



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

TESIS

**PRODUCCIÓN DE IMIDASAS POR LAS BACTERIAS DEL TRACTO DIGESTIVO DE  
*Eisenia foetida***

Presentada para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

por

**Ilse Yazmín Arciniega Carreón**

Ingeniero Biotecnólogo

Dirigida por

**Dra. Marina Olivia Franco Hernández**

**Dra. María del Carmen Oliver Salvador**

México, D.F. junio de 2011



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*ACTA DE REVISIÓN DE TESIS*

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 12:00 horas del día 21 del mes de junio del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la UPIBI – IPN para examinar la tesis titulada:

**“PRODUCCIÓN DE IMIDASAS POR LAS BACTERIAS DEL TRACTO DIGESTIVO DE  
*Eisenia foetida*”**

Presentada por el alumno:

Arciniega	Carreón	Ilse Yazmín							
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)							
	Con registro:	<table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px 5px;">B</td> <td style="padding: 2px 5px;">0</td> <td style="padding: 2px 5px;">9</td> <td style="padding: 2px 5px;">1</td> <td style="padding: 2px 5px;">4</td> <td style="padding: 2px 5px;">8</td> <td style="padding: 2px 5px;">8</td> </tr> </table>	B	0	9	1	4	8	8
B	0	9	1	4	8	8			

aspirante de:

**Maestría en Ciencias en Bioprocesos**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

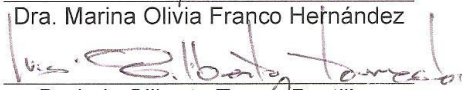
**LA COMISIÓN REVISORA**

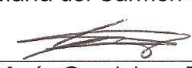
Director de tesis

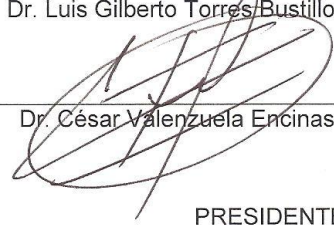
  
\_\_\_\_\_  
Dra. Marina Olivia Franco Hernández

Director de tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dra. María del Carmen Oliver Salvador

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Luis Gilberto Torres Bustillos

  
\_\_\_\_\_  
Dra. María Guadalupe Ramírez Sotelo

  
\_\_\_\_\_  
Dr. César Valenzuela Encinas

**PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES**

  
\_\_\_\_\_  
Dra. María Guadalupe Ramírez Sotelo



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
UNIDAD PROFESIONAL  
INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO E INVESTIGACION**



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 21 del mes de junio del año 2011, el que suscribe Ilse Yazmín Arciniega Carreón alumno del Programa de Maestría en Ciencias en Bioprocesos con número de registro B091488, adscrito a Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Marina Olivia Franco Hernández y de la Dra. María del Carmen Oliver Salvador cede los derechos del trabajo intitulado **Producción de Imidasas por las bacterias del tracto digestivo de *Eisenia foetida***, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección [ofranco@acei.upibi.ipn.mx](mailto:ofranco@acei.upibi.ipn.mx) y [moliver@ipn.mx](mailto:moliver@ipn.mx). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

  
Ilse Yazmín Arciniega Carreón

### **Declaración de originalidad**

"Yo declaro que esta tesis, así como los resultados en ella reportados, son producto de mi trabajo y que hasta donde yo sé, no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, ni tampoco contiene material que haya sido utilizado para obtener algún grado o diploma en alguna otra institución educativa excepto donde se reconoce como tal. Declaro igualmente que hago justo reconocimiento en la tesis a las personas que contribuyeron con su trabajo y, finalmente, declaro que esta tesis es producto de mi propio trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita."

Ilse Yazmín Arciniega Carreón.

Vo. Bo. Dra. Marina Olivia Franco Hernández.



"Yo [Ilse Yazmín Arciniega Carreón] declaro que los resultados reportados en esta tesis, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo declaro que hasta donde yo sé no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona excepto donde se reconoce como tal a través de citas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mi director de tesis y mi comité tutorial en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita."

## RESUMEN

Se ha reportado la producción de imidasas en bacterias, algunas pueden estar involucradas en la degradación de polímeros o compuestos tóxicos como la acrilamida. Las poliacrilamidas son polímeros formados básicamente por unidades de acrilamida. A la fecha no se tiene información suficiente que muestre que la poliacrilamida es tóxica, en cambio la acrilamida es muy tóxica, a altas concentraciones, afecta el sistema nervioso central. Las poliacrilamidas son muy utilizadas en procesos industriales, como floculantes, y en la agricultura para mejorar los suelos. Uno de los procesos de biorremediación eficiente para la degradación de biosólidos industriales es la lombricomposta. Las lombrices se han utilizado en muchos procesos de biorremediación, debido a su capacidad de acumular y/o degradar contaminantes tóxicos, facilidad de manipulación en el laboratorio y a la capacidad de transformar materiales de desecho en humus de lombriz el cual es útil como composta en zonas agrícolas y urbanas. Se ha reportado que *Eisenia foetida* es la mejor en transformar residuos orgánicos o tóxicos, además tiene una gran tolerancia a la temperatura. También posee una abundante flora bacteriana en su intestino, la que ayuda a su metabolismo digestivo así como a degradar compuestos tóxicos. Algunas de estas bacterias pueden producir enzimas, imidasas, que degradan acrilamida y o poliacrilamida. Dado lo cual, es importante el aislamiento e identificación de cepa(s) productora(s) de imidasas.

En esta tesis se aislaron 42 cepas bacterianas del tracto digestivo de *E. foetida*, y se identificaron 13 cepas bacterianas a nivel de género y de especie mediante la caracterización molecular de su 16S rARN: *Kocuria rosea*, *Serratia marcescens*, *Planomicrobium sp.*, *Arthrobacter oxydans*, *Microbacterium schleiferi*, *Bacillus subtilis*, *Arthrobacter luteolus*, *Crocino bacterium jeju*, *Paenibacillus spp.*, *Micrococcus yunnanensis*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Serratia marcescens*, *Janibacter melonis* y *Kocuria sp.* Todas crecieron en un medio de cultivo mínimo con 1 g/L de acrilamida como única fuente de carbono. Siete de estas crecieron en medios de cultivo mínimo con 3 g/L de acrilamida y con 1 g/L de poliacrilamida (*B. subtilis*, *A. luteolus*, *C. jeju*, *S. marcescens*, *K. rosea*, *B. weihenstephanensis* y *Planomicrobium sp.*). La cepa *A. luteolus* es la que presentó el mejor valor de velocidad de crecimiento en acrilamida con un valor de  $0.046 \text{ h}^{-1}$  y en poliacrilamida fue *Serratia marcescens* con un valor de  $0.029 \text{ h}^{-1}$ . El mejor rendimiento  $Y_p/s$  se obtuvo con la cepa *B. weihenstephanensis*, usando acrilamida y con poliacrilamida. La producción de amonio, que es el producto de la degradación de acrilamida y poliacrilamida no está asociado al crecimiento de las cepas bacterianas utilizadas en el estudio. *B. subtilis* y *B. weihenstephanensis* presentaron la mayor densidad celular y el mayor porcentaje de remoción de acrilamida (97%) acorde con la producción de amonio y con el mayor valor de la actividad de imidasas, de las siete bacterias estudiadas. *B. subtilis* y *Planomicrobium sp.* fueron las que crecieron mejor en poliacrilamida (1 g/L) y presentaron mayor producción de amonio y mayor valor de actividad enzimática. Así mismo, se demostró la producción de imidasa(s) en las siete cepas bacterias cultivadas con acrilamida o con poliacrilamida, mediante la determinación de su actividad enzimática, la remoción de estos compuestos y la producción de amonio.

## ABSTRACT

The imidase production in bacteria has been reported, some may be involved in the degradation of polymers or toxic compounds like the acrylamide. Polyacrylamides are polymers formed mainly by units of acrylamide. To date there is not sufficient information showing that the polyacrylamide is toxic; however acrylamide is highly toxic, at high concentrations, affects the central nervous system. Polyacrylamides are used in industrial processes such as flocculation and in agriculture to improve grounds. One of bioremediation processes for efficient degradation of industry biosolids is the vermicompost. Earthworms have been used in many bioremediation processes due to their ability to accumulate and/or degrade toxic pollutants, ease of handling in the laboratory and the ability to transform waste materials into worm castings which is useful like compost in agricultural and urban zones. *Eisenia foetida* has been reported as the best earthworm to transform organic waste or toxic residues, in addition has a great tolerance to the temperature. Also it owns an abundant bacterial flora in its gut, which helps its digestive metabolism as well as to degrade toxic compounds. Some of these bacteria can produce imidase enzymes, that degrade acrylamide or polyacrylamide. As such, it is important to isolate and identify strain (s) producer (s) of imidasas.

In this thesis 42 bacterial strains of the digestive tract of *E. foetida* were isolated. And identified 13 bacterial strains to genus and species level by means of the molecular characterization of the 16S rRNA: *Kocuria rosea*, *Serratia marcescens*, *Planomicrobium sp.*, *Arthrobacter oxydans*, *Microbacterium schleiferi*, *Bacillus subtilis*, *Arthrobacter luteolus*, *Crocinosbacterium jeju*, *Paenibacillus spp.*, *Micrococcus yunnanensis*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Janibacter melonis* and *Kocuria sp.* All grew on a minimum medium with 1 g / L of acrylamide as the sole carbon source. Seven of these strains grew in minimum culture media with 3 g/L of acrylamide and 1 g/L polyacrylamide (*B. subtilis*, *A. luteolus*, *C. Jeju*, *S. marcescens*, *K. rosea*, *B. weihenstephanensis* and *Planomicrobium sp.*). The *A. luteolus* strain displayed the highest value growth rate of acrylamide with a value of  $0.046 \text{ h}^{-1}$  and with polyacrylamide was *S. marcescens* strain with a value of  $0.029 \text{ h}^{-1}$ . The best yield  $Y_{ps}$  was obtained with the *B. weihenstephanensis*, using acrylamide and polyacrylamide. The ammonia production which is the product of the degradation of acrylamide and polyacrylamide is not associated with the growth of bacterial strains used in this study. *B. subtilis* and *B. weihenstephanensis* displayed the greater cell growth and the highest percentage of acrylamide removal (97%), according to the production of ammonia and the highest value of imidase activity of the seven bacterial strains studied. *B. subtilis* and *Planomicrobium sp.*, were those that grew better in the cultures with polyacrylamide (1 g/L) and these strains presented the major production of ammonia and higher value of enzyme activity. Likewise, it demonstrated that the production of imidasas (s) in the seven bacterial strains grown with acrylamide or polyacrylamide, by means determining its enzymatic activity, the removal of these compounds and ammonia production.

## AGRADECIMIENTOS

*“Demos gracias a los hombres y a las mujeres que nos hacen felices, ellos son los encantadores jardineros que hacen florecer a nuestros espíritus.”*

*Will Rogers*

*“Sepamos decir a nuestra familia cuanto nos importa, que les queremos, pues el amor más grande del mundo, en ella lo encontraremos”*

*Anónimo*

Agradezco a mi familia que siempre me apoya con su amor y su paciencia.

*“El buen maestro hace que el mal estudiante se convierta en bueno y el buen estudiante en superior”.*

*Maruja Torres*

Agradezco a mis Directoras de Tesis: Dra. Marina Olivia Franco Hernández y Dra. María del Carmen Oliver Salvador por su apoyo, sus enseñanzas y su tiempo. Gracias por confiar en mí.

Agradezco a los miembros del Comité Evaluador: Dra. María Guadalupe Ramírez Sotelo, Dr. Luis Gilberto Torres Bustillos, y Dr. Cesar Valenzuela Encinas, por sus comentarios, aportaciones y el tiempo dedicado a la corrección de este documento.

Agradezco a mis compañeros y profesores de los laboratorios de Bioingeniería, Biología Molecular y Química por su apoyo, por compartir sus conocimientos y su amistad.

*“Si sientes que todo perdió su sentido, siempre habrá un “te quiero”, siempre habrá un amigo. Un amigo es una persona con la que se puede pensar en voz alta.”*

*Ralph Waldo Emerson*

Agradezco las personas y amigos que me apoyaron y me hicieron reír en momentos difíciles, que me ayudaron y confiaron en mí. Gracias por su amistad y por cada momento de alegría.

*“Nunca consideres el estudio como una obligación, sí no como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”*

*Albert Einstein*

## CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Lombricomposta .....	1
1.1.1. Lombricomposteo y biorremediación .....	1
1.1.2. Eisenia foetida .....	3
1.1.2.1. Clasificación zoológica .....	3
1.1.2.2. Características generales .....	4
1.1.2.3. Características externas .....	4
1.1.2.4. Sistema digestivo .....	4
1.1.2.5. Usos y beneficios de la lombricomposta .....	5
1.2. Imidasas .....	6
1.2.1. Especificidad del sustrato .....	7
1.2.2. Superfamilia de imidasas .....	8
1.2.3. Dihidropirimidinasas .....	9
1.3. Poliacrilamidas .....	10
1.3.1. Clasificación de poliacrilamida .....	11
1.3.2. Acrilamida .....	11
1.3.2.1. Toxicidad .....	11
1.3.3. Contaminación por poliacrilamida .....	12
2. ANTECEDENTES .....	14
2.1. Poliacrilamida .....	14
2.2. Imidasas .....	16
2.3. Lombricomposta .....	17
3. JUSTIFICACIÓN .....	21
4. OBJETIVOS .....	22
4.1. Objetivo General .....	22
4.1.1. Objetivos Específicos .....	22
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	23
5.1. Metodología general .....	23
5.2. Metodología .....	24
5.2.1. Lombricomposta .....	24
5.2.2. Aislamiento de bacterias del tracto intestinal de <i>E foetida</i> .....	25
5.2.3. Análisis macroscópico y microscópico de bacterias aisladas .....	25
5.2.4. Identificación de las bacterias aisladas .....	26
5.2.4.1. Pruebas bioquímicas .....	26
5.2.4.1.1. Bacterias Gram (+) .....	26
5.2.4.1.2. Bacterias Gram (-) .....	27
5.2.4.2. Técnicas de Biología Molecular .....	27
5.2.4.2.1. Extracción de ADN geonómico .....	27
5.2.4.2.2. Primers para PCR .....	28



5.2.4.2.3.	Preparación de la reacción de PCR.....	28
5.2.4.2.4.	Verificación de los fragmentos amplificados por PCR mediante electroforesis .....	30
5.2.4.2.6.	Análisis filogenético.....	30
5.2.5.	Ensayos de degradación de acrilamida y poliacrilamida .....	30
5.2.5.1.	Medio con acrilamida.....	30
5.2.5.2.	Medio líquido para degradación de acrilamida y poliacrilamida.....	31
5.2.6.	Análisis de la actividad enzimática.....	31
5.2.7.	Determinación de glucosa.....	32
5.2.8.	Determinación de acrilamida.....	32
5.2.9.	Determinación de amonio .....	32
5.2.10.	Crecimiento bacteriano .....	33
6.	RESULTADOS.....	34
6.1.	Aislamiento de bacterias del tracto intestinal de <i>E. foetida</i> .....	34
6.2.	Análisis macroscópico y microscópico de bacterias aisladas.....	34
6.3.	Crecimiento en acrilamida .....	36
6.4.	Identificación de las bacterias aisladas.....	43
6.4.1.	Pruebas bioquímicas .....	43
6.4.2.	Identificación molecular de bacterias .....	45
6.5.	Análisis filogenético .....	49
6.6.	Dinámicas de crecimiento, degradación de acrilamida, glucosa y producción de amonio	51
6.6.1.	Dinámica de la biomasa de cepas cultivadas en presencia de acrilamida.....	51
6.6.2.	Consumo de Glucosa residual.....	54
6.6.3.	Degradación de Acrilamida.....	55
6.6.3.1.	Producción de amonio en los cultivos bacterianos.....	56
6.6.4.	Actividad de Imidasa de cepas cultivadas en presencia de acrilamida.....	60
6.7.	Dinámicas de crecimiento, glucosa, producción de amonio y actividad enzimática.....	61
6.7.1.	Crecimiento bacteriano en presencia de poliacrilamida .....	61
6.7.2.	Determinación de Glucosa residual .....	63
6.7.3.	Producción de amonio en los medios con poliacrilamida. ....	64
6.7.4.	Actividad de Imidasa de cepas cultivadas en presencia de poliacrilamida .....	65
7.	CONCLUSIONES.....	77
8.	REFERENCIAS.....	80
9.	ANEXOS.....	A

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Lombricomposta con <i>Eisenia foetida</i> .....	2
Figura 2. Lombrices rojas californianas ( <i>E. foetida</i> ).....	3
Figura 3. Vista dorsal de estructuras internas de la lombriz de tierra.....	5
Figura 4. Estructura química de imidas: a) succinimida y b) ftalimida .....	7
Figura 5. Reacción de producción de una imida cíclica. ....	7
Figura 6. A) Hidrólisis de dihidropirimidinas. B) Producción de aminoácidos a partir de sustituidos DL-5 de hidantoina, C) Hidrólisis del ciclo de imidas. 1. Dihidropirimidinasa; 2. B-ureidopropinasa; 3. hidantoinasa; 4. Ácido N-carbamoilamino amidohidrolasa; 5. Imidasa; 6. Amidasa.....	8
Figura 7. Esquema simplificado de los procesos de síntesis con AM y PAM).....	10
Figura 8. Representación de la poliacrilamida. Reacción de poliacrilamida a poliacrilato por una amidasa .....	15
Figura 9. Diagrama de flujo de la metodología general.....	23
Figura 10. Zona de muestreo de biosólidos.....	24
Figura 11. Obtención de lodos y preparación de lombricomposta .....	25
Figura 12. Bacterias aisladas del tracto digestivo de <i>E. foetida</i> en medio Agar TSA: a)4-2, b) 11 A y c) 8 R. ....	34
Figura 13. a) Morfología colonial de la bacteria 11 A y 10 cc1, b) Aislamiento en tubos y morfología colonial. ....	35
Figura 14. Microscopía en el objetivo 100X de dos bacterias aisladas. a) 4-1 coco Gram positivo y b) 8 R' coco Gram negativo .....	36
Figura 15. Morfología microscópica de los microorganismos. Gram negativos: a) 9-2 (coco negativo); b) 15-1-R (cocobacilo negativo); c) 7 Rosa (coco negativo). Gram positivas: d) 11 ana 2* a/blanca (bacilo positivo); e) 4-2 (coco positivo); f) 11 ana 2* (coco positivo) ..	43
Figura 16. Ejemplo de las pruebas bioquímicas (API) realizadas a las bacterias aisladas.....	44
Figura 17. Gen 16S rARN amplificado por PCR. Carril 1. Marcador de pares de bases, del carril 2 a 6 diferentes bacterias, 2) 1-1-2 col ama, 3) 4-1, 4) 10cc2, 5) 11ana2*a/blanca y ). 15-1-R.....	45
Figura 18. Posición filogenética de la bacteria 10cc2. El árbol se construyó con secuencias completas. El árbol esta dibujado a escala con las longitudes de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol. Se utilizó el	

algoritmo “Neibor-joining” y método de Tamura-nei. La bacteria 10cc2 tiene una similitud del 99% con <i>Bacillus subtilis</i> . .....	49
Figura 19. Posición filogenética de la bacteria 4-2, 5col b/ana, 5 col blanca blanca, 5 col blanca2 7B, 10 cc1, 11, 11 ana 2*, 11 ana 2* ana blanca, 15-1 R y 15-2. El árbol se construyó con secuencias completas. El árbol esta dibujado a escala con las longitudes de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol. Se utilizó el algoritmo “Neibor-joining” y método de Tamura-nei. ....	50
Figura 20. Desarrollo celular de: a) <i>A. luteolus</i> , b) <i>K. rosea</i> y c) <i>Planomicrobium sp.</i> , en medio mínimo con 3 g/L de acrilamida.....	52
Figura 21. Desarrollo celular de: 1) <i>B. subtilis</i> , 2) <i>C. jejui</i> y 3) <i>B. weihenstephanensis</i> , en medio mínimo con 3 g/L de acrilamida.....	52
Figura 22. Consumo de glucosa de las cepas: ♦ <i>A. luteolus</i> , ■ <i>C. jejui</i> , ▲ <i>Planomicrobium sp.</i> , × <i>S. marcescens</i> , ✕ <i>B. subtilis</i> , ● <i>K. rosea</i> , + <i>B. weihenstephanensis</i> . Cultivadas en medio mínimo con 3 g/L de acrilamida y 0.1 g/L de glucosa,.....	54
Figura 23. Degradación de acrilamida por <i>Planomicrobium sp.</i> : A) (--●--) Biomasa - (- ■- -) Acrilamida residual, B) (--●--) Biomasa -(- ■- -) Producción de amonio, C) (--●--) Biomasa-(- ■- -) actividad enzimática, D) (--●--) Acrilamida residual-(- ■- -) producción de amonio, E) (--●--) Acrilamida residual -(- ■- -) actividad enzimática y F) (--●--) Acrilamida residual- (- ■- -) Consumo Glucosa.....	57
Figura 24. Degradación de acrilamida por <i>Bacillus subtilis</i> : A) (--●--) Biomasa- (- ■- -) Acrilamida residual, B) (--●--) Biomasa -(- ■- -) Producción de amonio, C) (--●--) Biomasa-(- ■- -) actividad enzimática, D) (--●--) Acrilamida residual-(- ■- -) producción de amonio, E) (--●--) Acrilamida residual -(- ■- -) actividad enzimática y F) (--●--) Acrilamida residual- (- ■- -) Consumo Glucosa.....	58
Figura 25. Degradación de acrilamida por <i>Bacillus weihenstephanensis</i> : A) (--●--) Biomasa-(- ■- -) Acrilamida residual, B) (--●--) Biomasa -(- ■- -) Producción de amonio, C) (--●--) Biomasa-(- ■- -) actividad enzimática, D) (--●--) Acrilamida residual-(- ■- -) producción de amonio, E) (--●--) Acrilamida residual -(- ■- -) actividad enzimática y F) (--●--) Acrilamida residual-(- ■- -) Consumo Glucosa.....	59
Figura 26. Desarrollo celular de las cepas: a) <i>B. weihenstephanensis</i> , b) <i>C. jejui</i> , c) <i>A. luteolus</i> , d) <i>K. rosea</i> , e) <i>Planomicrobium sp.</i> y f) <i>B. subtilis</i> , cultivadas en medio mínimo con 1 g/L de poliacrilamida. ....	62
Figura 27. Consumo de glucosa en el cultivo de cepas bacterianas: ♦ <i>A. luteolus</i> , ■ <i>C. jejui</i> , ▲ <i>Planomicrobium sp.</i> , × <i>S. marcescens</i> , ✕ <i>B. subtilis</i> , ● <i>K. rosea</i> , + <i>B. weihenstephanensis</i> . Cultivadas en medio mínimo con 1 g/L de poliacrilamida y 0.05 g/L de glucosa, temperatura ambiente y a 120 rpm.....	64
Figura 28. Degradación de poliacrilamida por <i>Bacillus subtilis</i> : A) (--●--) Biomasa -(- ■- -) Producción de amonio, B) (--●--) Biomasa-(- ■- -) actividad enzimática, C) (--●--) Biomasa-(- ■- -) Consumo de Glucosa y D) (--●--) Producción de amonio-(- ■- -) Actividad enzimática.....	66

