó que existen trazas de metano en el espacio de cabeza de las botellas para los dos sedimentos, ya que los cromatogramas muestran picos de este gas (tiempo de retención de metano 2.90 min.), sin embargo al interpolar estos datos en la curva patrón se obtienen valores negativos de mgDQOCH₄/gSSV, ya que el valor de la ordenada al origen es superior (Figura A11).

El Experimento 3 (Tabla 7) se llevó a cabo a la misma temperatura que el Experimento 1, con la variante de la concentración de sustrato (250 mgDQO/L). Trascurridos 23 días de monitoreo, se presentó el mismo fenómeno que en el Experimento 1.

Finalmente, en el Experimento 2 (Tabla 6) se varió la concentración de sustrato (250 mgDQO/L) y la temperatura de incubación (75° C), sin embargo al cabo de 25 días de monitoreo se observó el mismo comportamiento que en los Experimentos 1 y 2.

La mediciones de actividad sulfato reductora (Tablas 8, 9 y 10) muestra concentraciones considerables de sulfuro (sulfato reducido) en controles como en tratamientos, lo cual indica la presencia de sulfato inherente a los sedimentos.

7.1.3 Actividad sulfato reductora

El monitoreo de sulfuro (Tabla 9) muestra una elevada actividad sulfato reductora, ya que tras haber transcurrido 30 días de incubación obtenemos concentraciones de 4.40±0.16 y 0.6±0.04 mgS⁻²/gSSV para los Sedimentos 1 y 2, respectivamente, suministrando 4gSO₄⁻²/L en el medio a 37° C.

A partir de las condiciones de incubación es posible observar que la temperatura no es un factor determinante en la reducción de sulfato por parte de la flora microbiana presente, lo que resulto ser un factor reductor en el sedimento 1 de dicha actividad es la adición del compuesto clorado, lo que nos indica que a diferencia del sedimento 2 aún no se acondicionan los microorganismos presentes.

7.1.4 Enriquecimiento con Tricloroetileno (Toxicidad)

Al cabo de 6 días de incubación se realizó una medición de la actividad metanogénica, de igual manera que en los Experimentos 1, 2 y 3, el metano producido es insignificante, aún considerando que el inóculo y la concentración de sustrato son mayores.

En contraparte, la actividad sulfato reductora se vio favorecida al incrementar el inóculo y la concentración de sustrato, a los 28 días se obtuvieron valores de 3.24 ± 0.10 y 1.35 ± 0.04 $\text{mgS}^{-2}/\text{gSSV}$ (cinco a ocho veces más que las registradas a los 13 días de incubación), respectivamente en los tratamientos. Una vez adicionado el TCE ($50\mu\text{M}$) al medio y medido el sulfato reducido, nuevamente, se observó un incremento considerable en la concentración de sulfuro (Tabla 10) al cabo de 28 días, sin embargo se observa que la actividad sulfato reductora del S2 es menor que la del S1 una vez adicionado el TCE y en presencia de sustrato.

7.1.5 Extracción de ADN

No fue posible mostrar los patrones electroforéticos de todos los experimentos, puesto que se probaron varias técnicas a lo largo de 4 meses sin obtener resultados reproducibles, resultados mostrados en las figuras A5 y A6, lo cual nos sirvió de experiencia, ya que al final se logró diseñar una técnica a base de metodologías ya preestablecidas para la obtención de mejores resultados en la extracción., del patrón electroforético obtenido en la figura A7 fue posible determinar que su peso molecular es de 2000 bp.

Con los resultados obtenidos de las extracciones de forma paralela se trabaja para estandarizar las condiciones óptimas de la PCR.

7.1.6 Experimentos de biodegradación de TCE

Los resultados de los experimentos de biodegradación (experimentos que no formaron parte de este trabajo) demostraron que los sedimentos son capaces de degradar TCE en más de 90% cuando la concentración inicial del disolvente es de $300\mu\text{M}$. Los tratamientos que se prepararon con sedimento fresco y disolvente fueron los más efectivos en la degradación del TCE comparados con aquellos tratamientos que contenían cianocobalamina y riboflavina como mediadores redox. La actividad sulfato reductora en dicho experimento se mantuvo constante durante los más de 2 meses que duró la incubación y los tratamientos preparados sin mediadores redox mostraron una mayor producción de sulfuro.