- Figura 29. Degradación de poliacrilamida por *Bacillus weihenstephanensis*: A) (●) Biomasa (■) Producción de amonio, B) (●) Biomasa (■) actividad enzimática, C) (●) Biomasa (■) Consumo de Glucosa y D) (●) Producción de amonio (■) Actividad enzimática..... 67
- Figura 30. Degradación de poliacrilamida por *Planomicrobium sp.*: A) (●) Biomasa (■) Producción de amonio, B) (●) Biomasa (■) actividad enzimática, C) (●) Biomasa (■) Consumo de Glucosa y D) (●) Producción de amonio (■) Actividad enzimática..... 68
- Figura 31. Pruebas Bioquímicas API 20E de algunas bacterias aisladas de *E. foetida*. ..... J
- Figura 32. Morfología microscópica de bacterias gram negativas. a) 5 blanca blanca, b) 9-2-R, c) 15-1-b.....K
- Figura 33. Morfología microscópica de bacterias gram positivas. a) 4-2, b) 10 cc2, c) 11 ana 2\* b/ana, d) 11 ana 1(1) y e) 7B.....K
- Figura 34. Morfología microscópica de bacterias gram positivas: a) 10 cc1, b) 11 y c) 1-1-2 col ama..... L
- Figura 35. Posición filogenética de la bacteria 7B. El árbol se construyó con secuencias completas. El árbol esta dibujado a escala con las longitudes de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol. Se utilizó el algoritmo “Neibor-joining” y método de Tamura-nei. La bacteria 7B tiene una similitud del 99% con *Planomicrobium sp.* ..... O
- Figura 36. Posición filogenética de la bacteria 11 ana2\*. El árbol se construyó con secuencias completas. El árbol esta dibujado a escala con las longitudes de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol. Se utilizó el algoritmo “Neibor-joining” y método de Tamura-nei. La bacteria 11 ana2\* tiene una similitud del 80% con *kocuria himachalensis*. .....P
- Figura 37. Posición filogenética de la bacteria 11 ana2\*anablanca. El árbol se construyó con secuencias completas. El árbol esta dibujado a escala con las longitudes de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol. Se utilizó el algoritmo “Neibor-joining” y método de Tamura-nei. La bacteria 11 ana2\*anablanca tiene una similitud del 64% con *Bacillus weihenstephanensis*..... Q
- Figura 38. Degradación de acrilamida por *Arthrobacter luteolus*: A) (●) Biomasa (■) Acrilamida residual, B) (●) Biomasa (■) Producción de amonio, C) (●) Biomasa (■) Actividad enzimática, D) (●) Acrilamida residual (■) producción de amonio, E) (●) Acrilamida residual (■) Actividad enzimática y F) (●) Acrilamida residual (■) Consumo Glucosa..... R
- Figura 39. Degradación de acrilamida por *Crocino bacterium jeju*: A) (●) Biomasa (■) Acrilamida residual, B) (●) Biomasa (■) Actividad enzimática, C) (●) Acrilamida residual (■) Actividad enzimática, D) (●) Biomasa (■) Producción de amonio, E) (●) Producción de amonio (■) Acrilamida residual y F) (●) Acrilamida residual (■) Consumo Glucosa..... R

Figura 40. Degradación de acrilamida por *Serratia marcescens*: A) (●) Biomasa (- ■ -) Acrilamida residual, B) (●) Biomasa (- ■ -) Producción de amonio, C) (●) Biomasa (- ■ -) Actividad enzimática, D) (●) Acrilamida residual (- ■ -) Actividad enzimática, E) (●) Acrilamida residual (- ■ -) Producción de amonio y F) (●) Acrilamida residual (- ■ -) Consumo Glucosa..... R

Figura 41. Degradación de acrilamida por *Kocuria rosea*: A) (●) Biomasa (- ■ -) Acrilamida residual, B) (●) Biomasa (- ■ -) Producción de amonio, C) (●) Biomasa (- ■ -) Actividad enzimática, D) (●) Acrilamida residual (- ■ -) Actividad enzimática, E) (●) Acrilamida residual (- ■ -) Producción de amonio y F) (●) Acrilamida residual (- ■ -) Consumo Glucosa. .... R

Figura 42. Degradación de poli(acrilamida) por *Arthrobacter luteolus*: A) (●) Biomasa (- ■ -) Actividad enzimática, B) (●) Biomasa (- ■ -) Producción de amonio, C) (●) Biomasa (- ■ -) Consumo de Glucosa y D) (●) Actividad enzimática (- ■ -) Producción de amonio..... R

Figura 43. Degradación de poli(acrilamida) por *Crocinosbaterium jejui*: A) (●) Actividad enzimática (- ■ -) Producción de amonio, B) (●) Biomasa (- ■ -) Actividad enzimática, C) (●) Biomasa (- ■ -) Producción de amonio y D) (●) Biomasa (- ■ -) Consumo de Glucosa..... R

Figura 44. Degradación de poli(acrilamida) por *Serratia marcescens*: A) (●) Biomasa (- ■ -) Producción de amonio, B) (●) Biomasa (- ■ -) Actividad enzimática, C) (●) Biomasa (- ■ -) Consumo de glucosa y D) (●) Producción de amonio (- ■ -) Actividad Enzimática. .... R

Figura 45. Degradación de poli(acrilamida) por *Kocuria rosea*: A) (●) Biomasa (- ■ -) Actividad enzimática, B) (●) Biomasa (- ■ -) Producción de amonio, C) (●) Biomasa (- ■ -) Consumo de glucosa y D) (●) Actividad enzimática (- ■ -) Producción de amonio..... R

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Características generales de la lombriz roja californiana .....	4
Tabla 2. Microorganismos que utilizan la poliacrilamida o acrilamida como fuente de carbono o nitrógeno.....	16
Tabla 3. Técnicas usadas para la identificación de microorganismos del tracto digestivo de lombrices.....	18
Tabla 4. Presencia de microorganismo entre los intestinos de diferentes especies de lombrices .....	19
Tabla 5. Diversidad bacteriana identificada en las paredes intestinales de lombrices. ....	19
Tabla 6. Secuencia de Primers usados para la amplificación del gen 16srARN .....	28
Tabla 7. Concentraciones y volúmenes de los reactivos utilizados en la reacción de PCR .....	29
Tabla 8. Programa para la reacción de PCR .....	29
Tabla 9. Composición del medio mínimo solido (MNS).....	31
Tabla 10. Morfología colonial de las bacterias aisladas .....	35
Tabla 11. Crecimiento de bacterias asiladas del tracto digestivo de <i>E. foetida</i> a diferentes concentraciones de acrilamida como única fuente de carbono y nitrógeno. ....	37
Tabla 12. Características de morfología colonial y microscópica en medio sólido (1 g/L de acrilamida) de las bacterias aisladas.....	38
Tabla 13. Identificación de bacterias por pruebas bioquímicas.....	44
Tabla 14. Resultados de caracterización bioquímica y molecular de las bacterias aisladas .....	46
Tabla 15. Velocidades específicas de crecimiento, rendimiento $Y_p/s$ , velocidad específica de formación de producto y velocidad específica de consumo de sustrato de las bacterias crecidas en el medio mineral con acrilamida. ....	70
Tabla 16. Velocidad específica de crecimiento, rendimiento $Y_p/x$ y velocidad específica de formación de producto de las bacterias crecidas en medios con poliacrilamida. ....	71
Tabla 17. Biomasa, remoción de acrilamida, producción de amonio y actividad enzimática de imidasa en cultivos microbianos.....	74
Tabla 18. Biomasa, producción de amonio y actividad de imidasa en cultivos microbianos con poliacrilamida .....	75
Tabla 19. Morfología colonial de las bacterias aisladas de <i>E. foetida</i> .....	B
Tabla 20. Resultados de Prueba de Gram.....	D

Tabla 21. Resultados de la caracterización de bacterias gram (-) aisladas por pruebas bioquímicas. Pruebas API .....E

Tabla 22. Resultados de las pruebas bioquímicas de bacterias gram positivas. Pruebas BBL Crystal..... G

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Lombricomposta**

En la última década, las tecnologías de biorremediación se han usado para restaurar suelos contaminados. La biorremediación acelera la biodegradación natural de contaminantes orgánicos, optimizando estos procesos a través de la aireación, la adición de nutrientes, el control de pH, contenido de humedad y temperatura. La eficiencia de la restauración del suelo sólo se ha medido por parámetros químicos del suelo y no se ha evaluado como un hábitat para la fauna y la flora (*Geissen et al., 2008*).

Con el paso del tiempo, los contaminantes quedan atrapados y absorbidos en el suelo, en minerales y fracciones de materia orgánica, haciéndolos inaccesibles a la vida silvestre. Las lombrices de tierra tienen un gran potencial en remoción lo cual mejora la eficiencia de biorremediación. La biorremediación utiliza diferentes técnicas para minimizar los compuestos tóxicos, una alternativa es el uso de compostas y el lombricomposteo (*Molinares, 2006*).

#### **1.1.1. Lombricomposteo y biorremediación**

El compostaje y lombricomposta son dos de los más conocidos procesos para la estabilización biológica de los residuos sólidos orgánicos. El compostaje implica la degradación acelerada de materia orgánica por bacterias en condiciones controladas, la acción conjunta de las lombrices y las bacterias caracterizan a la bio-oxidación de la materia orgánica en el compostaje con lombrices. Además de las lombrices, la principal diferencia entre ellas puede encontrarse en la primera de las dos fases, que definen el avance de los procesos. Una fase termofílica, donde la descomposición se lleva a cabo intensamente, constituye la fase activa de compostaje y por otro lado, la etapa de hidrólisis mesofílica que consiste en la estimulación de la actividad metabólica de los microorganismos de vida libre y/o asociados con el intestino de la lombriz (*Vivas et al., 2009*).

El lombricomposteo en los últimos años ha ganado importancia por ser más económico que el compostaje tradicional (Figura 1). Los nutrientes que están presentes se disponen para el crecimiento de las plantas, y el humus de lombriz tiene una mayor concentración de nutrientes disponibles como nitrógeno, fósforo y potasio, que los residuos del que se forma. El potencial de las lombrices de tierra como una herramienta biológica se debe comprender mucho mejor para fomentar la agricultura sostenible y desarrollar el uso de determinadas especies de lombrices de tierra (*Triphathi & Bhardwaj, 2004*).



Las lombrices de tierra son organismos modelo apropiados para medir la biodisponibilidad de un compuesto tóxico en el suelo, esto se debe a que viven en íntimo contacto con el suelo, tienen una cutícula fina y permeable y consumen grandes volúmenes de suelo. Además se han utilizado en muchos estudios debido a su importancia en la cadena alimenticia terrestre, por su potencial para la acumulación de contaminantes y la facilidad de manipulación en el laboratorio (Gomez-Eyles *et al.*, 2009).



**Figura 1. Lombricomposta con *Eisenia foetida* (Tomado de Pacheco, 2010).**

En México, han sido identificadas 129 especies de lombrices, de las cuales 46 son nativas, 47 son exóticas y 36 pertenecen a la familia de los *Megascolecidae*. Las lombrices intervienen en los sistemas de regulación biológica del suelo, tienen la capacidad de remover partículas y producir estructuras organominerales, llamadas estructuras biogénicas. Ellas también ayudan a mantener la estructura del suelo, a proceso de infiltración del agua y a regular la capacidad de asimilación de nutrientes por las plantas, incluyendo el nitrógeno (N) en su forma de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) (Brito-Vega & Espinosa-Victoria, 2009).

Gran parte de los efectos benéficos que las lombrices del suelo aportan a las propiedades del suelo, se atribuye a sus actividades de alimentación e interacción con los microorganismos del suelo, su patrón de consumo implica la ruptura e incorporación de grandes cantidades de suelo (parte mineral y materia orgánica) ya que contiene una variedad de microorganismos. Sin embargo, se sabe poco sobre las interacciones entre lombrices y microorganismos del suelo, incluyendo a la microflora del intestino (Hyun-Jung *et al.*, 2004).

Se ha demostrado que las lombrices de tierra pueden transformar materiales de desecho en humus, el cual es útil como compostas en zonas urbanas y agrícolas. Las lombrices de tierra trituran y digieren los desechos orgánicos con la ayuda de una microflora anaeróbica o aeróbica convirtiendo la materia en algo más fino, humificada. La composta generada es estable, homogénea y puede haber reducido los niveles de contaminantes (Gupta & Garg, 2009).

*Eisenia foetida* ha demostrado ser la mejor en el procesamiento de residuos orgánicos, y se considera adecuada para el lombricomposteo por su gran tolerancia a la temperatura. Sin embargo, es importante investigar la sostenibilidad de la bioconversión del suelo al utilizar la tecnología de las lombrices de tierra, antes de intentar usarla a gran escala, ya que el crecimiento y la capacidad reproductiva son parámetros importantes para la conservación de las poblaciones de lombrices (Maboeta & Rensburg, 2003). El éxito del uso de esta tecnología, depende del control de variables y de condiciones, que a menudo limitan la biorremediación eficaz, como el O<sub>2</sub>, la disponibilidad de nutrientes, pH, relación C/N, la presencia y actividad de los microorganismos, enzimas, temperatura, niveles tóxicos de los contaminantes, presencia de otros contaminantes y la presencia de compuestos como aceptores de electrones (Hickman & Reid, 2008).

### 1.1.2. *Eisenia foetida*

Es la lombriz roja, mal llamada “de california” (Figura 2). Las lombrices rojas "californianas" fueron criadas intensamente a partir de los años 50 en California, esta lombriz es originaria de Euro-Asia (Rodríguez, 2010).

#### 1.1.2.1. *Clasificación zoológica*

*E. foetida* es la lombriz más conocida y empleada en más del 80 % de las lombricompostas del mundo (Mendoza, 2008). Su clasificación taxonómica es (Acevedo, 1998):

- Reino: Animal
- Tipo: *Anélido*
- Clase: *Oligoqueto*
- Orden: *Opisthoro*
- Familia: *Lombricidae*
- Género: *Eisenia*
- Especie: *Eisenia foetida*



**Figura 2. Lombrices rojas californianas (*E. foetida*) (Tomada de Mendoza, 2008)**

### 1.1.2.2. Características generales

En la Tabla 1 se presentan las características generales de *E. foetida*.

**Tabla 1 Características generales de la lombriz roja californiana**

<b>Color</b>	Rojo oscuro
<b>Dimensiones</b>	6-8 cm longitud y 3-5 mm de diámetro
<b>Peso</b>	0.8 – 1.4 gramos
<b>Ciclo de vida</b>	4.5 años
<b>Reproducción</b>	Hasta 1300 lombrices/año
<b>Temperatura</b>	14-27°C
<b>Clima</b>	Templado
<b>Humedad</b>	70-80 %
<b>pH</b>	7.5-8

(Tomado de López, 2004)

### 1.1.2.3. Características externas

Posee un cuerpo alargado, segmentado y con simetría bilateral. Existe una porción más gruesa en el tercio anterior de 5 mm de longitud llamada clitelium cuya función está relacionada con la madurez sexual. Al nacer las lombrices son blancas, transcurridos cinco o seis días se ponen rosadas y a los 120 días son adultas de color rojizo y en condiciones de aparearse (Acevedo, 1998).

### 1.1.2.4. Sistema digestivo

El sistema digestivo comienza con la parte superior de la apertura bucal, en esta parte se sitúa el prostomio con forma de labio y las células del paladar son las encargadas de seleccionar el alimento que pasa posteriormente al esófago donde se localizan las glándulas calcíferas. Estas glándulas segregan iones de calcio contribuyendo a la regulación del equilibrio ácido-básico, tendiendo a neutralizar los valores de pH. Posteriormente se encuentra el buche, en el cual el alimento queda retenido para dirigirse al intestino (Figura 3) (Mendoza, 2008).

Es importante mencionar, que la lombriz consume los alimentos por succión, no tiene dientes, de ahí la importancia de mantener bien húmedo el residuo orgánico a transformar. Su nivel de

eficiencia es del 60 %, es decir todos los días consume una cantidad de comida equivalente a su peso, excretando en forma de humus el 60 % de la misma, el cual es rico en sustancias orgánicas, minerales, fitorreguladores y enzimas; el 40 % restante es asimilado y utilizado por la lombriz para sus funciones vitales. Así un kilogramo de lombriz, consume un kilogramo de desecho orgánico al día (Rodríguez, 2010). Además, la lombriz tiene una gran cantidad de proteína, aproximadamente 80 % de su peso, con un excelente contenido de aminoácidos, puede ser usado como alimento de animales (Mendoza, 2008).

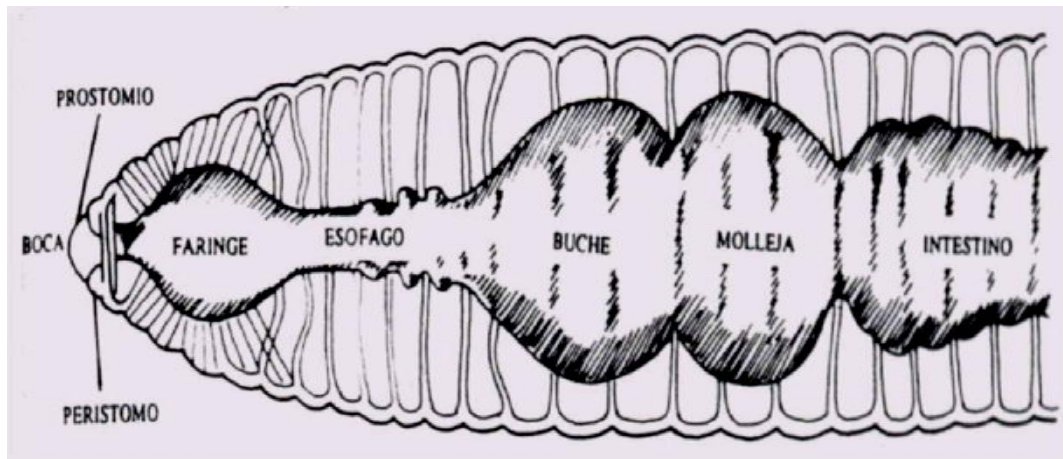


Figura 3. Vista dorsal de estructuras internas de la lombriz de tierra (Tomado de Mendoza, 2008).

#### 1.1.2.5. Usos y beneficios de la lombricomposta

La lombricomposta es usada de la misma manera que la composta, pero es un abono de mayor calidad, la forma de distribución es igual y se puede utilizar en todos los cultivos. La lombricomposta tiene más nutrientes, humus y microorganismos por gramo seco que la composta, lo que la convierte en un excelente mejorador de suelos. El humus se encuentra en forma de gránulos y con olor a tierra húmeda, es rico en hormonas, auxinas, giberelinas y citocininas, siendo esta última la que se encuentra en mayor concentración (Mendoza, 2008).

Los biosólidos son una fuente de nutrientes para las lombrices en el lombricomposteo y éstas contienen microorganismos que pueden acelerar la remoción de contaminantes. Se ha reportado que algunas bacterias producen enzimas capaces de degradar contaminantes. Esta actividad enzimática puede encontrarse en lombrices como *E. foetida* (Contreras-Ramos *et al.*, 2008). La presencia de estas enzimas como las imidasas, podrían contribuir a que se generen compuestos menos tóxicos que no afecten al medio ambiente.

## **1.2. Imidasas**

El tratamiento de desechos es uno de los mejores campos de acción de las enzimas. Existen enzimas capaces de degradar sustancias altamente tóxicas, y por lo tanto son aplicadas en el tratamiento de aguas ó en la degradación de compuestos fenólicos a partir de peroxidases obtenidas de la planta “cola de caballo” ó en la degradación de celulosa, lignina y otros materiales de alto peso molecular ó en el tratamiento de derrames de petróleo con enzimas capaces de degradar hidrocarburos ó en el proceso de biodegradación de plásticos. Estas enzimas pueden obtenerse en cantidades industriales por bacterias que las producen naturalmente ó por bacterias modificadas genéticamente que son comercializadas por empresas biotecnológicas (Soong *et al.*, 1998).

La capacidad de transformar imidas cíclicas está distribuida en bacterias, levaduras y hongos. El metabolismo de ureidos cíclicos en bacterias tiene una amplia aplicación en la biocatálisis para la producción de diferentes compuestos, un ejemplo es el metabolismo de la hidantoina, que ha sido aplicado para la producción de aminoácidos (Ogawa *et al.*, 1997). Sin embargo, en bacterias, esta actividad difiere (Ya-Wei *et al.*, 2010).

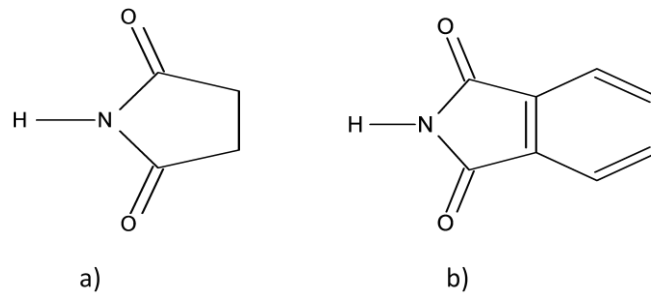
Existen tres tipos de enzimas: a) específicas para transformar enantiómeros D, b) específicas para transformar enantiómeros L y c) no específicas, como las que están involucradas en la hidrólisis de hidantoinas. Este proceso es muy similar al metabolismo de dihidropirimidinas, por lo que se propuso que el metabolismo de hidantoinas y dihidropirimidinas es catalizado por la misma enzima. A pesar de esas semejanzas el mecanismo de reacción de estas enzimas aún no es claro (Ogawa *et al.*, 1997). Estos dos tipos de actividades se llevan a cabo por una sola enzima en mamíferos (dihidropirimidinasasa) y por hidantoinasas e imidasas en bacterias.

La imidasa también es conocida como dihidropirimidinasasa, dihidropiriminina amidohidrolasa, D-hidantoinasa o amidohidrolasa cíclica dependiendo a la especificidad de su sustrato (Tai *et al.*, 2006). Las imidasas catalizan diferentes sustratos y aceptan diferentes imidas, dihidropirimidinas y derivados de hidantoinas (Ya-Wei *et al.*, 2010).

### 1.2.1. Especificidad del sustrato

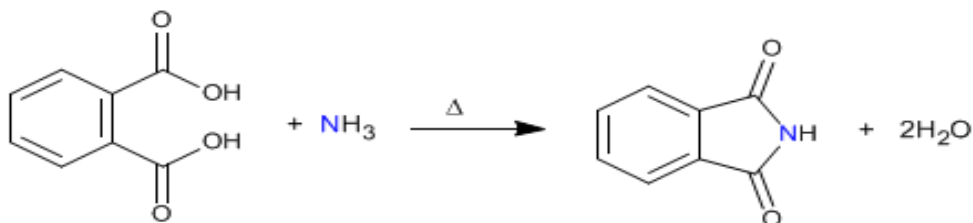
La imidasa prefiere sustratos xenobióticos y tiene una gran especificidad al catalizar la hidrólisis de carbonatos orgánicos cíclicos (Su & Yang, 2000). Las imidasas hidrolizan imidas cíclicas a dicarboxilados monoamidados (Ogawa *et al.*, 1997). Las imidasas están involucradas en el metabolismo de imidas cíclicas de bacterias, la enzima hidroliza las imidas cíclicas a media-amidas y el producto es hidrolizado a compuestos dicarboxilados, los cuales pueden ser transformados a ácidos tricarboxílicos (Ya-Wei *et al.*, 2010).

Las imidas son aquellos derivados de ácidos que contienen un átomo de nitrógeno (el grupo imido, N-H) unido a un carbono carbonílico. Los más importantes derivados de las imidas son: los cloruros de imidoácidos, los imidoéteres y las amidinas (Klages, 2005). Las imidas generalmente son sintetizadas a partir de amoníaco o desde una amina primaria y algún ácido carboxílico o anhídrido acético. Las más conocidas son la Succinimida y la Ftalimida (Figura 4). La ftalimida es un intermediario en la preparación del colorante ftalocianina (McMurry, 2008).



**Figura 4. Estructura química de imidas: a) succinimida y b) ftalimida (Tomado de McMurry, 2008).**

Las imidas cíclicas se pueden preparar por calentamiento de diácidos con amoníaco (Figura 5).



**Figura 5. Reacción de producción de una imida cíclica (Tomado de klages, 2005).**

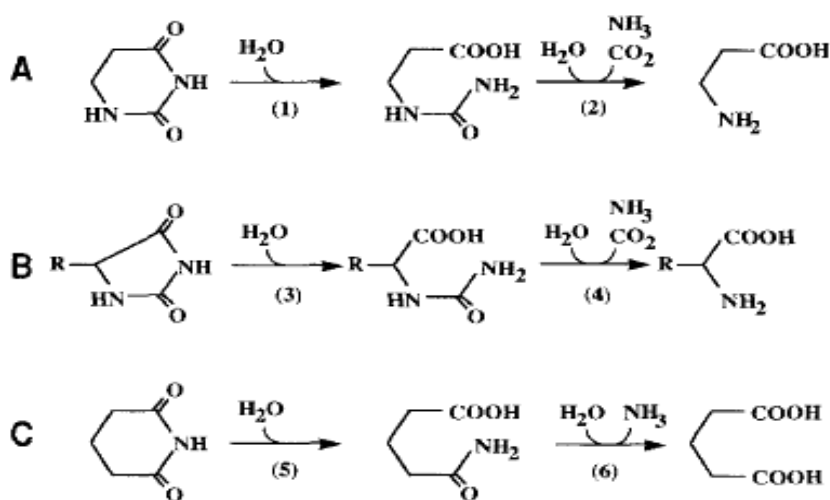
Las imidas no cíclicas se nombran como derivados de azano (NH<sub>3</sub>) o amina. Muchas imidas son monómeros usados en la preparación de políimidas. En la base nitrogenada uracilo y tímína se encuentra el grupo funcional imida, la cual participa en los puentes de hidrógeno de

Watson-Crick, donde el nitrógeno de la imida es un donador de hidrógeno y el oxígeno carbonílico es un aceptor (IUPAC, 2006).

### 1.2.2. Superfamilia de imidasas

La mayoría de las enzimas que hidrolizan imidas comparten limitadas secuencias homólogas y catalizan diferentes sustratos (Ya-Wei *et al.*, 2010). Algunas enzimas como la superfamilia de imidasas, son similares en secuencia pero diferentes en función (Figura 6). Estas son llamadas enzimas relacionadas a dihidropirimidinasas. Las imidasas catalizan una variedad de imidas y se clasificaron en cuatro grupos (Lee *et al.*, 2003):

1. Imidasas: Enzimas de mamíferos con actividad de imidasas (dihidropirimidinasas).
2. Proteínas relacionadas en secuencia: proteínas con alta homología (70-90%) a imidasas pero sin actividad relacionada a la imidasa.
3. Enzimas idénticas en función: enzimas con secuencias de 30 – 40 % de identidad a imidasas (hidantoinasa y dihidropirimidinasas de microorganismos).
4. Enzimas relacionadas en función: enzimas que catalizan la hidrólisis de grupos funcionales idénticos (imidas) pero usan diferentes sustratos. Estas enzimas tienen secuencias con baja identidad a imidasas.



**Figura 6. A) Hidrólisis de dihidropirimidinas. B) Producción de aminoácidos a partir de sustituidos DL-5 de hidantoina, C) Hidrólisis del ciclo de imidas. 1. Dihidropirimidinasas; 2. B-ureidopropinasa; 3. hidantoinasa; 4. Ácido N-carbamoilamino amidohidrolasa; 5. Imidasa; 6. Amidasa (Tomado de Sylatk *et al.*, 1999).**

### 1.2.3. Dihidropirimidinasas

La dihidropirimidinasas es la segunda enzima en el desglose de las bases de pirimidinas, cataliza la degradación del dihidrouracilo y la dihidrotimina al ácido  $\beta$ -ureidopropiónico y  $\beta$ -ácido ureidoisobutírico, respectivamente y puede hidrolizar 5-hidantoínas monosustituidas (Lin *et al.*, 2005).

Esta enzima es importante en el metabolismo de los seres humanos, donde:

1. La Dihidropirimidinasas es responsable del catabolismo de los análogos de la pirimidina que se utilizan como fármacos, como el 5-fluorouracil, que se utiliza en el tratamientos de tumores y como un agente cardioprotector.
2. La enzima se encuentra en un nivel más alto en los tumores sólidos que en los tejidos normales.
3. Defectos en la dihidropirimidinasas y otras enzimas que participan en la degradación de la pirimidina, pueden llevar a trastornos neurológicos a causa de concentraciones anormales de los neurotransmisores de  $\beta$ -alanina y  $\beta$ -aminoisobutírate (Syldatk *et al.*, 1999).

### 1.2.4 Aplicación de imidasas

Las imidasas se utilizan para la producción de ácidos orgánicos, también como herramientas novedosas para la síntesis enzimática de compuestos quirales. Estos incluyen aminoácidos no naturales, el piruvato, y el ácido 3-carbamoil- $\alpha$ -Picolínico, los cuales son elementos necesarios para síntesis de antibióticos semi-sintéticos, pesticidas y aditivos alimentarios. Se ha demostrado que las imidasas participan en el metabolismo de la pirimidina y en la bioconversión de ácidos orgánicos (Shi *et al.*, 2007).

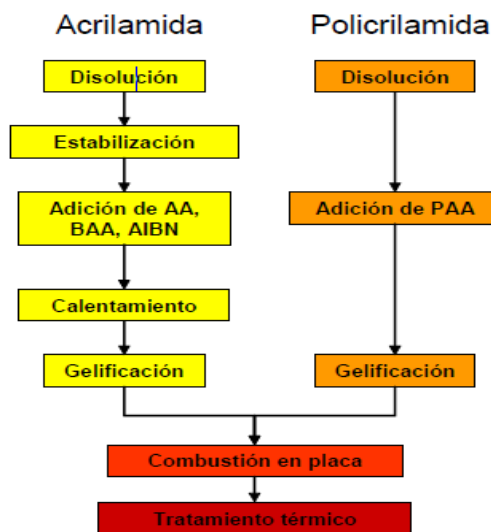
El mayor conocimiento en las imidasas podría ser de interés farmacéutico. Los métodos de producción *in vitro* pueden ser útiles, por ejemplo, en la investigación de la evolución metabólica del fármaco sobre la base de análogos de la pirimidina o en la selección de inhibidores. Información sobre la estructura 3-D de las dihidropirimidinasas también puede ser útil en el diseño de inhibidores o en la predicción de la hidrólisis de nuevos fármacos basados en análogos de dihidropirimidinas (Syldatk *et al.*, 1999).

Como se mencionó anteriormente, las imidasas tienen preferencia por compuestos xenobióticos como acrilamida o poli-acrilamida, la cual se utiliza para diferentes procesos, como por ejemplo, en el tratamiento de aguas residuales.



### 1.3. Poliacrilamidas

Las poliacrilamidas (PAMs) son polímeros formados básicamente por monómeros o subunidades de acrilamida. El proceso de gelificación de la poliacrilamida es ligeramente diferente partiendo de acrilamida (Figura 7). No se utiliza iniciador ya que el proceso de entrecruzamiento de las cadenas se inicia con la humectación del material. En menos de seis horas, el conjunto de partículas hidratadas e independientes que se han dispersado, pasa a ser una única identidad con consistencia elástica (Capdevila, 2007).



**Figura 7. Esquema simplificado de los procesos de síntesis con AM y PAM (Tomado de Capdevila, 2007)**

La acrilamida (AM) se utiliza en todo el mundo en la producción de poliacrilamida de alto peso molecular o de copolímeros, especialmente con compuestos insaturados de amonio cuaternario (copolímeros catiónicos) o ácido carboxílico o sulfónico (copolímeros aniónicos). El polímero y copolímero son aplicados en el tratamiento de lodos como floculantes, como modificador de la viscosidad en el proceso de recuperación del petróleo, en la industria como aglutinantes, como agentes de enlace en el proceso de fundición de arena. También son muy usados en el procesamiento de textiles y en la producción de adhesivos, cintas y geles, incluidos geles para realizar electroforesis (NMX-AA-137-SCFI-2007).

Además la poliacrilamida (PAM) ha demostrado mejorar las propiedades físicas y la estabilidad de agregados en varios tipos de suelo. La PAM es un polímero floculante usado en el agua de riego para controlar la erosión del suelo al mejorar la retención de agua (Caesar-TonThat *et al.*, 2008).

### **1.3.1. Clasificación de poliacrilamida**

Las poliacrilamidas se clasifican en:

- A) Aniónicas: se producen a partir del monómero de acrilamida y de un monómero aniónico, siendo los más comunes el acrilato de sodio y el acrilato de amonio.
- B) No iónicas: Se preparan partiendo del monómero de acrilamida. Generalmente tienen una ligera carga aniónica debido a su tendencia a hidrolizarse durante la polimerización, por lo que varían en su débil carga aniónica y en su grado de polimerización.
- C) Catiónicas: Se producen por la copolimerización de monómero de acrilamida y un monómero acrílico catiónico.

Las poliacrilamidas aniónicas, catiónicas y no iónicas se emplean en el tratamiento de agua para facilitar la remoción de material coloidal y partículas finas en suspensión. Su uso resulta efectivo para la remoción de color y turbidez cuando se usan junto con sales metálicas. Las poliacrilamidas se usan en la corriente principal de agua durante su clarificación y filtración, donde usualmente refuerzan la acción de sales metálicas para coagular/flocular. También se usan en corrientes secundarias de agua: a) en asentamiento y adelgazamiento de lodos de clarificación y aguas de lavado y b) deshidratado de lodos, donde usualmente se usan sólo como floculantes (NMX-AA-137-SCFI-2007).

### **1.3.2. Acrilamida**

La acrilamida se emplea en la fabricación de papel, la extracción de metales, la industria textil, la obtención de colorantes, la síntesis de poliacrilamidas para filtros de los tratamientos municipales de suministro de agua y en otros procesos industriales como aditivos cosméticos, técnicas analíticas científicas y para el acondicionamiento de suelos como hidrogeles que absorben cientos de veces su peso en soluciones acuosas (García-López & Alfaro-Macedo, 2007).

#### **1.3.2.1. Toxicidad**

La acrilamida y la N-N metilendiácridamida poseen una alta toxicidad. Ambas pueden producir efectos nocivos sobre el sistema nervioso, bajo exposición prolongada. El envenenamiento por esta sustancia puede provocar insensibilidad en las extremidades, entumecimiento, pérdida de

reflejos, etc. Se ha demostrado que induce cáncer y desórdenes reproductivos en animales de laboratorio. La absorción de la acrilamida se produce rápidamente a través de la piel. Dado que la acrilamida tiende a sublimar, se pueden inhalar sus vapores con la consiguiente intoxicación (Capdevila, 2007).

Así mismo estudios efectuados en animales machos y hembras han demostrado que la acrilamida a una concentración de 0.5-5 mg/Kg/día causa trastornos en la fertilidad (Tyl & Friedman, 2003). Las ratas macho tratadas desarrollan mesotelioma testicular y tumores en la tiroides y las hembras tumores en la tiroides y en las mamas. Por otro lado, en estudios sobre los efectos del potencial hepatotóxico, se observó que a una dosis de 100 mg/Kg (Benitez *et al.*, 2004) de acrilamida se afecta la viabilidad del tejido hepático. También se ha demostrado experimentando que la acrilamida tiene actividad cancerígena en ratas de laboratorio. La acrilamida es tóxica en las células somáticas y germinales y tiene el potencial de inducir daños hereditarios a nivel genético y cromosómico. Por su potencial cancerígeno en ratas, la Agencia Internacional de Cáncer (IARC) la clasificó como un probable cancerígeno para los seres humanos y la ubicó en la clasificación 2A (García-López & Alfaro-Macedo, 2007).

La naturaleza hidrofílica de la acrilamida sugiere la posibilidad de formación de aductos neurotóxicos con grupos nucleofílicos, como los que posee la guanina o los grupos sulfidrilos. Además esta formación de aductos con grupos tioles puede ser la responsable de los efectos carcinogénicos y de trastornos en la fertilidad. En los seres humanos, el riesgo más importante por acrilamida es la neurotoxicidad. La exposición a altas dosis de esta sustancia provoca cambios en el sistema nervioso central (SNC), mientras que la exposición prolongada a bajas dosis da como resultado neuropatía periférica con o sin complicaciones sobre el SNC. La literatura muestra que la acrilamida puede provocar mutaciones en el código genético. Asimismo, las recombinaciones inducidas de ADN pueden interferir con el proceso de replicación genética, lo que favorece la formación de tumores (Moreno *et al.*, 2007).

Los resultados en roedores y primates impulsaron a la Comisión de expertos de la FAO/OMS a establecer un nivel máximo permitido de ingesta en humanos que no causa efectos adversos (0.5mg/kg/día), el cual no produce la neuropatía; se estimó además la ingesta crónica permitida en 0.001 mg/kg/día (García-López & Alfaro-Macedo, 2007).

### **1.3.3. Contaminación por poliacrilamida**

La poliacrilamida es capaz de trasladarse a través de diferentes tipos de suelo bajo diferentes condiciones. En su mayor parte se consideran solubles en agua, pero en ciertas condiciones se puede unir a partículas como la arcilla. Una vez unida, la poliacrilamida es biodegradada a CO<sub>2</sub>

y NH<sub>3</sub>; no se ha reportado liberación del monómero. Aunque la poliacrilamida no es tóxica, el polímero puede tener residuos de acrilamida. Estos residuos pueden oscilar entre 0,05 y 5,0% del producto final después de la polimerización. La acrilamida es absorbida por todas las vías de exposición y también se puede trasladar a través de varios tipos de suelo y llegar a los acuíferos profundos. Por lo tanto, el uso de poliacrilamida como agente espesantes puede resultar en contaminación de las aguas superficiales y sistemas subterráneos por poliacrilamida. Una vez en estos sistemas la poliacrilamida puede degradarse a acrilamida, causando una preocupación potencial para la salud (Smith *et al.*, 1996).

Con el desplazamiento de la tecnología en China, grandes cantidades de PAM se descargan en el medio ambiente y en aguas residuales, por la extracción de petróleo. En promedio la concentración de PAM en las aguas residuales de extracción de aceite es típicamente 0.03-0.1 g/L. PAM en general es considerada como no tóxica, mientras su monómero acrilamida es tóxico para los nervios periféricos. Muchos informes indican que la PAM se degrada a acrilamida cuando se calienta o es expuesta a la radiación ultravioleta debido a la escisión de las cadenas de PAM en lugar de desunir las partes. La falta de información fiable se ha sometido en varias ocasiones a desarrollar programas de seguridad. En comparación con la degradación de PAM, no hay datos fisicoquímicos de la biodegradación de la acrilamida. En presencia de enzimas adecuadas, un consorcio de cepas bacterianas puras de manera eficiente puede degradar la PAM por la descomposición del esqueleto principal de la cadena de carbono. Desafortunadamente, hay escasa información sobre degradación de la PAM por los microorganismos. Se conoce que algunos microorganismos del suelo pueden usar PAM como fuente de nitrógeno en vez de fuente de carbono (Wen *et al.*, 2009).