En el experimento abiótico que se preparó para evaluar la actividad biológica sobre la degradación se detectó la transformación de TCE en menor extensión que los experimentos biológicos y nula actividad sulfato reductora.

En todos los experimentos de biodegradación se detectó la presencia de los intermediarios *cis* y *trans*-dicloroetilenos y cloruro de vinilo. Hasta el momento no ha sido posible analizar la presencia de eteno lo cual podría representar que uno de los mecanismos de la degradación fuera la halorespiración (o dehalorespiración).

8 Conclusiones

Los resultados presentados en este trabajo muestran que los sedimentos analizados poseen un elevado contenido de materia orgánica, mismo que se podría interpretar como la cantidad de microorganismos presentes.

La actividad metanogénica es despreciable en ambos sedimentos aún a temperaturas similares a las que se encuentran originalmente las muestras (75° C) y diferentes concentraciones de sustrato. Por otra parte, se demostró que los microorganismos presentes en los sedimentos son predominantemente sulfato reductores.

Aunque aún no se han realizado mediciones de la biodegradación del TCE en las botellas (Experimento de enriquecimiento), podemos afirmar que a concentraciones de 50µM los microorganismos presentes no sufren daño considerable, ya que la actividad sulfato reductora no se ha visto mermada suministrando ácidos grasos volátiles como sustrato, sin embargo al carecer de éstos dicha actividad se redujo 1.9 veces.

Los experimentos de biodegradación demuestran que la mayor transformación del TCE a *cis* y *trans* dicloroetilenos, cloruro de vinilo (y posiblemente a eteno) se presenta en los sedimentos preparados sin añadir ningún mediador redox en el medio de incubación lo que puede significar la presencia de dehalogenasas.

En cuanto a los principales impedimentos para la identificación de las dehalogenasas se encontró el difícil manejo de las muestras. Ya que son sedimentos y no bacterias puras se dificulta el proceso de extracción de ADN. La técnica de extracción de ADN se logró depurar en el transcurso de todo el trabajo experimental y se cuenta ya con una técnica que presenta mejores resultados. Cabe mencionar que una de las aplicaciones futuras de estos sedimentos es formar parte de un biorreactor de lecho fluidizado para la degradación de disolventes clorados (TCE), y de momento no es el principal interés aislar bacterias puras con actividad de dechloración de dichos sedimentos. Sin embargo, una vez se hayan replicado los experimentos de biodegradación del TCE probablemente se planea el aislamiento de algunos de los microorganismos aunque siempre se prefiera aprovechar su actividad en consorcios.

9 ANEXO

9.1 Materiales

Material de vidrio. Matraces volumétricos, erlenmeyer, botellas para cultivo de 120 ml, tapones de butilo para las botellas. Tapones.

Agujas y jeringas

Mangueras de latex

Guantes de nitrilo y látex

Pipetas volumétricas de 1, 5 y 10 ml

Pipetas volumétricas de 100 microlitros

Micropipeta de 0.5-10 μL

Micropipeta de 2-20 μL

Micropipeta de 20-200 μL

Micropipeta de 100-1000 μL

Puntas desechables

Papel indicador de pH

Tubos para centrifuga de 1 y 2 ml

Mesa de agitación con control de temperatura

Espectrofotómetro

Celdas de cuarzo

Cromatógrafo de Gases

Cromatógrafo de líquidos

Cromatógrafo de iones

Centrífuga refrigerada

Balanzas analíticas

Bomba de vacío

Campana de extracción

Termociclador

Cámara de electroforesis

Fuente de poder

Incubadora a 37 y 75° C

Agua nanopura.