## 2. ANTECEDENTES

La biorremediación depende de la introducción del microorganismo capaz de degradar los contaminantes tóxicos (Prabu & Thatheyus, 2007). En particular, el agua doméstica y de tratamiento de aguas residuales utiliza la poliacrilamida como floculante para espesar y deshidratar los lodos de depuración para el control de la erosión y la mejora de la estructura del suelo (Haveroen *et al.*, 2005).

### 2.1. Poliacrilamida

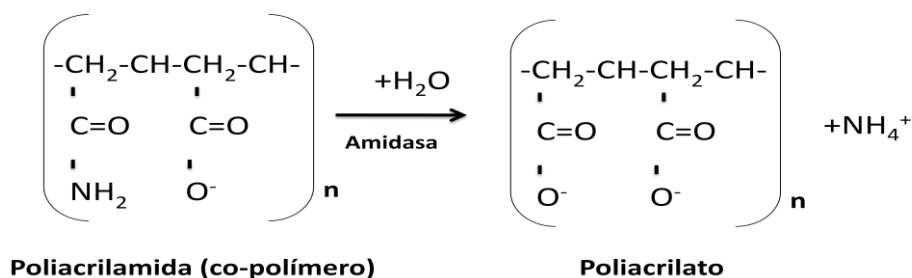
Las Poliacrilamidas en su mayor parte se consideran solubles en agua; la cual es biodegradada a CO<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub>, aunque la liberación de la acrilamida no se ha reportado (Smith *et al.*, 1996).

Una extensa revisión concluye que la poliacrilamida puede actuar como fuente de carbono solo cuando la poliacrilamida es de bajo peso molecular (Campos *et al.*, 2008). Bao *et al.* (2010) reporto que la parte amida de la poliacrilamida no puede ser utilizada por los microorganismos, pero la principal cadena de carbonos puede ser degradada. Por otro lado los microorganismos pueden utilizar la poliacrilamida como fuente de nitrógeno; las bacterias hidrolizan el grupo amido pero son incapaces de romper la cadena principal.

Se ha demostrado que *Bacillus cereus* y *Bacillus flexu*, aislados de los lodos activados y del suelo en un campo petrolero que había sido contaminado por PAM durante un período prolongado, degradan poliacrilamida. Ambas cepas crecieron en un medio compuesto por 0.060 g/L de PAM como la única fuente de carbono y la glucosa con una concentración inferior a 0.2 g/L, puede ser utilizada como co-metabolismo del sustrato con PAM. Los grupos amidos de la cadena principal del PAM fueron eliminados por estos bacilos y otros productos de la degradación de PAM se forma más que la producción de acrilamida (Wen *et al.*, 2009)

También se ha reportado enzimas extracelulares que depolimerizan las poliacrilamidas. Las amidasas extracelulares producen una deaminada poliacrilamida formando amonio que puede ser transportado al interior de la célula como fuente de nitrógeno (Figura 8). De la misma forma se reporta bacterias que reducen sulfatos en presencia de poliacrilamida y pueden estimular la metanogénesis (Haveroen *et al.*, 2005).

Por otro lado cultivos puros de *Azomonas macrocytogenes* y *Pseudomonas spp.* demostraron crecer en poliacrilamida como única fuente de nitrógeno (Haveroen *et al.*, 2005).



**Figura 8. Representación de la poliacrilamida. Reacción de poliacrilamida a poliacrilato por una amidasa (Tomada de Haveroen, 2005)**

El uso generalizado y la descarga indiscriminada de acrilamida y poliacrilamida han dado lugar a la contaminación del suelo y agua. La alta toxicidad crónica de AM la convierte en un contaminante no deseado en el agua potable. Además, el amoníaco y el oxígeno disuelto en el medio son productos de la biodegradación de acrilamida, la cual produce daños al ambiente en el agua, promoviendo el crecimiento de algas y causa daño directo a los seres humanos, por lo que se ha dado en los últimos años mucha atención a eliminar la acrilamida en aguas residuales (Wang & Lee, 2007).

Muchos microorganismos son capaces de utilizar la acrilamida como fuente de carbón y nitrógeno. La aclimatación de los microorganismos mejora el índice de biodegradación. Se ha reportado que una degradación completa de acrilamida en agua de río, a una concentración de 10-20 ppm ocurre alrededor de 12 días cuando los microorganismos no están adaptados al compuesto, al adaptarse las bacterias degradan el compuesto en dos días (Prabu & Thatheyus, 2007).

Diversas bacterias aeróbicas incluyendo el género *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, y *Xanthomonas*, son capaces de usar la acrilamida como fuente de carbono y energía para su crecimiento (Wampler & Ensign, 2005). Muchos investigadores han aislado bacterias que pueden tolerar altas concentraciones de acrilamida. Pocas bacterias han sido reportadas en la literatura que puedan degradar más de 1 g/L. *Bacillus cereus* es capaz de degradar acrilamida a una concentración de 3 g/L (Shukor *et al.*, 2009a). Por otro lado se aisló un microorganismo capaz de crecer en acrilamida bajo condiciones foto-heterotróficas pero pobremente en condiciones aerobias y anaerobias con oscuridad. La acrilamida fue degradada a acrilato (Wampler & Ensign, 2005)

La desnitrificación por bacterias es generalmente considerada como un resultado de la respiración anaeróbica de nitratos. Varias fuentes de carbono se utilizan como sustratos en condiciones anaeróbicas para la desnitrificación. Sin embargo, la disponibilidad de acrilamida para este proceso no se ha investigado ampliamente (Wang & Lee, 2007).

Nuevas enzimas son sintetizadas para degradar la acrilamida. Las principales enzimas del metabolismo de la acrilamida son enzimas que no se requieren durante el crecimiento; estas

enzimas son inducidas en presencia de acrilamida. La degradación de acrilamida por microorganismos se inicia con la deamidación de acrilamida y se produce acrilato y esto lo realizan diversas amidasas de bacterias (Wampler & Ensign, 2005). La acrilamida es degradada por los microorganismos en condiciones aeróbicas capaces de producir amidasas (Prabu & Thatheyus, 2007). En la tabla 2 se hace referencia de los microorganismos aislados que utilizan la poliacrilamida o acrilamida como fuente de carbono o nitrógeno para su crecimiento.

**Tabla 2. Microorganismos que utilizan la poliacrilamida o acrilamida como fuente de carbono o nitrógeno.**

Microorganismos	Referencia
<i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Nocardia rhodochrous</i> , <i>Bacillus sphaericus</i> , <i>Pseudomonas putrefaciens</i> y <i>Rhodococcus sp</i>	Prabu & Thatheyus, (2007).
<i>Bacillus cereus</i>	Shukor <i>et al.</i> , (2009a).  Bao <i>et al.</i> (2010)
<i>Ralstonia eutropha</i> TDM-3	Wang & Lee, 2007
<i>Pseudomonas sp. strain</i> DRYJ7	Shukor <i>et al.</i> , (2009b)
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Wampler y Ensign, (2005)
<i>Azomonas macrocytogenes</i> , <i>Pseudomonas spp</i>	Haveroen <i>et al.</i> , (2005).
<i>Bacillus cereus</i> y <i>Bacillus flexu</i>	Wen <i>et al.</i> , (2009)

## 2.2. Imidasas

En una red ecológica la biotransformación de la materia orgánica durante el compostaje se debe principalmente a las actividades de las enzimas de los microorganismos de primer nivel que conduce a la mineralización. Las enzimas en el compostaje se pueden clasificar como enzimas intracelulares, que se encuentran dentro de células vivas o en el suelo o abono y en enzimas extracelulares liberadas de microorganismos que catalizan la degradación de las sustancias poliméricas extracelulares (Peláez *et al.*, 2004).

Se ha reportado que las esterases, amidasas, imidasas, epoxi-hidratasa, u otros procesos de hidrólisis aumentan la afinidad a compuestos xenobióticos en contacto con el agua (Gutiérrez *et al.*, 2007).

*Blastobacter sp.*, es una bacteria gram negativa, no móvil, no forma esporas, aerobia, no fermentativa. Esta bacteria se ha utilizado para el análisis de enzimas involucradas en la transformación de ureidos cíclicos (Ogawa *et al.*, 1996). *Balstobacter sp. A17 p-4*, aislada del suelo, muestra actividad metabólica de dihidropiridimina e hidantoína (Ogawa *et al.*, 1997).

Ogawa et al. (1997), reportaron que las imidasas coexisten con la dihidropirimidinasa en *Blastobacter sp.* La enzima tiene un peso molecular alrededor de 30-40 KDa y se ha encontrado en *Blastobacter sp. A17p-4*, *Alcaligenes eutrophus 112R4*, y *Pseudomonas putida YZ-26*.

El gen de la imidasa de la cepa *Alcaligenes eutrophus 112R* fue el primero que se expresó en *Escherichia coli*. Después el gen se aisló de *Pseudomonas putida Y-26*, esta imidasa posee un peso molecular de 36 KDa y de acuerdo a la secuencia de aminoácidos muestra un 78% de identidad con la enzima de *Alcaligenes eutrophus* y un 80% con *Blastobacter sp.* La enzima purificada muestra una alta afinidad y actividad por los siguientes sustratos: succinimida, dihidrouracilo, hidantoína y maleimida (Shi et al., 2007).

La imidasa de *Pseudomonas putida YZ-26* consiste en 293 aminoácidos, es una nueva imidasa con cuatro subunidades como holo-enzima y peso molecular de 35 KDa. La enzima es diferente a las imidasas de mamíferos. La imidasa de esta bacteria es dependiente de metales para mejorar su actividad (Shi et al., 2010).

Imidasas de diferentes mamíferos, como en el caso de las imidasas de rata, y bovina son enzimas homotetrámicas de masas moleculares de 226 kDa y 215 kDa, respectivamente. Ambas enzimas contienen 1 mol  $Zn^{2+}$  / subunidad, determinado por absorción atómica. También se reportó que todas las dihidropirimidasas conocidas son homodímeros u homotetrámeros de bacterias y tienen masas moleculares de 50 kDa y 60 kDa (Lin et al., 2005).

### 2.3. Lombricomposta

Desde el punto de vista de las cadenas tróficas, el compostaje de los residuos sólidos orgánicos implica tres niveles de organismos consumidores. El primer nivel (que son los descomponedores) es compuesto por la microfauna, principalmente actinomicetos, bacterias y hongos; y macrofauna, que incluye escarabajos ácaros, lombrices de tierra, dípteros en diferentes etapas. Todos estos organismos degradan la materia orgánica.

Las lombrices de tierra acumulan muchos microcontaminantes orgánicos lipofílicos del entorno del suelo circundante, no sólo a través de la absorción pasiva de la fracción disuelta a través de la pared del cuerpo, sino también por captación intestinal durante el paso del suelo a través del intestino. Esta acumulación se incrementa cuando la concentración en su ambiente aumenta. Las actividades de las lombrices contribuyen a la biodegradabilidad de los contaminantes orgánicos, tales como los ftalatos, fenantreno, fluoranteno, antraceno y benzo(a) pireno en un plazo de 11 semanas (Schaefer et al., 2005).



Numerosos factores antimicrobianos incluyendo la lisozima, proteínas con actividad hemolítica y citolítica, han sido identificados y caracterizados en las lombrices *E. foetida* (Silerová *et al.*, 2007). *E. foetida* tiene el potencial de eliminar grandes cantidades de hidrocarburos aromáticos policíclicos de los suelos, pero es necesario realizar más trabajos para esclarecer los mecanismos implicados (Contreras-Ramos *et al.*, 2006).

El efecto de las lombrices de tierra es probablemente indirecto, resultante de la actividad microbiana. Los alcanos y algunos hidrocarburos pueden servir como única fuente de carbono y energía para los microorganismos que interactúan con la lombriz (Schaefer *et al.*, 2005). Se ha encontrado una diversidad de bacterias en el tracto digestivo de la lombriz como: actinomicetos, hongos y bacterias. Las lombrices de tierra pueden regular directamente la población de microorganismos por la gran cantidad que consumen de suelo. Esto conduce a eliminación de algunos microorganismos y proliferación de otros en el tracto digestivo, en la drilosfera y en las heces de las lombrices (Byzov *et al.*, 2007).

La identificación de las bacterias del tracto digestivo, requiere de condiciones de crecimiento similares a la del intestino de la lombriz y del uso de técnicas como PCR para identificar las bacterias asociadas (Brito-Vega & Espinosa-Victoria, 2009)

**Tabla 3. Técnicas usadas para la identificación de microorganismos del tracto digestivo de lombrices.**

Lombriz	Técnica	Bacteria	Referencias
<i>Onychochaeta borincana</i>	Microscopía electrónica y PCR	Identificado <i>Bacillus</i> con 7 diferentes especies y $\beta$ -bacterias hemolíticas	Valle-Molinares <i>et al.</i> (2007)
<i>Eisenia fetida</i>	PCR-16s rARN	Identificadas 22 bacterias	Hyun-Jung <i>et al.</i> (2004)
<i>Onychochaeta borincana</i>	Microscopía electrónica	Identificadas 7 bacterias del genero de <i>Bacillus sp.</i>	Méndez <i>et al.</i> (2003)
<i>Lumbricus rubellus</i>	Técnica de Hibridación <i>in situ</i> fluorescente y 16s rARN	Identificadas: <i>Acidobacteria</i> ,	Singleton <i>et al.</i> (2003)
<i>Lumbricus rubellus</i>	Técnica de Hibridación <i>in situ</i>	<i>Paenibacillus</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Actinobacteria</i> y <i>Bacillus megaterium</i> entre el tracto digestivo.	Fischer <i>et al.</i> (1995)

(Tomado de Brito-Vega y Espinosa-Victoria, 2009)

Se han realizado diversas investigaciones sobre la composición de la flora microbiana en el intestino de las lombrices de tierra y han aislado más de 50 bacterias del canal digestivo de lombrices y se encontró que nueve de ellas no eran nativas del suelo (Molinares, 2006).

Hyun-Jung *et al.* (2004) aislaron bacterias del intestino de la lombriz bajo condiciones aeróbicas. Se observó que *Eisenia foetida* si está en contacto con suelo contaminado de una zona industrial, su flora microbiana se incrementa a 91 colonias de bacterias. Las colonias aisladas se clasificaron en 12 grupos y cada grupo fue dividido en otros grupos. Siendo: 6% *Aeromonas*, 3% *Agromyces*, 31% *Bacillus*, 1% *Bosea*, 6% *Gordonia*, 6% *Klebsiella*, 7% *Microbacterium*, 2% *Nocardia*, 10% *Pseudomonas*, 19% *Rhodococcus*, 2% *Tsukamurella*, y 7% *Streptomyces*. *Bacillus* fue el grupo dominante.

**Tabla 4. Presencia de microorganismo entre los intestinos de diferentes especies de lombrices**

Especies de lombrices	No. De especies de bacterias	Hábitat	Referencias
<i>Eisenia fetida</i>	91	Residuos industriales	Hyung-Jung <i>et al.</i> (2004)
<i>Lumbricuss rubellus</i>	95	Suelo agrícola	Furlong <i>et al.</i> (2002)
<i>Lumbricuss rubellus</i>	-	-	
<i>Octalasion montonum</i>	-	Suelo de bosque	Kritufek <i>et al.</i> (1993)
<i>Eisenia lucens</i>	-	Suelo de bosque	Szabó <i>et al.</i> (1976)

(Tomado de Brito-Vega y Espinosa-Victoria, 2009)

**Tabla 5. Diversidad bacteriana identificada en las paredes intestinales de lombrices.**

Lombrices	Hábitat	Bacterias	Referencias
<i>Onychochaeta boricana</i>	Suelo por materia orgánica	<i>Bacillus sp.</i> <i>Bacillus thuringiensis</i>	Valle-Molinares <i>et al.</i> (2007)
<i>Onychochaeta boricana</i>	Suelo de bosque	<i>Bacillus sp.</i>	Méndez <i>et al.</i> (2002)
<i>Eisenia fetida</i>	Suelo de zona industrial	<i>Klebsiella sp.</i> <i>Flavobacterium sp.</i> <i>Nocardia sp.</i> <i>Gordonia sp.</i> <i>Vibrio comma</i> <i>Clostridium welchii</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Mycobaterium sp.</i>	Hyun-Jung <i>et al.</i> (2004)
<i>Lumbricuss rubellus</i>	Agroecosistemas	<i>Azotobacter sp.</i> <i>Enterobacter sp.</i> <i>Pseudomonas sp</i> <i>Klebsiella sp</i>	Singleton <i>et al.</i> (2003)

(Tomado de Brito-Vega y Espinosa-Victoria, 2009)

En nuestro grupo de trabajo (López-Hernández, 2007) se identificaron bacterias aisladas del tracto digestivo de *Eisenia foetida* crecidas en una lombricomposta con lodos que contenían poliacrilamida. Las bacterias identificadas por la técnica de PCR 16s rARN, fueron:

<i>Aeromonas media</i>	<i>Branhamella,</i>
<i>Aromyces ulmi</i>	<i>Acinetobacter,</i>
<i>Bacillus pulmilus</i>	<i>Actinobacillus seminis,</i>
<i>Bosea thiooxidans</i>	<i>Veillonella,</i>
<i>Microbacterium aurum</i>	<i>Neisseria,</i>
<i>Nocardia asteroides</i>	<i>Micoplasma,</i>
<i>Rhodococcus opacus</i>	<i>Streptobacillus,</i>
<i>Streptomyces setonill</i>	<i>Cardiobacterium,</i>
	<i>Staphylococcus,</i>
	<i>Pediococcus,</i>
	<i>Gemella,</i>
	<i>Aerococcus,</i>
	<i>Streptococcus.</i>

Ninguna de estas bacterias fue identificada como productora de imidasas, por lo tanto el estudio se enfocó en la identificación de bacterias del tracto digestivo de la lombriz, capaces de producir enzimas de degradar poliacrilamida.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

En Lerma, Estado de México se generan alrededor de 70 toneladas diarias de lodos industriales que fueron floculados con poliacrilamida, los cuales son incinerados y deben ser estabilizados, pero al contener poliacrilamida que puede degradarse existe la posibilidad de producir altas concentraciones de acrilamida, que es tóxica y pueda ser absorbida por los cultivos vegetales, y conllevar a grandes riesgos en la salud de mamíferos. Una alternativa es que estos lodos pueden ser usados como sustrato para lombricomposta, ya se ha demostrado que el lombricomposteo es una técnica de biorremediación efectiva para dar tratamiento a lodos de aguas residuales, estabilizados con poliacrilamida. Algunos autores han comprobado que las lombrices acumulan en su cuerpo muchos contaminantes orgánicos e inorgánicos, esto aunado a que en su intestino contiene una flora bacteriana muy diversa, con capacidad de excretar enzimas que ayudan a degradar compuestos tóxicos.

Existe información acerca del lombricomposteo de biosólidos, pero hay muy pocos reportes acerca de la degradación de poliacrilamida en lodo o en suelo, es por tanto un tema novedoso ya que nadie ha reportado la actividad de imidasas en este tipo de medio. La presencia de estas enzimas nos daría la pauta a pensar que se están generando compuestos menos tóxicos como amonio y aminoácidos y por tanto no se estaría ocasionando daño al ambiente.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Evaluar la producción de imidasas de bacterias del tracto digestivo de *Eisenia Foetida*.

#### 4.1.1. Objetivos Específicos

- Aislar e identificar bioquímica y molecularmente las bacterias del tracto digestivo de *Eisenia Foetida*
- Evaluar el crecimiento de bacterias del tracto digestivo de *Eisenia foetida* en acrilamida y poliacrilamida.
- Evaluar la degradación de poliacrilamida o acrilamida por bacterias aisladas del tracto digestivo de *Eisenia Foetida*.
- Evaluar la actividad de imidasas producidas por bacterias del tracto digestivo de *Eisenia Foetida*.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Metodología general.



**Figura 9. Diagrama de flujo de la metodología general.**

- 1.- Se realizó el lombricomposteo a temperatura ambiente. Se utilizaron lodos mezclados con paja. Se tomaron las medidas posibles para evitar depredadores y se cuidaron las condiciones de la lombricomposta.
- 2.- Se realizó el aislamiento de las bacterias del tracto digestivo de *E. foetida*
- 3.- Se procedió a la identificación de las bacterias aisladas por pruebas bioquímicas y por técnicas de biología molecular.
- 4.- Se realizaron ensayos para evaluar la capacidad de crecimiento de las bacterias en acrilamida y poliacrilamida como única fuente de carbono.
- 5.- Se evaluó la capacidad de producción de imidasas por las bacterias aisladas y se midió la actividad enzimática durante el proceso de degradación del compuesto.

## 5.2. Metodología

### 5.2.1. Lombricomposta

*Eisenia foetida* se cultivó en una cama de suelo, donde se adicionaron los biosólidos industriales tratados con poliacrilamida, mezclados con paja al 15% y desechos de frutas al 25%, se adicionaron 130g de lombrices por cada Kg de biosólido. Se manejó una temperatura de 21°C, humedad del 70% a 80%, pH entre 7.5 a 8 y con baja luminosidad. La frecuencia de volteo fue de 4 días (Mendoza, 2008).

\* Los biosólidos fueron donados por Reciclagua S.A. de C. V. que se ubica en Lerma, Toluca, Edo. de México: la segunda zona industrial más importante del país. El croquis de la ubicación se puede observar en la Figura 10, así como el filtro prensa de donde fueron muestreados los biosólidos y posteriormente llevadas a la cama de lombricomposteo (Figura 11).

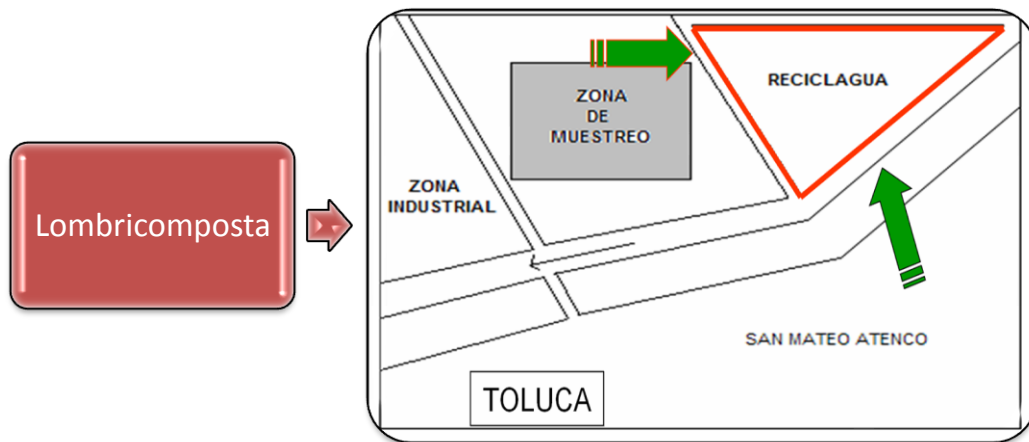
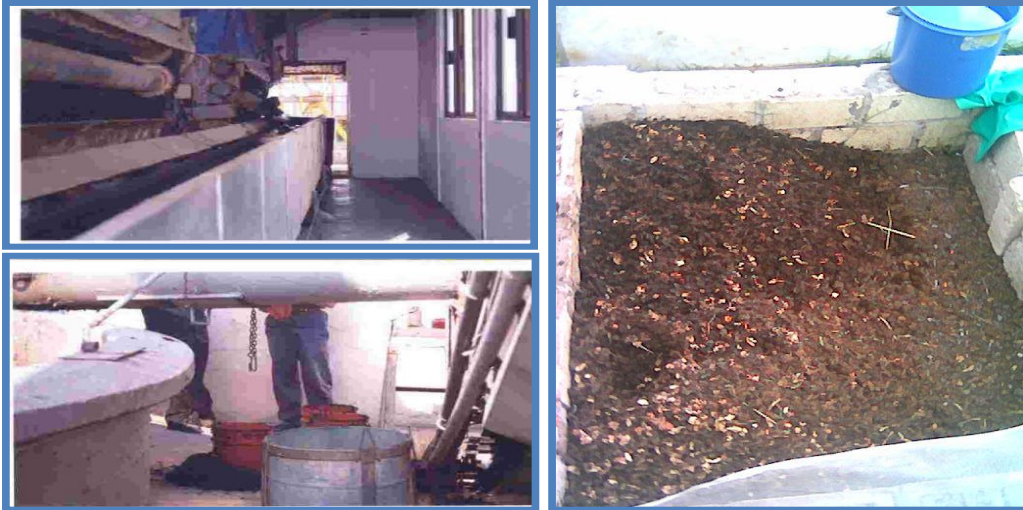


Figura 10. Zona de muestreo de biosólidos (Tomado de Guzmán, 2008)



**Figura 11. Obtención de lodos y preparación de lombricomposta**

### **5.2.2. Aislamiento de bacterias del tracto digestivo de *E. foetida***

Las lombrices se obtuvieron de la lombricomposta de biosólidos, y se les dio el siguiente tratamiento: se llevó a cabo un primer lavado con solución salina al 3% posteriormente un segundo lavado con la misma solución durante 10 minutos o hasta que se observara las heces fecales de la lombriz.

En tubos con solución salina estéril se realizaron diluciones hasta  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  del último lavado, mismas que fueron sembradas en medio TSA, agar seller y sanders por la técnica de extensión por varilla y estría cruzada, por duplicado a  $35^{\circ}\text{C}$  durante 24h, trascurrido ese tiempo se procedió a la selección de cepas aisladas por su morfología y fueron sembradas en tubos de 13/100 con medio TSA; estas fueron incubadas a temperatura ambiente, a las 24h de incubación se realizó la prueba de Gram para cada una de ellas y las cepas puras fueron almacenadas a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Así mismo se realizaron cultivos de estas bacterias aisladas en medios con acrilamida en las siguientes concentraciones 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.5 y 1 g/L, como fuente de carbono y única fuente de nitrógeno, con propósito de aislar las bacterias que crezcan en este compuesto (apartado 5.2.5.1).

### **5.2.3. Análisis macroscópico y microscópico de bacterias aisladas**

Para el análisis macroscópico de las cepas aisladas en medio de cultivo TSA en placas petri, incubadas a temperatura ambiente, durante 24 horas y 48 horas, se determinaron las



siguientes características: tamaño, forma, borde, color, elevación, luz reflejada y luz transmitida.

El análisis microscópico se determinó por medio de la prueba de Gram y posteriormente se observó al microscopio en el objetivo 100X.

#### **5.2.4. Identificación de las bacterias aisladas**

##### **5.2.4.1. Pruebas bioquímicas**

Para realizar las pruebas bioquímicas se resembraron las cepas aisladas con 24 horas de cultivo. Se usaron pruebas bioquímicas comerciales, BBL cristal para identificar bacterias gram (+) y API para bacterias gram (-).

###### *5.2.4.1.1. Bacterias Gram (+)*

Las pruebas bioquímicas de BBL CRYSTAL RGP ID contienen 29 sustratos enzimáticos y bioquímicos secos. Una suspensión bacteriana de  $2.3 \pm 0.15$  mL fue usado como inóculo para rehidratar los sustratos. Las pruebas se basan en la degradación de sustratos específicos detectados por sistemas de indicadores. La hidrólisis enzimática de sustratos fluorogénicos que contienen derivados de 4-metilumbeliferona o 7-amino-4-metilcoumarina, produce un incremento de fluorescencia que fácilmente es detectado con luz UV. Para la hidrólisis de sustratos cromogénicos, se produce un cambio de color que puede ser detectado visualmente.

Para realizar las pruebas bioquímicas por el kit, se usó colonias de bacterias aisladas en medio Agar Soya de un tiempo de 24 a 48 h. Con hisopos de algodón y de madera estériles, se preparó la suspensión del inóculo.

Procedimiento:

Solución del inóculo: KCl 7.5 g, CaCl<sub>2</sub> 0.5 g, Tricina N-[2-Hidroxi-1, 1-bis(hidroximetil)]metil] glicine 0.895 g, agua purificada a 1000 mL.

1. -Con los hisopos estériles se tomó una azada del medio de cultivo y se suspendió en el tubo de la solución del inóculo del kit y se agitó con el vortex por aproximadamente 10-15 s. La turbidez debe ser equivalente al estándar McFarlan No.2.
2. -Se vació el inóculo en los paneles del kit y movió para cubrir todos los pozos por el líquido. Se cubrieron los paneles y se incubaron por 4, 8 y 24 h. a 35-37°C

Todos los paneles fueron incubados cara abajo en una incubadora con 40.-60 % de humedad.

3.-Transcurrido este tiempo se procedió a leer dentro de los 30 min. Se leyó las columnas de la E a la J por luz normal, y de la A la D se usó luz UV.

#### *5.2.4.1.2. Bacterias Gram (-)*

La galería del sistema API 20 E se compone de 20 microtubos que contienen los substratos deshidratados. Los microtubos se inoculan con una suspensión bacteriana que reconstituye los tests. Las reacciones producidas durante el periodo de incubación se traducen en cambios de color espontáneo o revelado mediante la adición de reactivos.

Procedimiento:

- 1.- Con una pipeta se extrajo una colonia aislada del microorganismo y se realizó una suspensión en 5 mL de solución salina (1% de NaCl) o 5 mL de agua estéril.
- 2.- Se llenó con la suspensión de bacterias los tubos, no la cúpula (cada pocillo tiene un tubo y una cúpula, parte aerobia), de los pocillos CIT , VP, GEL con la suspensión de bacterias. Cubrir con parafina las cúpulas de los pocillos ADH, LDC, ODC, URE, H<sub>2</sub>S para obtener anaerobiosis.
- 3.- La tira de microtubos se colocó en su propia cámara húmeda de incubación. Previamente se agregó agua en los alvéolos de la cámara para proporcionar una atmósfera húmeda durante la incubación.
- 4.-Se incubó a 37 °C durante 18-24 h.
- 5.- Tras la incubación se anotaron los resultados inmediatos

#### **5.2.4.2. Técnicas de Biología Molecular**

##### *5.2.4.2.1. Extracción de ADN geonómico*

Se cultivaron las cepas en caldo nutritivo durante 24 horas a temperatura ambiente en agitación, se tomó una muestra de 1 mL del medio de cultivo. Para la extracción de ADN se utilizó el kit AxyPrep™ Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit.

El aislamiento de ADN genómico de bacterias por este kit se basa en la liberación eficiente del ADN genómico por un buffer de lisis, (Buffer G-A). Después se separó el ADN genómico de proteínas, polisacáridos y lípidos mediante una única fase de partición. El ADN genómico se purificó de la fase inferior por una columna con enlaces selectivos AxyPrep. Después se lavó sucesivamente con el Buffer tampón W1 y W2 para eliminar las impurezas residuales y las sales. El ADN genómico purificado de bacterias se eluyó en la columna AxyPrep en un buffer

Tris. Este kit es ideal para el rápido aislamiento de hasta 20 mg de ADN genómico de  $1,0 \times 10^9$  células bacterianas.

#### 5.2.4.2.2. Primers para PCR

Para la amplificación de gen 16s ARN se utilizaron iniciadores universales reportados por Edwards *et al.*, (1989). Los iniciadores abarcan las 9 regiones variables del gen.

**Tabla 6. Secuencia de Primers usados para la amplificación del gen 16srARN**

Primer	Posición	Secuencia	Referencia
8F	8-28	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'	Edwards <i>et al.</i> , 1989
1509R	1491- 1509	5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'	Edwards <i>et al.</i> , 1989

#### 5.2.4.2.3. Preparación de la reacción de PCR

La mezcla de reacción (mix) se realizó en baño de hielo. Se adicionó 2.5  $\mu$ L de Buffer de PCR (Invitrogen), 0.75  $\mu$ L de  $MgCl_2$  (Invitrogen), 0.5  $\mu$ L de dNTP's (Invitrogen), 7.5  $\mu$ L de BSA, 11.375  $\mu$ L de agua y posteriormente se le adicionó 0.125  $\mu$ L de la enzima Taq polimerasa (Invitrogen). Se colocaron alícuotas de 24 $\mu$ L de la mezcla en tubos eppendorf de 0.5  $\mu$ L. Para cada cepa se tomó 1  $\mu$ L de la muestra de ADN. Los tubos fueron colocados en el termociclador CORBETTE RESEARCH modelo PALM-CYCLER previamente programado como lo indica la tabla 8.

**Tabla 7. Concentraciones y volúmenes de los reactivos utilizados en la reacción de PCR**

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración final</b>
Buffer de PCR	10X
dNTPs	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	50 mM
Primer mix	10 mM
DNA templado	-
TAQ POLIMERASA	2.5 U/μL
dH <sub>2</sub> O	-
BSA	1 mg/mL

**Tabla 8. Programa para la reacción de PCR**

95°C	15 min.	} 33 ciclos
95°C	1 min.	
57°C	1 min.	
72°C	2 min.	
72°C	10 min.	
4°C	10 min	

Temperatura de primera desnaturalización del ADN 95°C.

Temperatura segunda desnaturalización del ADN 95°C

Temperatura de hibridación 57°C

Temperatura de polimerización 72°C

#### *5.2.4.2.4. Verificación de los fragmentos amplificados por PCR mediante electroforesis*

Terminado el tiempo de la programación del termociclador, se procedió a tomar 3µL de cada tubo y se mezcló con 3µL de Buffer de corrimiento y se cargó en gel de agarosa en amortiguador Tris-borato-EDTA (1X:Tris-borato 0.45M, EDTA 0.01M, pH 8.3).

La electroforesis se corrió a 90mV por 40 minutos con el marcador utilizado de 2000pb. Los fragmentos amplificados se mandaron a secuenciar a MacroGen Seúl, Corea.

#### *5.2.4.2.5. Identificación de Bacterias*

Para la identificación de las bacterias aisladas por ADN que se encuentran en el tracto digestivo, se utilizó la secuencia de los fragmentos amplificados (descrito en apartado 5.2.4.2.3) y se analizaron y compararon con las secuencias reportadas en el banco de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information) usando el programa SeaView, el cual es una multiplataforma de interface y gráficos para el alineamiento de múltiples secuencias y análisis filogenético.

#### *5.2.4.2.6. Análisis filogenético*

La relación filogenética de las bacterias identificadas se realizó alineando las secuencias obtenidas con las secuencias de la base de datos empleando el programa ClustalX2 para el alineamiento de las secuencias y el programa Mega 4 para crear los árboles filogenéticos, con el método de agrupamiento "Neighborjoining".

### **5.2.5. Ensayos de degradación de acrilamida y poliacrilamida**

#### **5.2.5.1. Medio con acrilamida**

Usando el medio mínimo reportado por Prabu & Thatheyus, (2007), se prepararon 100 mL del medio con diferentes concentraciones de acrilamida: 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.5 y 1 g/L. La formulación del medio mínimo sólido fue:

**Tabla 9. Composición del medio mínimo sólido (MNS)**

Compuesto	Concentración (g)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2
Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.05
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01
Agar	1.8
pH	7 ± 0.5

Los medios fueron inoculados con las bacterias aisladas, se incubaron a temperatura ambiente de 24 h a 48 h. Las bacterias que crecieron hasta una concentración de 0.5 g/L y 1 g/L, se resembraron en el medio sólido mínimo sin citrato (descrito en el apartado 5.2.5.1) con 1 g/L de acrilamida, se incubaron a temperatura ambiente de 24 h a 48 h.

#### **5.2.5.2. Medio líquido para degradación de acrilamida y poli(acrilamida)**

Aquellas bacterias que crecieron hasta una concentración de 1 g/L de acrilamida, se resembraron en el medio líquido mínimo (descrito en el apartado 5.2.5.1, sin citrato) con 3 g/L de acrilamida y 0.1 g/L de glucosa. Los cultivos se agitaron a 120 rpm y se incubaron a temperatura ambiente.

Para los cultivos de poli(acrilamida) se utilizó el medio líquido mínimo con 1 g/L de poli(acrilamida) y 0.05 g/L de glucosa. Los medios se agitaron a 120 rpm y se incubaron a temperatura ambiente.

#### **5.2.6. Análisis de la actividad enzimática**

La actividad enzimática se determinó en la fracción del medio con DL-hidantoína y por un método espectrofotométrico, con el siguiente protocolo:

Se tomó 2 mL del cultivo (muestra) y se centrifugó a 12 000 x g durante 1 minuto. La mezcla de reacción (750 µL) contenía 100 mM de D, L-hidantoína en 50 mM Tris - HCl (pH 8,0) y una cantidad apropiada de la enzima o muestra (250 µL). La mezcla se incubó a 60 ° C durante 3

horas y la reacción se detuvo mediante la adición de 100 µL de TCA al 12% (w / v). Se agregó 125 µL de p-dimetilaminobenzaldeido (10% w/v en HCl 6 M) y 500 µL de agua destilada. Después se centrifugo a 12.000 x g durante 3 min. La actividad fue medida a 430 nm. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de la enzima que hidroliza 1 µmol/min del sustrato en las condiciones del ensayo.

#### **5.2.7. Determinación de glucosa**

El consumo de glucosa se determino por el método de DNS (Rodríguez y Martínez, 2006). (Anexo 1).

#### **5.2.8. Determinación de acrilamida**

Para medir la degradación de acrilamida se utilizó un método espectrofotométrico. Se realizó una curva tipo y la concentración de acrilamida se midió a 210 nm (Anexo 9).

#### **5.2.9. Determinación de amonio**

Una forma de medir la degradación de poliacrilamida es con la formación de amonio, a mayor degradación mayor concentración de amonio

El amonio de la muestra se determina con  $K_2SO_4$  0.5 M, midiendo la intensidad del color verde esmeralda desarrollado, que se forma. En esta reacción se usa un catalizador (nitroprusiato de sodio) para aumentar la intensidad de color, y un agente quelante (EDTA), previene la precipitación de cationes divalentes y trivalentes como hidróxidos. El mecanismo para el desarrollo de color se da en tres pasos. En el primer paso, el  $NH_3^+$  reacciona con el hipoclorito para formar la monocloramina ( $NH_2Cl$ ). La monocloramina reacciona con el salicilato para formar la benzoquinona monoamina, que junto con el salicilato van a dar la coloración tinta del indofenol.

Procedimiento:

Se tomó 3 mL del medio; se adicionó 7 ml de  $K_2SO_4$  0.5M. Se agregó 1 ml de EDTA disódico y se mezcló por inversión. Posteriormente, se agregó 4 ml de Nitroprusiato-Salicilato y se mezcló por inversión. Se adicionó 5 ml de agua destilada, 2 ml de buffer de hipoclorito (Anexo 9) y se mezcló por inversión. Se agregó 3 ml de agua destilada y se mezcló. Se calentó a baño maría

30 minutos a 40 °C y se dejó enfriar a temperatura ambiente (de 10 a 25 minutos). Se procedió a leer a 667 nm (Black, 1995).

#### **5.2.10. Crecimiento bacteriano**

El crecimiento de las bacterias durante los ensayos de degradación se midió por densidad óptica a 600 nm (Monge-Amaya *et al.*, 2008; Wen *et al.*, 2009).

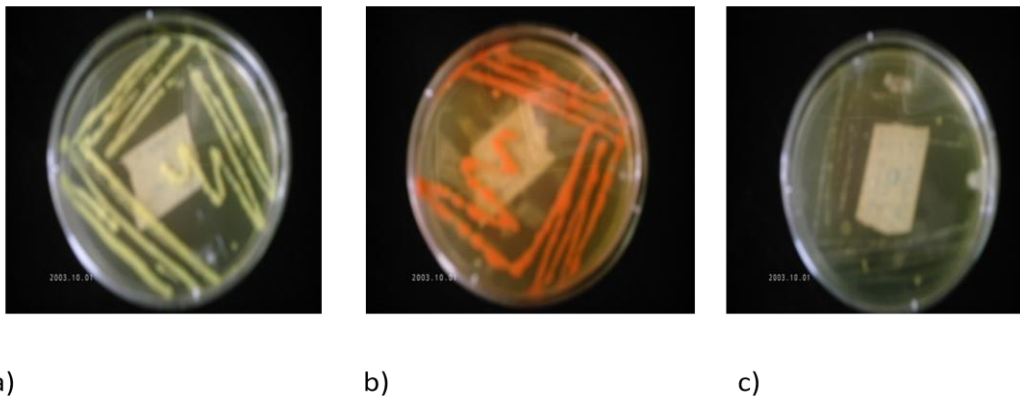
Para conocer los gramos de biomasa producida, se realizó una curva tipo de Peso seco (Abs vs g biomasa). Se tomó una muestra a diferentes tiempos, se determinó su densidad óptica y peso seco. Para el peso seco, se tomó 1 mL de un cultivo estándar de cada bacteria a diferentes tiempos y se filtraron con membranas de 0.22 micrometros de Polisulfona Micron-Pes. Las membranas se secaron 24 horas antes a 60°C, se midió el peso de cada membrana y posteriormente se filtro la muestra, las membranas se secaron a 60°C por 24 horas, transcurrido este tiempo se midieron.