Agua tridestilada

Gas nitrógeno

Mezcla de gas nitrógeno con dióxido de carbono 80:20

Estándares de metano

Estándares de disolventes clorados

Sales para medios de cultivo

Mediadores redox

Fenol

TRIS (hidroximetil aminometano)

EDTA (etilendiaminotetraacetico)

Cloroformo

SDS 0.2%

Se calibrarán los equipos para las pruebas correspondientes.

9.2 Curvas patrón

9.2.1 Curva patrón de mediadores redox

Se realizaron soluciones concentradas de hidroxocobalamina 3602.3 μM (Bedoyecta se compone de hidroxocobalamina (vitamina B12), tiamina (vitamina B1) y piridoxina (vitamina B6) y riboflavina 500 μM (Sigma-Aldrich) para posteriormente elaborar diluciones en buffer 0.1M (K_2HPO_4) correspondientes a las siguientes concentraciones: 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 μM .

A todas las muestras se les determinó absorbancia en un espectrofotómetro (Beckman DU650 Spectrophotometer) a 450nm para riboflavina y 560 para hidroxocobalamina (con una celda de cuarzo).

Tabla 15. Curva patrón de hidroxocobalamina 560 nm.

Vitamina B12 [μM]	Abs (560nm)
0	0
2	0.01
5	0.03
10	0.06
20	0.11
40	0.21
60	0.32
80	0.41
100	0.52

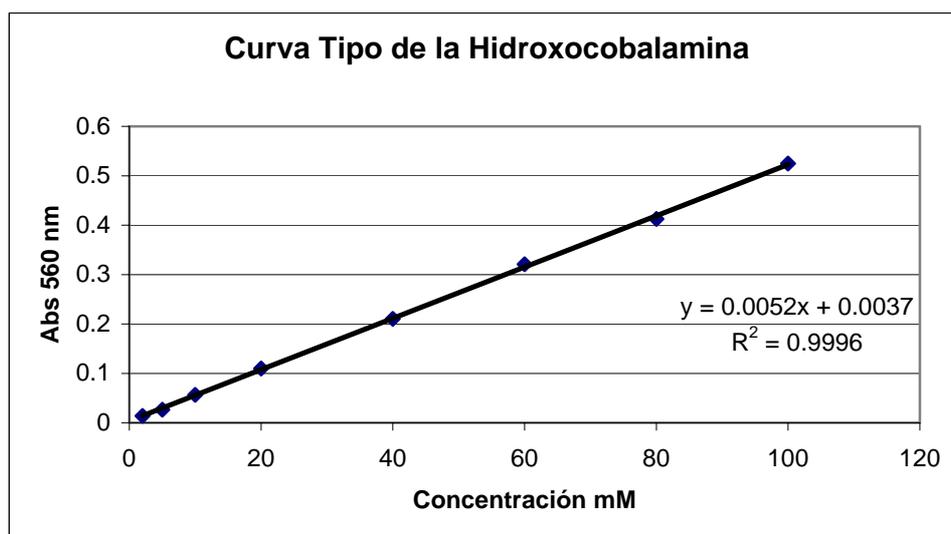


Figura A8. Curva patrón de hidroxocobalamina.

Tabla 16. Curva patrón de riboflavina 450 nm.

[Riboflavina μM]	Abs (450nm)
0	0
2	0.02
5	0.03
10	0.06
20	0.07
40	0.17
60	0.33
80	0.47
100	0.58