## 6. RESULTADOS

### 6.1. Aislamiento de bacterias del tracto digestivo de *E. foetida*

El aislamiento de las bacterias de *E. foetida* para localizar cepas productoras de imidasas se realizó a partir de lombrices provenientes de una lombricomposta elaborada con biosólidos y desechos orgánicos. Una forma de obtener las bacterias del tracto digestivo es a partir del excremento de *E. foetida*, por medio de lavados de esta con solución salina estéril, lo que permite que la lombriz deseche sus heces fecales. Con este procedimiento se considera que se aíslan solo un porcentaje de las bacterias que se encuentran dentro del intestino. Es probable que el número de microorganismo sea mayor si se obtienen directamente del intestino. Hyun-Jung *et al.* (2004), aislaron bacterias del órgano digestivo de *E. foetida* y reportaron 91 especies de bacterias de lombrices del suelo industrial de Corea; estas bacterias se incubaron en un periodo de 7 días, ya que son de lento crecimiento. En este estudio se obtuvieron 42 bacterias aisladas del tracto digestivo de *E. foetida* de acuerdo al protocolo mencionado en el apartado 5.2.2 (Anexo 2). En la figura 12 se muestra el cultivo de algunas bacterias: 4-2, 11 A y 8R, como se puede observar se logró el cultivo puro de estas bacterias.



**Figura 12. Bacterias aisladas del tracto digestivo de *E. foetida* en medio Agar TSA: a)4-2, b) 11 A y c) 8 R.**

### 6.2. Análisis macroscópico y microscópico de bacterias aisladas

Para llevar a cabo el aislamiento de de dichas bacterias se observó la morfología entre las colonias aisladas de cepas obtenidas (Anexo 2). En la tabla 10 se muestran las características generales de las 42 bacterias aisladas. La mayoría resultó translúcida, de forma circular o irregular y con tamaño de radio igual o menor a 0.2-0.5 cm.

Además se obtuvieron crecimiento de colonias de color naranja, amarillo, rojo y blanco, con elevación convexa o plana y con borde ondulado o entero.

En la Figura 13 (a) se muestra un ejemplo de la morfología de las bacterias 11 A y 10cc 1 encontradas, ambas son de color blanco, forma irregular, borde ondulado, luz reflejada mate, luz transmitida translúcida y tamaño 0.5 cm. Además el crecimiento en tubos de las bacterias fue en forma filiforme y equimulado (Figura 13 b).

**Tabla 10. Morfología colonial de las bacterias aisladas**

Tamaño cm	Color	Forma	Elevación	Borde	Luz Reflejada	Luz Transmitida
0.5	Naranja	Irregular	Convexa	Ondulado	Brillante	Translúcida
0.2	Amarilla	Circular	Plana	Entero	Mate	
	Rojo					
	Blanca					



a)

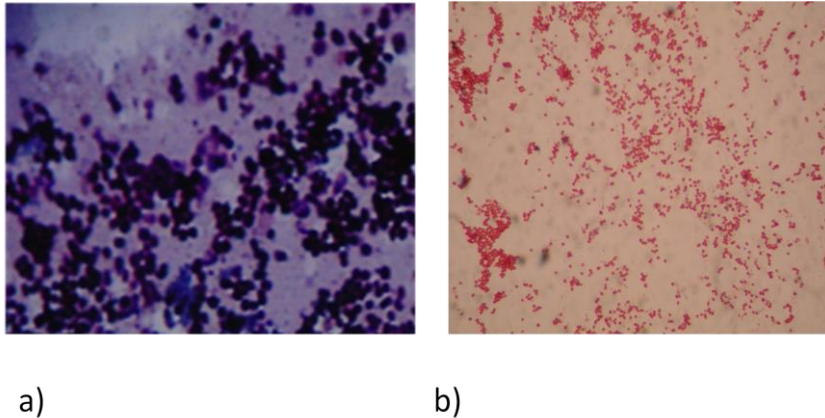


b)

**Figura 13. a) Morfología colonial de la bacteria 11 A y 10 cc1, b) Aislamiento en tubos y morfología colonial.**

Para el análisis microscópico se realizó la prueba de Gram (Anexo 3). De las 42 bacterias el 39 % corresponde a cocos Gram positivos, el 29% a cocos Gram negativos, el 15 % a bacilos Gram negativos, 12 % a bacilos Gram positivos y el 5% a cocobacilos Gram negativos.

En la Figura 14 se muestran las imágenes de microscopía con el objetivo 100X realizadas a las bacterias 4-1 y 8R' las cuales tienen forma de coco.



**Figura 14. Microscopía en el objetivo 100X de dos bacterias aisladas. a) 4-1 coco Gram positivo y b) 8 R' coco Gram negativo**

### 6.3. Crecimiento en acrilamida

Un método para aislar y discriminar las bacterias que no crecen en presencia de poliacrilamida fue elaborar medios de cultivo con acrilamida como fuente de nitrógeno y fuente de carbono. En este estudio se utilizó primero acrilamida por su mayor efecto tóxico en comparación a la poliacrilamida. Se sembraron las 42 bacterias aisladas en el medio mínimo sólido (apartado 5.2.5.1) con diferentes concentraciones de acrilamida de 0.01 a 1 g/L, lo que permitió conocer la concentración de acrilamida que estas bacterias podían tolerar y se propuso como un medio selectivo para identificar a las bacterias aisladas que podían utilizar y degradar acrilamida o poliacrilamida.

En la tabla 11 se muestran algunos ejemplos del crecimiento de las bacterias en placa. Como se puede observar en los resultados de la tabla, las bacterias 4-1, 4-2, 9-1, 10-cc-2 y 7B son las que crecieron y toleraron hasta 1 g/L de acrilamida. Las bacterias 6-1, 6-2, 7N, 8R', 11-A-1, 11-ana-1 y 11-ana-2 presentaron crecimiento hasta 0.5 g/L de acrilamida. La bacteria 13 AST, no creció en ningún medio con acrilamida. Con estos resultados se descartaron aquellas bacterias que no crecieron en el medio, porque no degradaban la acrilamida. Las bacterias que crecieron hasta 0.5 g/L y 1 g/L se sembraron en el mismo medio mínimo pero sin citrato, se utilizó la acrilamida como única fuente de carbono. Se eligieron las cepas que toleraron la mayor concentración de acrilamida (1 g/L), se les realizaron pruebas para determinar si

producían la enzima imidasa, debido a que era posible que estas bacterias sintetizaran la enzima para degradar la acrilamida y usar la como fuente de carbono.

**Tabla 11. Crecimiento de bacterias aisladas del tracto digestivo de *E. foetida* a diferentes concentraciones de acrilamida como única fuente de carbono y nitrógeno.**

Bacteria	Concentración de acrilamida (g/L)							
	0.01	0.02	0.05	0.10	0.15	0.20	0.50	1
4-1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
4-2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
6-1	+++	+++	+++	+++	+++	++	+-	-
6-2	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-
7N	+++	+++	+++	+++	+++	++	+-	-
7B	+++	+++	++	++	++	++	++	++
8R'	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++
9-1	+++	+++	+++	+++	+++	++	+-	-
10-cc-2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
11-A-1	+++	+++	++	++	++	+-	+-	-
11 ana	-	++	++	++	++	+-	+-	---+
11 ana 2	++	+-	+-	-	+-	+-	---+	-
13 AST	+-	-	+-	-	+-	-	-	-

+++ crecimiento

++ crecimiento moderado

+- crecimiento bajo

---+ crecimiento muy bajo

- no hay crecimiento

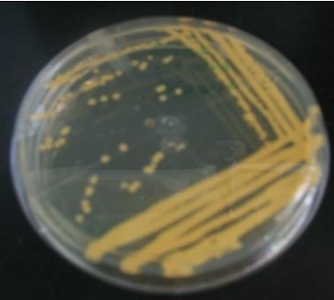


De las 42 bacterias aisladas que se cultivaron a las diferentes concentraciones de acrilamida, solo 36 bacterias crecieron a las concentraciones de 0.5 g/L y 1 g/L, y de estas bacterias solo 24 crecieron a 1g/L de acrilamida como única fuente de carbono.


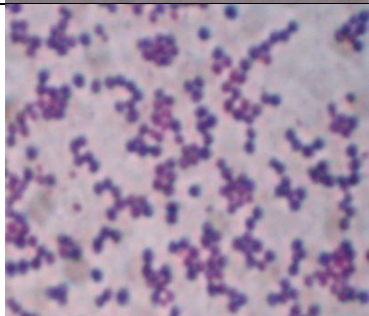

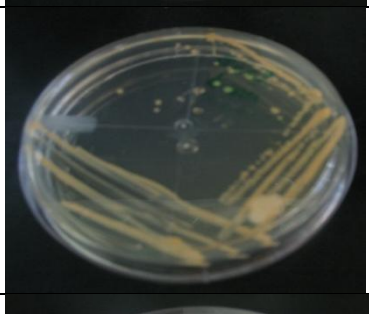

En la tabla 12 se pueden observar los resultados de las tinciones y morfología microscopía de estas. Se encontraron 10 cocos Gram positivos, 1 coco Gram negativo, 5 bacilos Gram positivos, 5 bacilos Gram negativos y 2 cocobacilo Gram negativo. La mayoría de las muestras (11) resultaron ser cocos y la mayoría cepas gram (positivo).


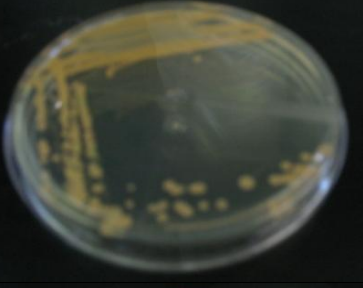
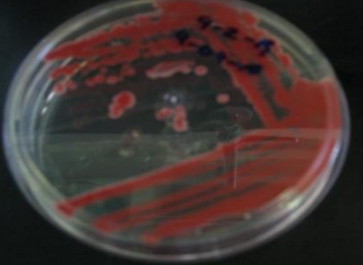
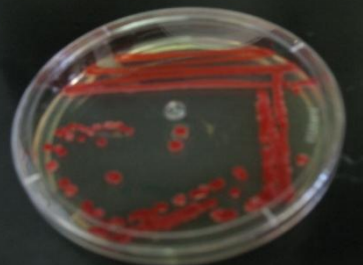

Algunas bacterias utilizan la poliacrilamida como fuente de carbono y nitrógeno, como *Arthrobacter sp.* que es Gram positivo con forma de bacilo; *Nocardia* que es bacilo Gram



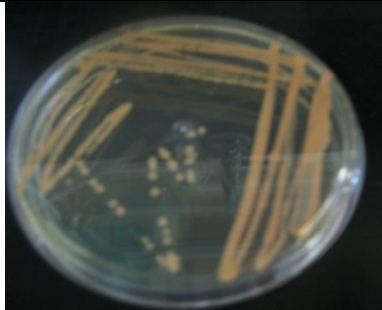
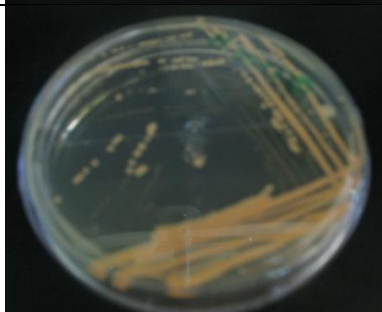

positivo; *Rhodococcus sp.* Gram positivo con forma de coco y *Azomonas macrocytogene* que es de morfología oval a esférica (cocos) (Haveroen *et al*, 2005; Prabu & Thatheyus, 2007). Esta morfología de las bacterias reportadas es similar a la que se puede observar en nuestros resultados de la prueba de Gram y morfología microscópica de las bacterias. Para identificar los microorganismos aislados fue necesario utilizar técnicas convencionales y técnicas de biología molecular, de esta forma conocer género y especie y determinar si es alguna bacteria que ya esté reportada como degradadora de poli(acrilamida). Estas bacterias no se han reportado que sintetizan las imidasas, pero existe una posibilidad de que las bacterias puedan ser productoras de la enzima, ya que se conoce que esta enzima puede degradar compuestos xenobióticos (acrilamida o poli(acrilamida)).

**Tabla 12. Características de morfología colonial y microscópica en medio sólido (1 g/L de acrilamida) de las bacterias aisladas.**


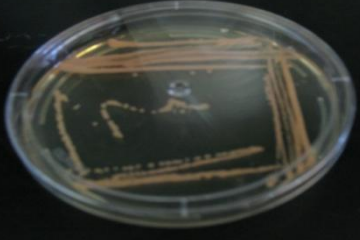



Bacteria	Forma	Gram	Morfología colonial o microscópica
1-1-2 col ama	Coco	positivo	
4-1	Coco	Positivo	
4-2	Coco	Positivo	

5 col ana	Bacilo	Positivo	
5 col ama	Coco	Positivo	
5 col b/blanca	Bacilo	Negativo	
5 col b/ana	Bacilo	Negativo	
5 col blanca 2	Bacilo	Positivo	

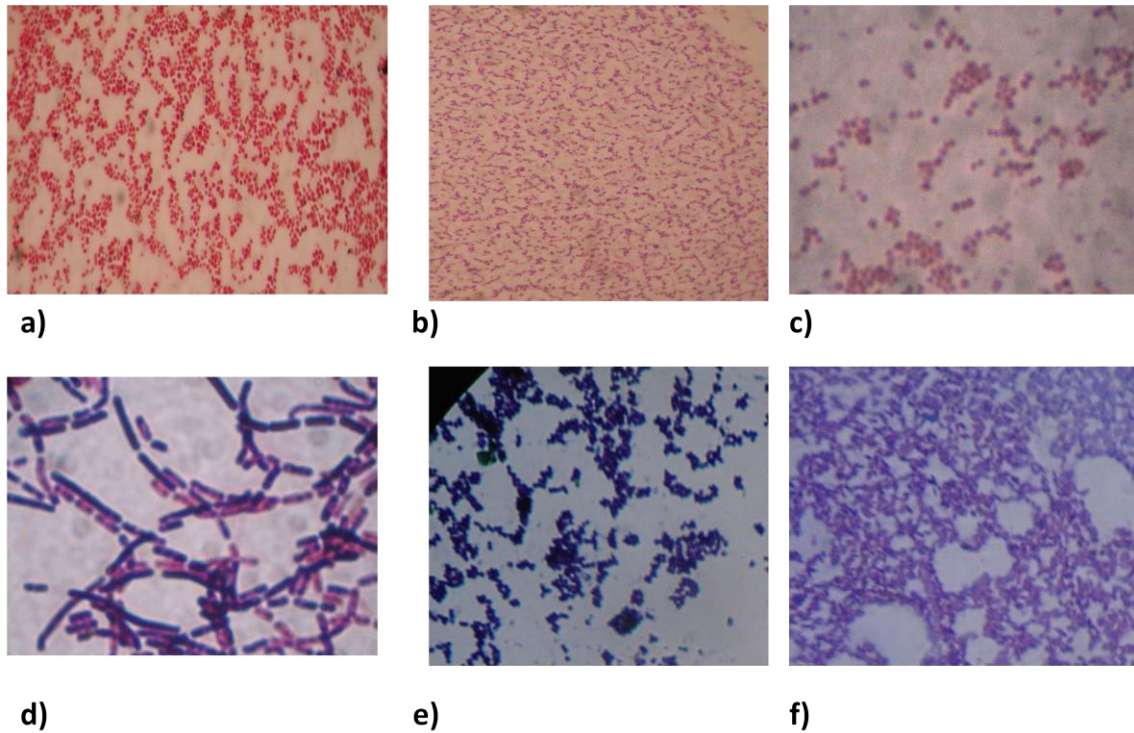
7 Rosa	Coco	Positivo	
7 B	Coco	Positivo	
9-2 R	Coco	Negativo	
9-2 ana	Bacilo	Negativo	
9-1	Bacilo	Negativo	

10 cc 1	Bacilo	Positivo	
10 cc 2	Bacilo	Positivo	
11	Coco	Positivo	
11 ana 1 (1)	Coco	Positivo	
11 ana 2*	Coco	Positivo	



11 ana 2*a/blanca	Bacilo	Positivo	
11 ana 2*b/ana	Coco	positivo	
15-1-R	Cocobacilo	Negativo	
15-1-B	cocobacilo	negativo	
15-2	Bacilo	negativo	

En la Figura 15 se muestra la morfología microscópica de algunas bacterias aisladas del tracto digestivo de *E. foetida* que crecieron hasta 1 g/L de acrilamida (Anexo 5). La fila superior muestra bacterias Gram negativas (Figura 15 a-c) y en la fila inferior bacterias Gram positivas (Figura 15 d-f). Se puede notar que la mayoría son cocos.



**Figura 15. Morfología microscópica de los microorganismos. Gram negativos: a) 9-2 (coco negativo); b) 15-1-R (cocobacilo negativo); c) 7 Rosa (coco negativo). Gram positivas: d) 11 ana 2\* a/blanca (bacilo positivo); e) 4-2 (coco positivo); f) 11 ana 2\* (coco positivo)**

#### 6.4. Identificación de las bacterias aisladas

##### 6.4.1. Pruebas bioquímicas

Se identificaron por pruebas bioquímicas las 24 bacterias aisladas del tracto digestivo de *E. foetida* que crecieron a una concentración de 1 g/L de acrilamida. Se utilizaron pruebas comerciales BBL Crystal Rapid para bacterias Gram positivas y API 20E para bacterias Gram negativas y después se analizaron los resultados en los programas correspondientes a cada una de estas pruebas (Anexo 4).



**Figura 16. Ejemplo de las pruebas bioquímicas (API) realizadas a las bacterias aisladas.**

La caracterización bioquímica permitió identificar las bacterias solo a nivel de género de las cepas 5 col blanca blanca, 5 col ana y 7 rosa; y en el caso de 1-1-2- col ama, 4-1, 4-2, 3-2, 7B, 9-1, 9-2 ana, 9-2-R, 11 ana 2\* ana blanca, 11 ana 2\* anab/ana, 11 ana 1 (1), 15-1-R, 15-1-b, 5 col ama, 10 cc1, 10 cc 2, 11, 15-2, 5 col blanca 2, 5 col b/ana y 11 ana 2\* hasta nivel de especie.

Los resultados de la identificación bioquímica se muestran en la tabla 12.

**Tabla 13. Identificación de bacterias por pruebas bioquímicas**

<b>Bacterias Gram (-)</b>	<b>Bacterias Gram (+)</b>
<b><i>Serratia marcescens</i></b>	<b><i>Micrococcus luteus</i></b>
<b><i>Serratia odorifera</i></b>	<b><i>Paenibacillus sp.</i></b>
<b><i>Xanthomonas maltophilica</i></b>	<b><i>Bacillus subtilis</i></b>
<b><i>Alcaligenes spp.</i></b>	<b><i>Kocuria sp.</i></b>
	<b><i>Kocuria rosea</i></b>
	<b><i>Staphylococcus sciuri</i></b>
	<b><i>Bacillus pumilus</i></b>
	<b><i>Bacillus cereus</i></b>

De estas bacterias identificadas por pruebas bioquímicas se conoce que *Bacillus pumilus* (Hyung-Jung *et al.*, 2004), *Serratia marcescens* (Brito-Vega & Espinosa-Victoria, 2009) y *Staphylococcus* (López-Hernández, 2007) se han aislado del tracto digestivo de *E. foetida*

crecidas en suelos de zonas industriales. Por otro lado, se sabe, que *Bacillus cereus* (Wen *et al.*, 2009) y *Xhantomonas* (Wampler & Ensign, 2005) utilizan la acrilamida como fuente de carbono o nitrógeno para su crecimiento. También, *Bacillus pumilus*, y el género *Kocuria sp.* y *Paenibacillus sp.* fueron aisladas de suelo tratado con poliacrilamida (Caesar-TonThat *et al.*, 2008).

Como las bacterias aisladas presentaron un crecimiento lento (alrededor de 48-72 h) a temperatura ambiente, y la reacción de las pruebas bioquímicas están diseñadas para desarrollarse en un tiempo de cuatro horas para BBL Crystal y para API de 24 horas, existe la posibilidad de que el crecimiento lento de las bacterias resultara en falsos positivos o falsos negativos, por lo que fue necesario realizar la caracterización molecular para corroborar los datos obtenidos por la identificación bioquímica.

#### 6.4.2. Identificación molecular de bacterias

Se amplificó el gen 16S rARN mediante PCR para la identificación molecular de las 24 bacterias que crecieron hasta 1 g/L de acrilamida, se identificaron por técnicas de biología molecular. Como se puede observar en el Figura 17 la mayoría de las secuencias de los fragmentos amplificados fueron de aproximadamente 1500pb (Anexo 6).