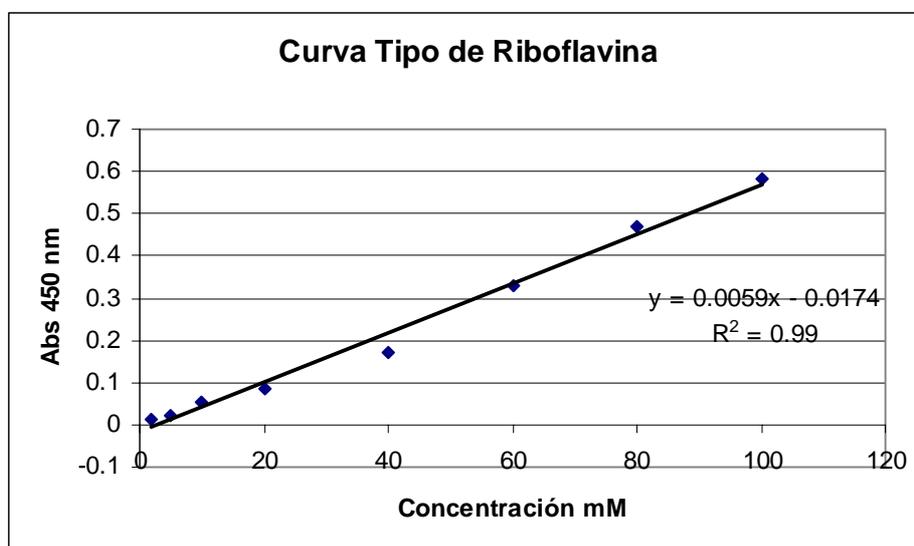


Figura A9. Curva patrón de riboflavina.

9.2.2 Curva patrón de metano

Seis botellas serológicas de 125ml fueron pesadas, se determinó el volumen de cada una de estas botellas, se secaron en una incubadora a 120° C realizando el proceso por triplicado. Luego de ser selladas se les evacuó el oxígeno con nitrógeno gaseoso por 10 min., una vez libres de aire se les retiró nitrógeno e inyectó metano al 99% (Supelco Scotty Analyzed Gases) para obtener concentraciones de 0.3, 0.5, 1, 1.5, 2 y 3% respectivamente; paralelamente se realizó la prueba sin evacuar el aire con nitrógeno. Las muestras fueron inyectadas al cromatógrafo de gases (Perkin Elmer Auto System); a partir de las áreas y tiempos de retención obtenidos se construyó la curva patrón.

Inicialmente se prepararon dos curvas de calibración, a la primera se le evacuó con nitrógeno gaseoso y otra sin evacuación.

Tabla 17. Áreas ocupadas por el Metano en la Curva Tipo ($N_2 - CH_4$)

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

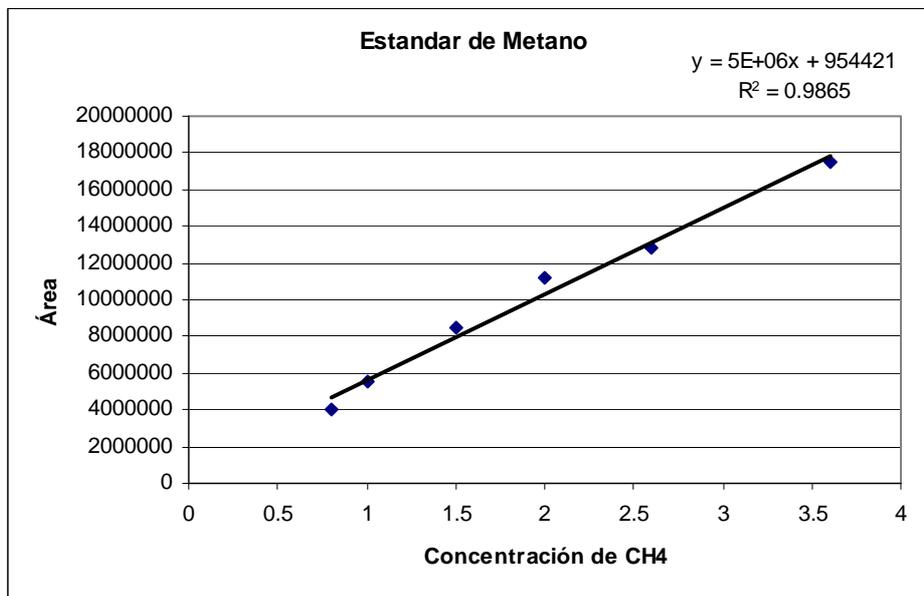


Figura A10. Curva Tipo Metano ($N_2 - CH_4$)

Tabla 18. Áreas ocupadas por el Metano en la Curva Tipo (CH₄ - aire)