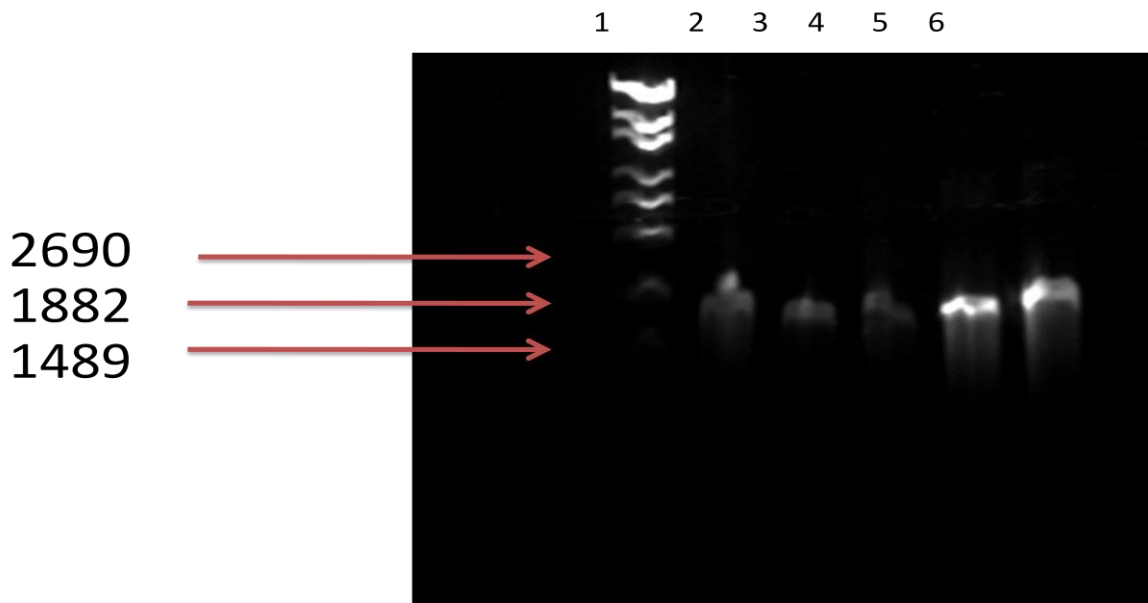


Figura 17. Gen 16S rARN amplificado por PCR. Carril 1. Marcador de pares de bases, del carril 2 a 6 diferentes bacterias, 2) 1-1-2 col ama, 3) 4-1, 4) 10cc2, 5) 11ana2\*a/blanca y 6). 15-1-R

Las secuencias se compararon y analizaron con la base de datos de la NCBI con el programa BLAST, estas presentaron una similitud de 93 a 99%. Los resultados permitieron identificar el género y especie de casi todas las bacterias aisladas. Las bacterias identificadas fueron las siguientes:

- *Kocuria rosea*
- *Serratia marcescens*
- *Planomicrobium sp.*
- *Arthrobacter oxydans*
- *Microbacterium schleiferi*
- *Bacillus subtilis*
- *Arthrobacter luteolus*
- *Crocino bacterium jeju*
- *Micrococcus yunnanensis*
- *Bacillus weihenstephanensis*
- *Paenibacillus sp.*
- *Kocuria sp.*
- *Janibacter melonis*

En la tabla 14 se comparan los resultados de la caracterización bioquímica y molecular de las bacterias aisladas

**Tabla 14. Resultados de caracterización bioquímica y molecular de las bacterias aisladas**

Bacteria Gram (+)	Pruebas bioquímicas	Factor de identidad	Pruebas de biología molecular	Similitud (%)
11	<i>Staphylococcus sciuri</i>	0.99	<i>Kocuria rosea strain AN-3 16S</i>	96%
7 Rosa	<i>Kocuria sp</i>	0.96	<i>Planomicrobium sp. TPD46</i>	97%
11 ana 2* ana blanca	<i>Bacillus cereus</i>	0.99	<i>Bacillus Weihenstaphanensis</i>	99%
11 ana 2* ana/b ana	<i>Micrococcus luteus</i>	0.97	<i>Kocuria sp. BS-1 16S</i>	93%
10 cc1	<i>Bacillus subtilis</i>	0.98	<i>Bacillus subtilis</i>	99%
11 ana 1	<i>Kocuria rosea</i>	0.99	<i>Kocuria sp. S26-8 16S</i>	99%
1-1 2 col ama	<i>Micrococcus luteus</i>	0.99	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	99%
5 col ama	<i>Micrococcus luteus</i>	0.90	<i>Janibacter melonis</i>	97%
11 ana 2*	<i>Kocuria rosea</i>	0.99	<i>Kocuria sp. HY15(2010) 16S</i>	100%
5 col ana	<i>Paenibacillus sp.</i>	0.98	<i>Paenibacillus sp. J16-10</i>	99%

5 col blanca 2	<i>Bacillus pumilus</i>	0.99	<i>Arthrobacter oxydans</i>	99%
5 col blanca blanca	<i>Alcaligenes spp.</i>	0.17	<i>Crocino bacterium jejui</i>	99%
4-1	<i>Micrococcus luteus</i>	0.98	<i>Arthrobacter luteolus</i>	98%
4-2	<i>Micrococcus luteus</i>	0.98	<i>Arthrobacter luteolus</i>	99%
10 cc2	<i>Bacillus subtilis</i>	0.99	<i>Bacillus subtilis</i>	99%
7B	<i>Micrococcus luteus</i>	0.96	<i>Planomicrobium sp. TPD46</i>	99%
<b>Bacteria Gram (-)</b>	<b>Pruebas bioquímicas</b>	<b>Factor de identidad</b>	<b>Pruebas de biología molecular</b>	<b>Similitud (%)</b>
15 1 R	<i>Serratia marcescens</i>	0.95	<i>Serratia marcescens</i>	99%
15 1 b	<i>Serratia marcescens</i>	0.97	<i>Serratia marcescens strain B4</i>	100%
15-2	<i>Serratia marcescens</i>	0.95	<i>Serratia marcescens strain PS1</i>	99%
9-2 R	<i>Serratia marcescens</i>	0.95	<i>Serratia marcescens strain N2.4</i>	96%
5 col b/ana	<i>Xhantomonas maltophilia</i>	0.86	<i>Microbacterium schleiferi</i>	99%
9 2 ana	<i>Serratia marcescens</i>	0.95	<i>Serratia marcescens strain C3</i>	98%
9-1	<i>Serratia marcescens</i>	0.97	<i>Serratia marcescens</i>	99%

Los resultados que se obtuvieron de la identificación por pruebas bioquímicas y por técnicas de biología molecular son diferentes para algunas bacterias, esto probablemente se debe al lento crecimiento de las bacterias como se menciona anteriormente. Aún así se obtuvo la comprobación de cuatro bacterias Gram positivas y seis bacterias Gram negativas. También se pudo observar que se tenían seis bacterias gram negativas y nueve bacterias gram positivas que eran la misma especie y ocho bacterias (gram positivas y negativas) que eran diferentes especies.

Por lo tanto se identificaron 13 bacterias del tracto digestivo que crecen en presencia de acrilamida, las cuales fueron: *K. rosea*, *Kocuria sp.*, *Planomicrobium sp.*, *B. subtilis*, *B. weihenstephanensis*, *A. oxydans*, *A. luteolus*, *Micrococcus yunnanensis*, *J. melonis*, *C. jejui*, *Microbacterium schleiferi*, *S. marcescens* y *Paenibacillus spp.*

Algunas características de estas bacterias son: *A. oxydans* es una bacteria corineforme, tiene una variabilidad en su gram (puede ser positiva o negativa) con un metabolismo oxidativo,

crece a una temperatura de 37°C (Wauters *et al.*, 2000). *B. weihenstephanensis* es gram positiva, anaerobia facultativa, pertenece al grupo de *Bacillus cereus*, pero es diferenciada de esta última por su capacidad de crecer en condiciones aeróbicas y de agitación (Sabine *et al.*, 1998). *Planomicrobium sp.* bacteria gram positiva, motil, aerobia, temperatura de crecimiento de 12-43°C (Jung-Hoon *et al.*, 2001). *S. marcescens* es cocobacilo gram negativo saprofito, motil, produce un pigmento rojo, su temperatura de crecimiento es de 5 a 40°C (Silva, 2010). *B. subtilis* bacteria gram positiva, forma esporas y su temperatura de crecimiento es de 37°C. *K. rosea* crece a 26°C, es gram positiva con forma de coco. *Paenibacillus sp.* crece a 37°C, bacteria gram positiva que forma esporas y causa infecciones bacterémicas en humanos (Rieg *et al.*, 2010). *Microbacterium* es clasificado dentro de *Corynebacterium*, bacteria corineforme que produce un pigmento de color amarillo, gram positiva y crece a temperaturas de 25 – 40 °C (Soo *et al.*, 2007). *J. melonis* es una bacteria gram positiva, con colonias color crema, crece a una temperatura de 37-40 °C con forma de coco (Yoon *et al.*, 2004).

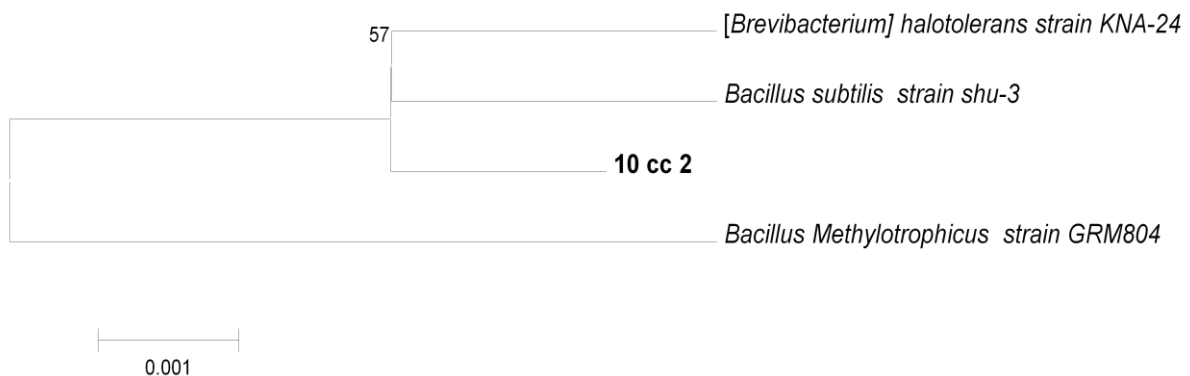
Byzov *et al.* (2007), mencionan que *A. oxydans*, *B. subtilis*, y las bacterias del género *Kocuria*, *Microbacterium* y *Paenibacillus sp.* se encuentran dentro del intestino de las lombrices como *E. foetida*. Por otro lado *S. marcescens* se aisló del intestino de esta lombriz (Hyung-Jung *et al.*, 2004; Brito-Vega & Espinosa-Victoria, 2009). También se ha aislado el género de *Microbacterium*, *Arthrobacter* y *Bacillus* de *E. foetida* que creció en una lombricomposta con bisólidos industriales tratados con poliacrilamida (López-Hernández, 2007).

Por otro lado se ha reportado que *Bacillus*, producen imidasas o utilizan la poliacrilamida como una fuente de carbono o nitrógeno. *Bacillus sphaericus*, *Bacillus flexu* y *Bacillus cereus* son bacterias capaces de biodegradar poliacrilamida (Prabu & Thatheyus, 2007; Wen *et al.*, 2009). Otros reportes indican a *Bacillus stearothermophilus* y *Pseudomonas stutzeri* como productoras de la enzima imidasa; describiéndolas como enzimas homodímeras con masas moleculares de 102 kDa y 115 kDa (Syldatk, 1999).

No se ha reportado que las bacterias *K. rosea*, *Kocuria sp.*, *Planomicrobium sp.*, *B. subtilis*, *B. weihenstephanensis*, *A. oxydans*, *A. luteolus*, *Micrococcus yunnanensis*, *J. melonis*, *C. jejui*, *Microbacterium schleiferi*, *S. marcescens* y *Paenibacillus sp* producen la enzima imidasa o degraden acrilamida o poliacrilamida.

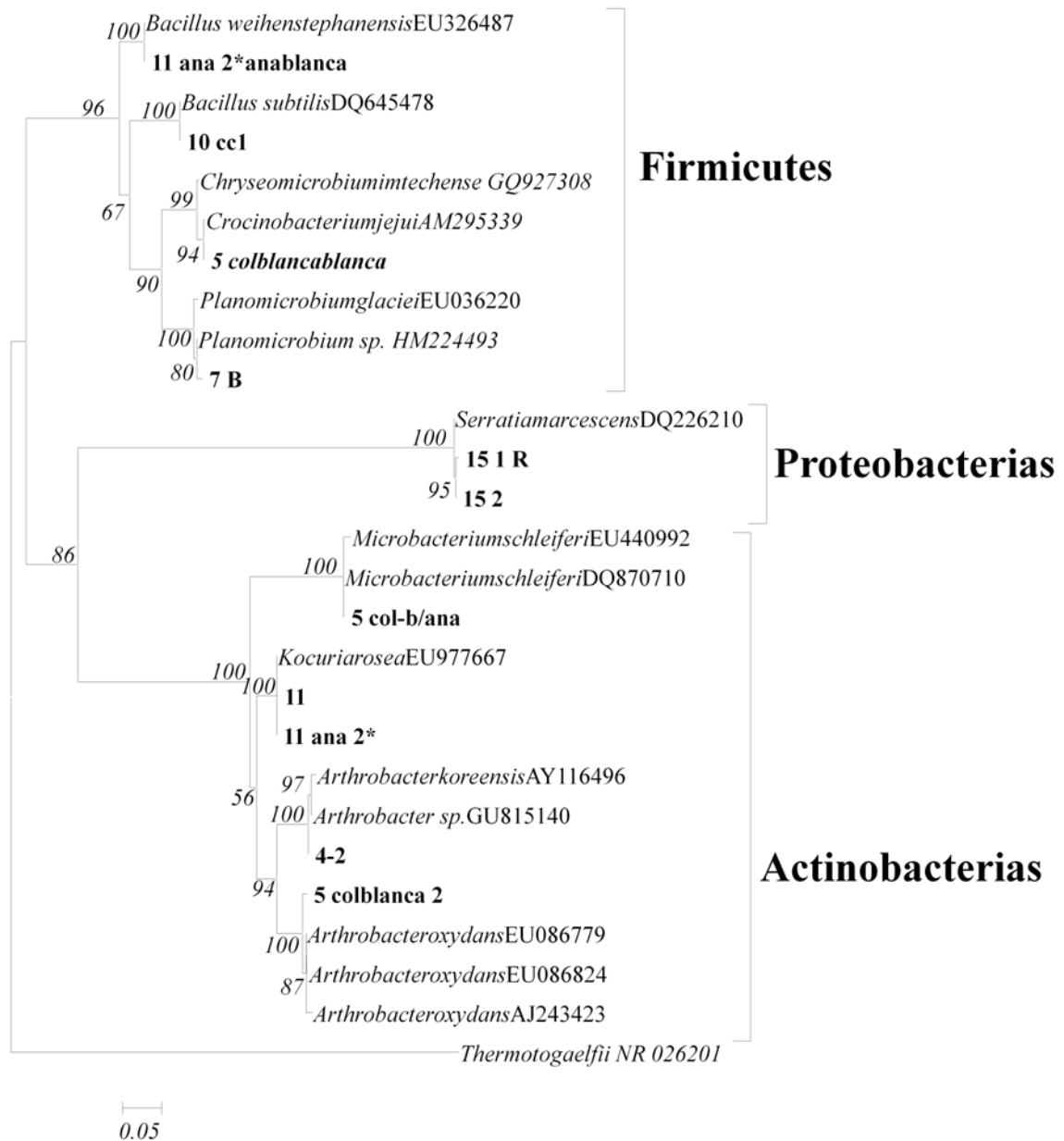
## 6.5. Análisis filogenético

Se realizó un árbol filogenético de las bacterias aisladas del tracto digestivo de *E. foetida* para determinar su relación filogenética. Las secuencias del 16S rARN obtenidas en este trabajo, fueron comparadas mediante alineamiento con reportadas en la base de datos NCBI Taxonomy Homepage (TaxBrowser), con las cuales se realizó un alineamiento múltiple utilizando el programa CLUSTAL X2 (Thompson et al., 1997). El árbol se realizó utilizando el software Mega 4(5) (Tamura et al., 2007). La Figura 18 y 19 muestra ejemplos del alineamiento de las secuencias de alrededor de 1500 pb. Los árboles están dibujados a escala con las longitudes de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol, usando como modelo evolutivo Tamura-nei (Tamura & Nei, 1993), Se agrupo mediante el algoritmo “Neighbor-joining”. En cada árbol se puede observar el % de similitud con el género y especie encontrado. Para cada especie se encontró el 99% de similitud, lo que indica un porcentaje de error muy bajo y que por lo tanto se tiene la seguridad de que se trata del género y especie obtenidos (Anexo 7).



**Figura 18. Posición filogenética de la bacteria 10cc2. El árbol se construyó con secuencias completas. El árbol está dibujado a escala con las longitudes de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol. Se utilizó el algoritmo “Neighbor-joining” y método de Tamura-nei. La bacteria 10cc2 tiene una similitud del 99% con *Bacillus subtilis*.**





**Figura 19. Posición filogenética de la bacteria 4-2, 5col b/ana, 5 col blanca blanca, 5 col blanca2 7B, 10 cc1, 11, 11 ana 2\*, 11 ana 2\* ana blanca, 15-1 R y 15-2. El árbol se construyó con secuencias completas. El árbol está dibujado a escala con las longitudes de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol. Se utilizó el algoritmo "Neibor-joining" y método de Tamura-nei.**

### 6.5.1. Dinámicas de crecimiento, degradación de acrilamida, glucosa y producción de amonio

De las 24 bacterias que crecieron alrededor de 24 h a 48 h en el medio mínimo líquido a una concentración de 1 g/L de acrilamida, se eligieron siete cepas que crecieron dentro de este tiempo: *A. luteolus* (4-2), *C. jejui* (5 col blanca blanca), *Planomicrobium sp* (7 Rosa), *S. marcescens* (9 2 ana), *B. subtilis* (10 cc2), *K. rosea* (11) y *B. weihenstephanensis* (11ana2\*blanca), las cuales se resembraron en el mismo medio mínimo líquido pero la concentración de acrilamida se incrementó hasta 3 g/L.

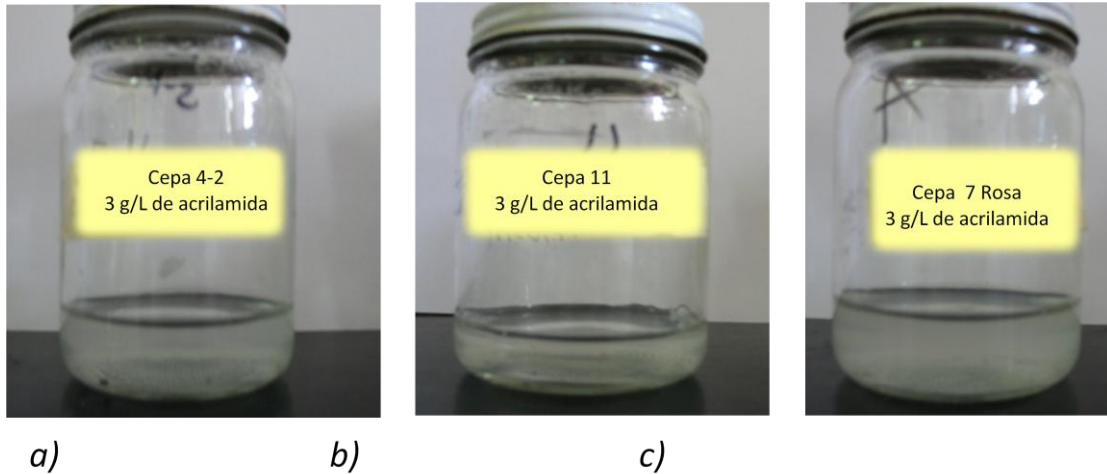
### 6.5.2. Dinámica de la biomasa de cepas cultivadas en presencia de acrilamida

Haveroen *et al.* (2005) reportaron que fue necesario adaptar a las bacterias para degradar al compuesto de interés, en este caso la acrilamida, se logró incrementar el porcentaje de degradación del contaminante. Por lo tanto, en nuestros ensayos las bacterias se fueron adaptando con concentraciones iniciales de 0.3 g/L de acrilamida, y posteriormente haciendo pases a medios de cultivos frescos incrementando la concentración de acrilamida gradualmente en el medio de cultivo, hasta lograr un crecimiento celular a concentraciones de 1 a 3 g/L. Cabe hacer notar que para todos los estudios de degradación de la acrilamida, estos cultivos bacterianos solo contenían acrilamida como única fuente de carbono y nitrógeno.