%CH ₄	Área I	Área II	Área promedio
0.1	919370	821960	870665±68879.27
0.5	3388700	2808300	3098500±410404.77
1	5062400	5089400	5075900±19091.88
1.5	7873800	6900000	7386900±688580.58
2	9284200	9279200	9281700±3535.53
3	13634000	13027000	13330500±429213.81

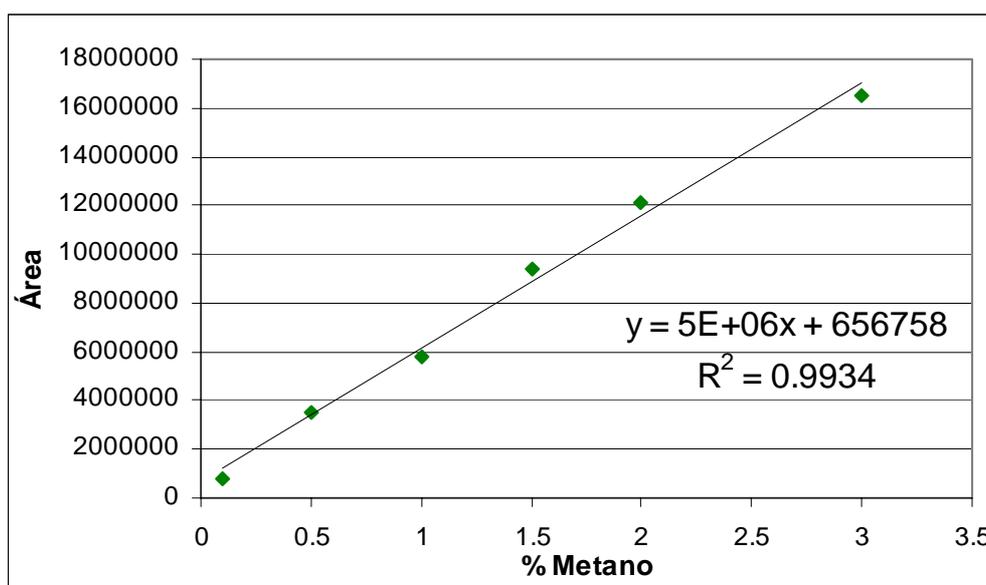


Figura A11. Curva patrón de metano en aire.

9.2.3 Curva patrón de sulfuro

Para la determinación de sulfuro fueron preparadas las siguientes: Acetato de zinc: Se disolvieron 23.92g de Zn (C₂H₃O₂)₂*2H₂O en 800mL de agua destilada, posteriormente se adicionaron 2mL de ácido acético puro y se aforó a 1L.

Sulfato férrico amoniacal: Se disolvieron 10g de FeNH₄(SO₄)₂*12H₂O en 50mL de agua destilada, posteriormente se añadieron 2mL de ácido sulfúrico (18M) y se aforó a 100mL con agua destilada, se filtró la solución para eliminar el exceso de FeNH₄(SO₄)₂*12H₂O.

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 500mL con agua destilada.

La curva de patrón se realizó añadiendo (mL) en estricto orden: 5 acetato de zinc, solución de sulfuro de sodio (10ppm) para obtener concentraciones de sulfuro (S^{-2}) de 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 0.8 y 1ppm, 2.5 solución DMP y 0.125 sulfato férrico amoniacal y agua destilada para obtener 25mL de solución. Trascorridos 30 minutos, las muestras fueron leídas en el espectrofotómetro (UV_vis- Beckman DU 650) a 670nm utilizando celdas de cuarzo.

La concentración de sulfuro (S^{-2}) fue determinada empleando la siguiente ecuación:

$$[\text{Sulfuro}] = (\text{Es}-\text{E0}) (1/\text{Ext.f})(\text{Dil. f}) [=] \text{ppm } S^{-2}$$

Donde:

Es = absorbancia de la muestra.

E0 = absorbancia del blanco.

Ext. f = absorbancia de 1ppm S^{-2} /L, asumiendo que es 1.

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

Tabla 19. Datos de la curva patrón de sulfuro.

ppm S^{-2}	*Absorbancia Promedio (670 nm)
0	0
0.1	0.12±0.00
0.2	0.22±0.00
0.4	0.53±0.00
0.6	0.81±0.01
0.8	0.98±0.01
1	1.17±0.01

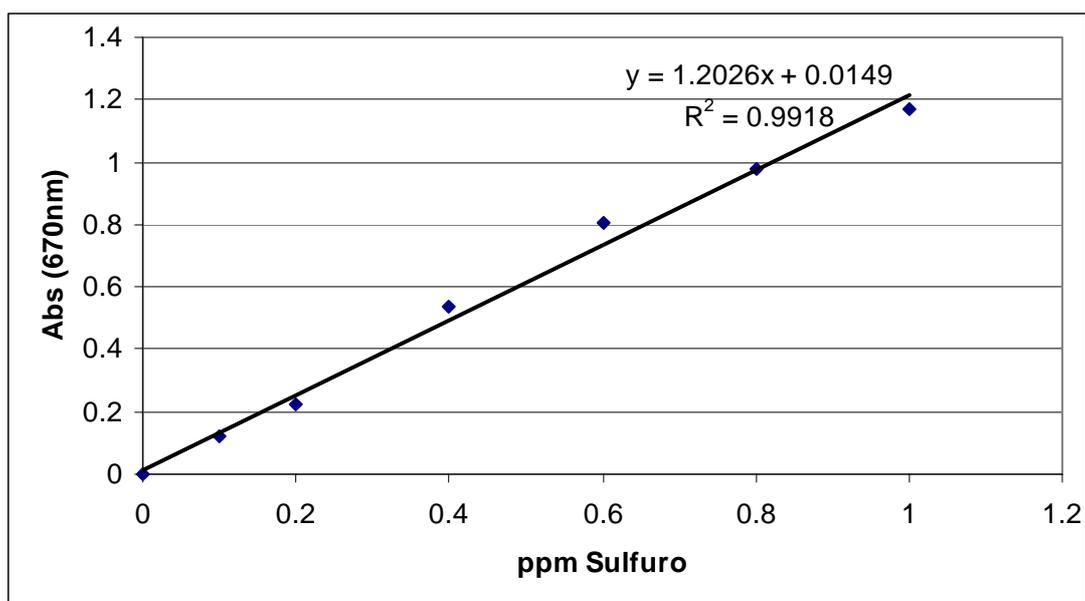


Figura A12. Curva patrón de sulfuro.

9.2.4 Curvas patrón de TCE, *cis* 1,2, DCE, *trans* 1,2 DCE

A partir de la Ley de Henry se añadieron 44.8, 40 y 42.2 mL de TCE, *cis* 1,2, DCE, *trans* 1,2 DCE (Sigma-Aldrich) respectivamente en botellas serológicas de 125mL conteniendo 100mL de agua destilada, éstas fueron selladas y se dejaron reposar por 24h a temperatura ambiente.

Tras haber alcanzado el equilibrio, se tomó volumen necesario de los disolventes para obtener 50mL de solución (por punto) en las siguientes concentraciones: 5, 10, 20, 40 y 60 μ M para DCE (*cis* y *trans*). Se agregaron dos puntos para la curva de TCE, 80 y 100 μ M.

Las muestras fueron leídas en un cromatógrafo de gases de detección de electrones.

Tabla20. Datos de la Curva Tipo de TCE

Concentración (μ 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

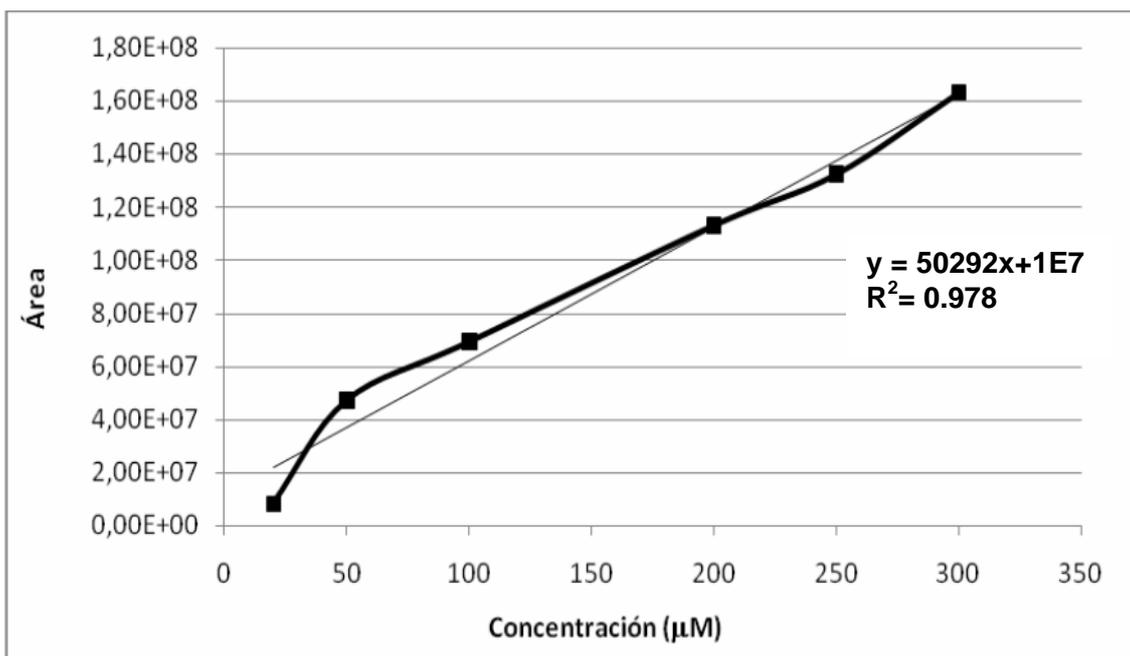


Figura A13. Curva patrón de Tricloroetileno (TCE).

9.3 Caracterización de los sedimentos

9.3.1 Determinación de pH

Para determinar el pH se calibró el potenciómetro (Oakton pH/CON S10 Series) con los buffer pH 4 y 7. Se pesa 1 gramo de la muestra disolviéndola en 20 ml de agua destilada, y se determina el pH de la muestra por triplicado. 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.

9.3.2 Porcentaje de humedad

Se homogenizaron muestras de sedimentos (1 y 2), se colocaron 2g en cápsulas de porcelana previamente pesadas, estas se colocaron en una estufa a 120 °C por 8 horas, una vez enfriadas fueron mantenidas a peso constante en un desecador y posteriormente pesadas, el proceso se realizó por triplicado. El porcentaje de humedad se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Humedad} = ((P_i - P_f) / P_i) * 100$$

Donde:

P_i = Peso inicial (muestra seca)

P_f = Peso final (muestra húmeda)

9.3.3 Porcentaje de materia orgánica

Las muestras secas se colocaron en una mufla (Melisa Mufla) a 540° C por 12 horas aproximadamente, una vez enfriadas fueron mantenidas a peso constante en un desecador y posteriormente pesadas, el proceso se realizó por triplicado. El porcentaje de materia orgánica fue obtenido empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Materia orgánica} = ((m' - m'') / (m - m'')) * 100$$

Donde:

m = Peso de la cápsula de porcelana con la muestra seca

m' = Peso de la cápsula de porcelana con las cenizas

m'' = Peso de la cápsula de porcelana

9.4 Preparación de medios

9.4.1 Medio basal

La solución se elaboró conteniendo (en g/1.0055L): 7.5877 $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$, 2.002 K_2HPO_4 , 1.2501 MgSO_4 , 0.5003 NaHCO_3 , 1.001 $\text{Ca}(\text{OH})_2$. El medio fue suplementado con ácido grasos volátiles (AGV's), conteniendo (en g/50mL): 0.0042 acetato, 0.003 propionato y 0.0023 butirato de sodio, en proporción 1:1:1 de demanda química de oxígeno (DQO) con una concentración de 200 mgDQO/L.

9.4.2 Solución de metales traza

La solución se preparó conteniendo (en mg/L): 50 H_3BO_3 , 2800 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 106 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 380 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 170 $\text{AlK}(\text{SO}_4) \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 25.23 $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 3392.56 $\text{Na}_3\text{Co}(\text{NO}_2)_6$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1000 EDTA, 200 rezarsurina. (Guerrero-Barajas, 2004).

9.4.3 Medio A (medio para actividad sulfato-reductora)

La solución se elaboró conteniendo (en g/L): 1.2 K_2HPO_4 , 1.59 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2 CH_3COONa , 5.91 Na_2SO_4 (concentración final de SO_4^{2-} de 4g/L), 0.166 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2 NaCl , 0.56 NH_4Cl , 0.04 extracto de levadura, 2mL solución de metales traza.

9.5 Condiciones experimentales a las que se llegó para lograr la extracción de ADN.

Tabla 21. Condiciones del experimento de disolventes al que se le realizó la extracción de ADN.

Adición de (2ml) AGV's	Adición de TCE	Determinación de sulfuro	Evacuación con Nitrógeno	Extracción de ADN
08-11-06	27-10-06		22-01-07	19-01-07 Para T1 del S2
23-11-06	09-11-06	27-10-06	31-01-07	14-02-07 Para T1 del S2
11-12-06	15-11-06	08-11-06		14-05-07 Para T2 del S1
18-12-06	11-12-06	10-11-06		
09-01-07		23-11-06		
08-02-07		08-02-07		

La concentración de TCE 5000 μM

A partir del jueves 08 de marzo del 2007 la adición de sustrato y TCE, fue cada semana.

10. Referencias

1. *Anteproyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-014-CNA-2003 Requisitos para la Recarga Artificial de Acuíferos*, Comisión Nacional del Agua, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
2. Freedman, D. L., and S. D. Herz. (1996). Use of ethylene and ethane as primary substrates for aerobic cometabolism of vinyl chloride. *Water Environment Research* 68:320-328.
3. Guerrero Barajas C. (2004) The Role of Redox Mediators on the Anaerobic Degradation of Chlorinated Solvents. Dissertation. Department of Chemical and Environmental Engineering, University of Arizona.
4. Guerrero – Barajas C., Field J. (2004) Riboflavin and cobalamin mediated biodegradation of chloroform in a methanogenic consortium.
5. Guerrero-Barajas, Claudia & Jim A. Field (2006) Enhanced anaerobic biotransformation of carbon tetrachloride with precursors of vitamin B12 biosynthesis. *J. Biodegradation* 17(4): 317-329.
6. Guerrero – Barajas C., Field J. (2005) Enhanced anaerobic biotransformation of carbon tetrachloride with precursors of vitamin B12 biosynthesis. *Biodegradation*.
7. Holliger, C., G. Wohlfarth, and G. Diekert. (1998). Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria. *Fems Microbiology Reviews* 22:383-398.
8. Holliger, C., G. Schraa, Evidence for the Involvement of Corrinoids and Factor F430 in the Reductive Dechlorination of 1,2 Dichloethane by *Methanosarcina barkeri* (1992), *Journal of Biotechnology* 174:13.
9. (PNUMA, 1999) - Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, "Guidelines for the Identification of PCBs and Materials Containing PCBs", agosto 1999.
10. Rysavy, Jasón P., Yan, Tao, Novak, Paige J. (2005). "Enrichment of Anaerobic Polychlorinated Biphenyl Dechlorinators from sediment with iron as a hydrogen source"
11. R.M. Prol – Ledesma, Canet, C., Melgarejo, J.C., Tolson, G., Rubio- Ramos, M.A, Cruz Ocampo, J.C., Ortega Osorio, A., Torres Vera, M.A., Reyes,A. "Cinnabar Deposition in Submarine Coastal Hidrothermal Vents, Pacific Margin of Central México"
12. R.M. Prol-Ledesma, C. Caneta, M.A. Torres-Verab, M.J. Forrestc, M.A. Armientaa "Vent fluid chemistry in Bahía Concepción coastal submarine hydrothermal system, Baja California Sur, Mexico"