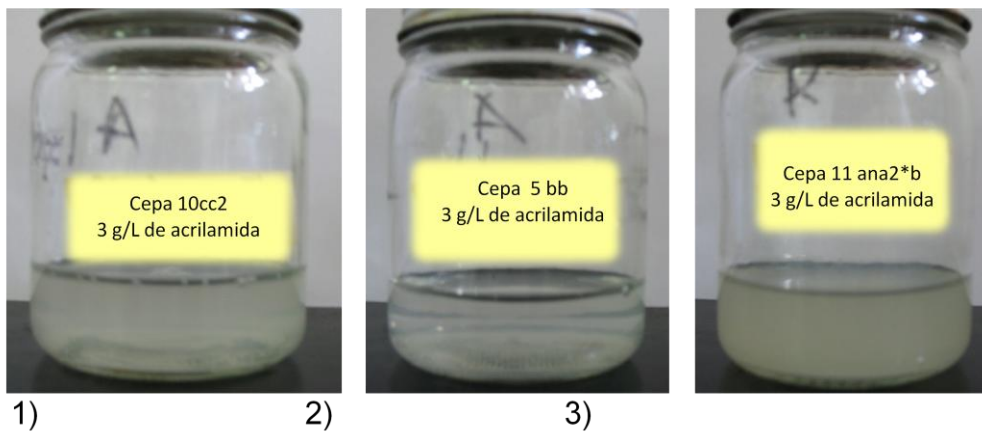
Para conocer, indirectamente, el crecimiento bacteriano, se midió la densidad óptica del cultivo a 600 nm y se determinó peso seco a este tiempo y así poder evaluar el efecto de la concentración de acrilamida en el desarrollo celular. Asimismo determinar si las bacterias utilizaban la acrilamida como fuente de carbono y/o única fuente de nitrógeno y también comprobar si la presencia de un sustrato más fácil de consumir, como la glucosa, podía aumentar el porcentaje de degradación de la acrilamida.

La determinación del incremento de la biomasa se llevó a cabo durante 30 días (Figura 20). Los medios se inocularon y se mantuvieron a temperatura ambiente con agitación constante a 120 rpm y se tomaron muestras cada 48 h para su respectivo análisis. En las Figuras 20 y 21 se puede observar la densidad de crecimiento celular de seis diferentes bacterias *A. luteolus*, *K. rosea*, *Planomicrobium sp.*, *B. subtilis*, *C. jejui* y *B. weihenstephanensis*, estas crecieron en un medio de cultivo mínimo con acrilamida a una concentración de 3 g/L. Observándose que en

estas condiciones la mayor densidad celular la presentó *B. weihenstephanensis* (Fig. 21) y en segundo lugar *B. subtilis* y *Planomicrobium sp.* (Fig. 20)



**Figura 20. Desarrollo celular de: a) *A. luteolus*, b) *K. rosea* y c) *Planomicrobium sp.*, en medio mínimo con 3 g/L de acrilamida.**



**Figura 21. Desarrollo celular de: 1) *B. subtilis*, 2) *C. jejui* y 3) *B. weihenstephanensis*, en medio mínimo con 3 g/L de acrilamida.**

La dinámica de crecimiento bacteriano se muestra en las Figuras 23, 24 y 25 y en el Anexo 8. En la Figura 38 y 41 (Anexo 8) se observa que en los primeros cinco días se incrementó la densidad celular y después comenzó a disminuir hasta el día 11. Del día 12 al 30 ésta permaneció prácticamente constante. Observándose que el crecimiento bacteriano de *A. luteolus* y *K. rosea* fue el menor con respecto a los otras cepas ensayadas, posiblemente debido a las condiciones de temperatura ambiental a las que fueron sometidos los cultivos, ya que se conoce que la temperatura óptima de crecimiento para *A. luteolus* y *K. rosea* es de 37°C y 26°C respectivamente. Por otro lado también cabe la posibilidad de que la disminución en el

crecimiento celular de estas cepas se deba a que se estén generando algunos compuestos como ácido acrílico (Prabu & Thatheyus, 2007) y que resulten nocivos para estas bacterias.

En la Figura 23 y 24 se muestra la dinámica de crecimiento de *B. subtilis* y *Planomicrobium* sp., donde se puede observar que estas cepas tardaron en adaptarse al medio aproximadamente 18 días (fase lag) y después se inició la fase exponencial de crecimiento alrededor del día 20, En cambio la fase lag de *B. weihenstephanensis* duró 14 días y su fase exponencial dio inicio en el día 15 (Figura 25). Lo que nos indica que la velocidad de consumo de acrilamida varía dependiendo de la cepa bacteriana (Anexo 8). También se observa que el crecimiento exponencial de estas bacterias coincide con la fase estacionaria de *A. luteolus* y *Kocuria rosea* (Figura 38 y 41 del Anexo 8).

En la Figura 39 (Anexo 8) se presenta la dinámica para la bacteria *C. jejuni* (gram +), mostró un crecimiento celular lento similar al de *A. luteolus* y *K. rosea* (Anexo 8), aparentemente no presenta fase lag y muestra una fase exponencial de crecimiento hasta el día 10 y después se observa una fase estacionaria entre 10 y 30 días. En cambio *S. marcescens* (gram -) a pesar de que su crecimiento disminuye en el día seis, se observó una segunda fase exponencial que inició a partir del día 12 sin presentar fase estacionaria en los 30 días de cultivo (Figura 40 (Anexo 8)). La dinámica de crecimiento de *C. jejuni* es similar al reportado para *Ralstonia eutropha*, la cual tiene una fase exponencial a los seis días, seguida de una fase estacionaria a los nueve días en presencia de acrilamida (Wang & Lee, 2007). También *Enterobacter aerogenes* presentó una fase exponencial a las seis horas de crecimiento y fase estacionaria de 12 h. (Buranasilp & Charoenpanich, 2011).

Wampler & Ensign (2005), reportaron que en presencia de acrilamida, el crecimiento celular de *Rhodopseudomonas palustris* durante los primeros cinco días es lento sin salir de la fase lag, del día cinco al día 10 la densidad celular aumentó de forma lineal, y demostró que el crecimiento lento de esta bacteria se debía a la velocidad de formación de otros compuestos, el cual limita el crecimiento. Además *Pseudomonas* sp. y *Bacillus cereus* presentan una fase exponencial durante los 10 días de la cinética (Shukor et al., 2009a y Shukor et al., 2009b). El tiempo en el que se presenta la fase exponencial de *B. weihenstephanensis*, *S. marcescens*, *B. subtilis* y *Planomicrobium* sp. es similar al tiempo en que comienza la fase exponencial de las bacterias anteriormente reportadas. Por otro lado se han reportado cinéticas de crecimiento de alrededor de 60 días o más (Haveroen et al., 2005), por lo tanto, para *A. luteolus*, *K. rosea* y *C. jejuni* a pesar de mostrar un crecimiento constante alrededor del día 10, puede que no

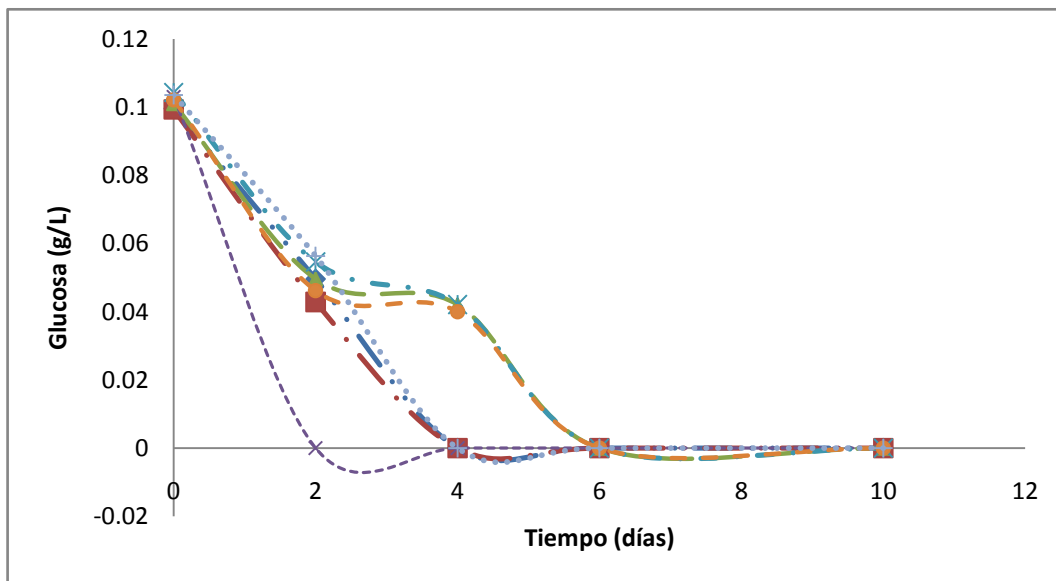
corresponda a su fase estacionaria, y muy probable que estas bacterias en crecimiento aún no lograron alcanzar su fase exponencial. En cambio *B. subtilis*, *B. weihenstephanensis*, *S. marcescens* y *Planomicrobium sp.*, a 30 días de cultivo mostraron solo dos fases de crecimiento, lag y exponencial (Figuras 23, 24 y 25).

Con los resultados presentados en las Figuras 23, 24, 25 y Anexo 8, aunque aún no se ha demostrado, se podría inferir que *A. luteolus*, *K. rosea* y *C. jejuni*, llevarían a cabo la degradación primaria de la acrilamida y *B. subtilis*, *B. weihenstephanensis*, *Planomicrobium sp.* y *S. marcescens* metabolizarían los productos de la degradación de acrilamida en una siguiente etapa.

En el caso de *A. luteolus* y *K. rosea* (Anexo 8) que muestran una disminución constante de la densidad celular, una alternativa para mejorar su tiempo de crecimiento, es cambiar las condiciones de cultivo como temperatura y pH óptimos para el crecimiento de las bacterias en experimentos posteriores.

### 6.5.3. Consumo de Glucosa residual

Como se mencionó anteriormente, se utilizó la glucosa en el medio de cultivo para aumentar la concentración de bacterias y facilitar la asimilación de la acrilamida. En la Figura 22 se muestra el consumo de este azúcar y donde se observa que es metabolizada a los seis días del cultivo.



**Figura 22. Consumo de glucosa de las cepas: ◆ *A. luteolus*, ■ *C. jejuni*, ▲ *Planomicrobium sp.*, × *S. marcescens*, ✕ *B. subtilis*, ● *K. rosea*, + *B. weihenstephanensis*. Cultivadas en medio mínimo con 3 g/L de acrilamida y 0.1 g/L de glucosa,**

Las bacterias (*A. luteolus*, *K. rosea* y *S. marcescens*) crecieron hasta el quinto día (Anexo 8) este crecimiento coincide con la desaparición de la glucosa en el día seis. Dicho comportamiento puede ser explicado con base en que el medio contenía dos sustratos que podrían ser utilizados en forma secuencial, es decir uno más asimilable que el otro; de esta manera se explicaría el notable crecimiento dentro de los primeros cinco días seguidos de una segunda fase de adaptación y crecimiento más lento al usar el segundo sustrato, este comportamiento se puede observar en la curva de crecimiento de *Planomicrobium sp.* y ligeramente en *Serratia marcescens* (Figura 23 y Figura 40 (Anexo8)).

En un sistema donde coexisten el sustrato y cosustrato, la tasa de consumo del cosustrato está ligada a la tasa de consumo del sustrato y tiende a disminuir con el agotamiento del sustrato o con la acumulación de productos tóxicos provenientes del metabolismo bacteriano, comportamiento característico del cometabolismo (García & Peralta, 2008). En la Figura 38 y 41 (Anexo 8) se puede observar esta tendencia para *A. luteolus* y *K. rosea*, en ambas bacterias, al terminarse la glucosa alrededor al sexto día, se inhibió el crecimiento celular. Esta inhibición pudo ser causada por productos de la degradación de acrilamida difíciles de asimilar. Con una mezcla adecuada de sustrato-cosustrato se podría mejorar la tasa de cometabolismo. Shukor *et al.*, (2009a) mencionan que el crecimiento bacteriano usualmente se incrementa cuando las fuentes de carbono y otros nutrientes son adicionadas a un medio mínimo y que la glucosa es la fuente de carbono universal y ha demostrado mejorar la biodegradación de xenobióticos y que además en experimentos sobre la degradación de acrilamida identificaron que la glucosa es la mejor fuente de carbono cuando la acrilamida es usada como fuente de nitrógeno. Y en estudios para mejorar la degradación de acrilamida los mismos autores reportaron que *B. cereus* y *Pseudomonas sp.* incrementan su densidad celular después de las 72 h de incubación utilizando 2 % (w/v) de glucosa en dicha degradación, y además mostraron que la glucosa y la sacarosa son los mejores sustratos que se pueden utilizar para incrementar la degradación de acrilamida por bacterias (Shukor *et al.*, 2009a y Shukor *et al.*, 2009b).

#### 6.5.4. Degradación de Acrilamida

La remoción de acrilamida de *K. rosea*, y *S. marcescens* (Figuras 40A y 41A (Anexo8)) fue alrededor de 40 % durante los primeros tres a cinco días, este porcentaje de remoción posiblemente se debe a que en los primeros días de cultivo las bacterias crecieron más rápido por la presencia de glucosa. Y la degradación de acrilamida se vuelve constante en estas cepas cuando la glucosa se termina alrededor del día seis. Este resultado demuestra que la

glucosa pudo aumentar la degradación de la acrilamida, favoreciendo el crecimiento bacteriano.

Como puede observarse en la Figura 23, 24, 25 y Anexo 8, las bacterias degradan la acrilamida hasta el día seis. Y en orden ascendente hay una degradación de 35% por *A. luteolus*, 38% por *S. marcescens*, 45 % por *K. rosea*, 70% por *B. subtilis*, 74% por *B. weihenstephanensis*, un 74.7% por *C. jejui* y un 77% por *Planomicrobium sp.* Pareciera que hay un aumento en la concentración de acrilamida durante los días posteriores, este aumento probablemente se debe a la formación de diferentes compuestos como el acrilato que puede dar interferencias en el método utilizado. Es posible que la bacteria se adapte al nuevo compuesto y lo degrade hasta producción del aminoácido o tal vez hasta la mineralización completa es decir hasta la formación de CO<sub>2</sub> y amonio. Durante la adaptación de la bacteria a este nuevo compuesto la densidad celular puede disminuir y afectar la degradación de acrilamida observado en el día 12 y 14 (Figura 23A, 24A y 25A) (Figuras en Anexo 8). Por otro lado, se ha reportado que a altas concentraciones de acrilamida (a partir de 1 g/L) disminuye dramáticamente el crecimiento bacteriano, esto es probablemente debido al efecto inhibitorio de la acrilamida sobre los grupos tioles de las proteínas de las bacterias (Shukor *et al.*, 2009a).

#### **6.5.4.1. Producción de amonio en los cultivos bacterianos**

Otra forma de medir la degradación de acrilamida es por la formación de amonio. La acrilamida al degradarse puede formar amonio y otros compuestos que favorecen otras rutas metabólicas como la de metanogénesis en condiciones anaeróbicas. En la Figura 23 (B y D) y Figura 38 (B y D) en Anexo 8 se observa que aumentó la formación de amonio para *Planomicrobium sp.* y *A. luteolus*. En la Figura 39 en Anexo 8, se observa que *C. jejui* produjo amonio después del día 15 de manera constante, en cambio *S. marcescens* después de aumentar la producción de amonio hasta el cuarto día, disminuyó la formación de éste y se mantuvo constante en los siguientes días. Este comportamiento fue similar al reportado para *Enterobacter aerogenes* donde después de las 24 h de cultivo la concentración de amonio se incrementó, mientras que la biomasa disminuyó (Buranasilp y Charoenpanich, 2011). Este comportamiento está de acuerdo con lo observado para *Pseudomonas aeruginosa* que incrementa su concentración de amonio mientras que disminuye la concentración de acrilamida bajo condiciones aeróbicas (Prabu & Thatheyus, 2007). En el caso de *K. rosea* también presentó el mismo comportamiento anteriormente mencionado; en cambio para *B. subtilis* y *B. weihenstephanensis* la producción de amonio incrementó constantemente hasta los 30 días de cultivo (Figura 24 y 25).

Degradación de acrilamida

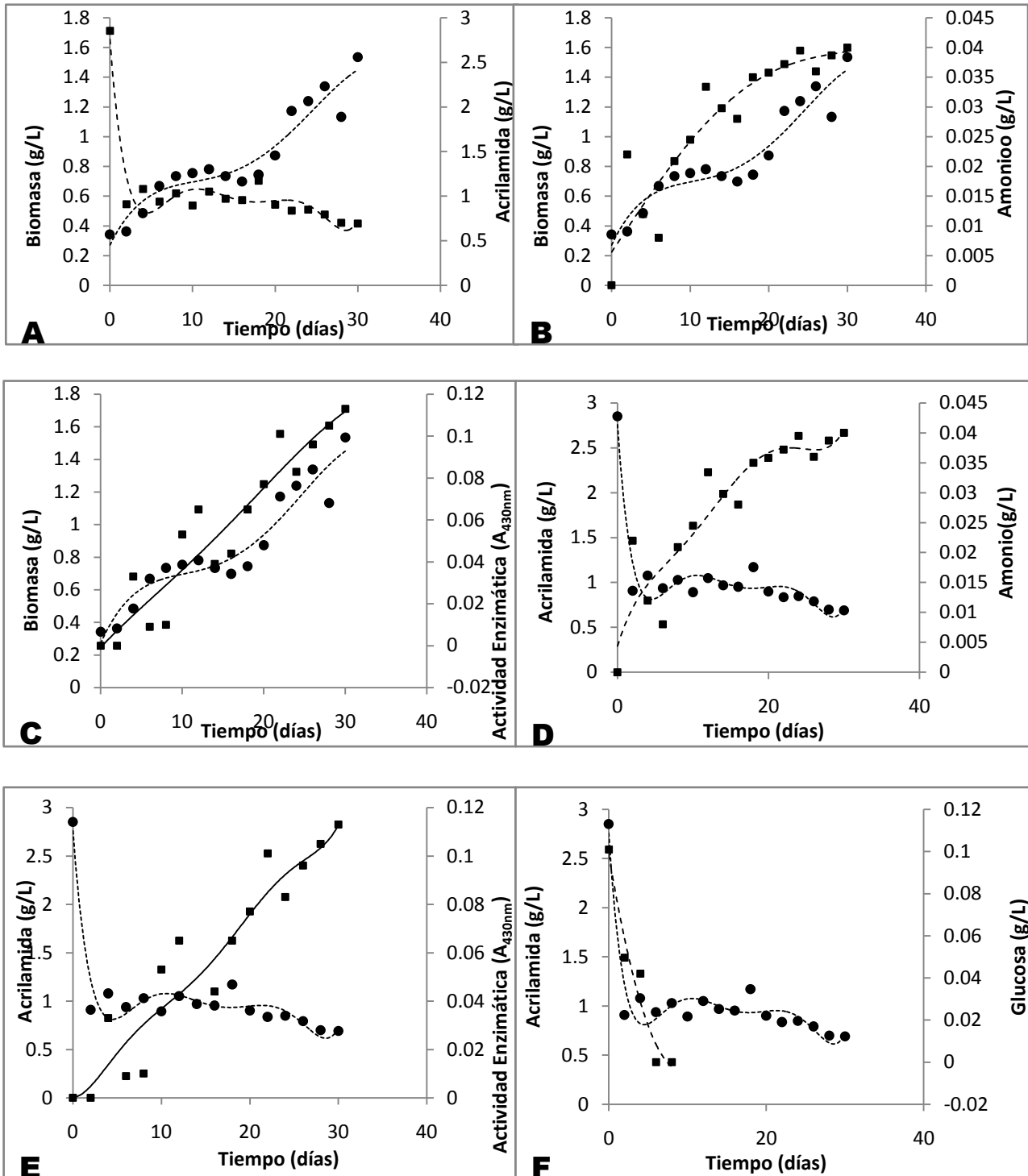


Figura 23. Degradación de acrilamida por *Planomicrobium* sp.: A) (●) Biomasa - (■) Acrilamida residual, B) (●) Biomasa - (■) Producción de amonio, C) (●) Biomasa - (■) actividad enzimática, D) (●) Acrilamida residual - (■) producción de amonio, E) (●) Acrilamida residual - (■) actividad enzimática y F) (●) Acrilamida residual - (■) Consumo Glucosa.



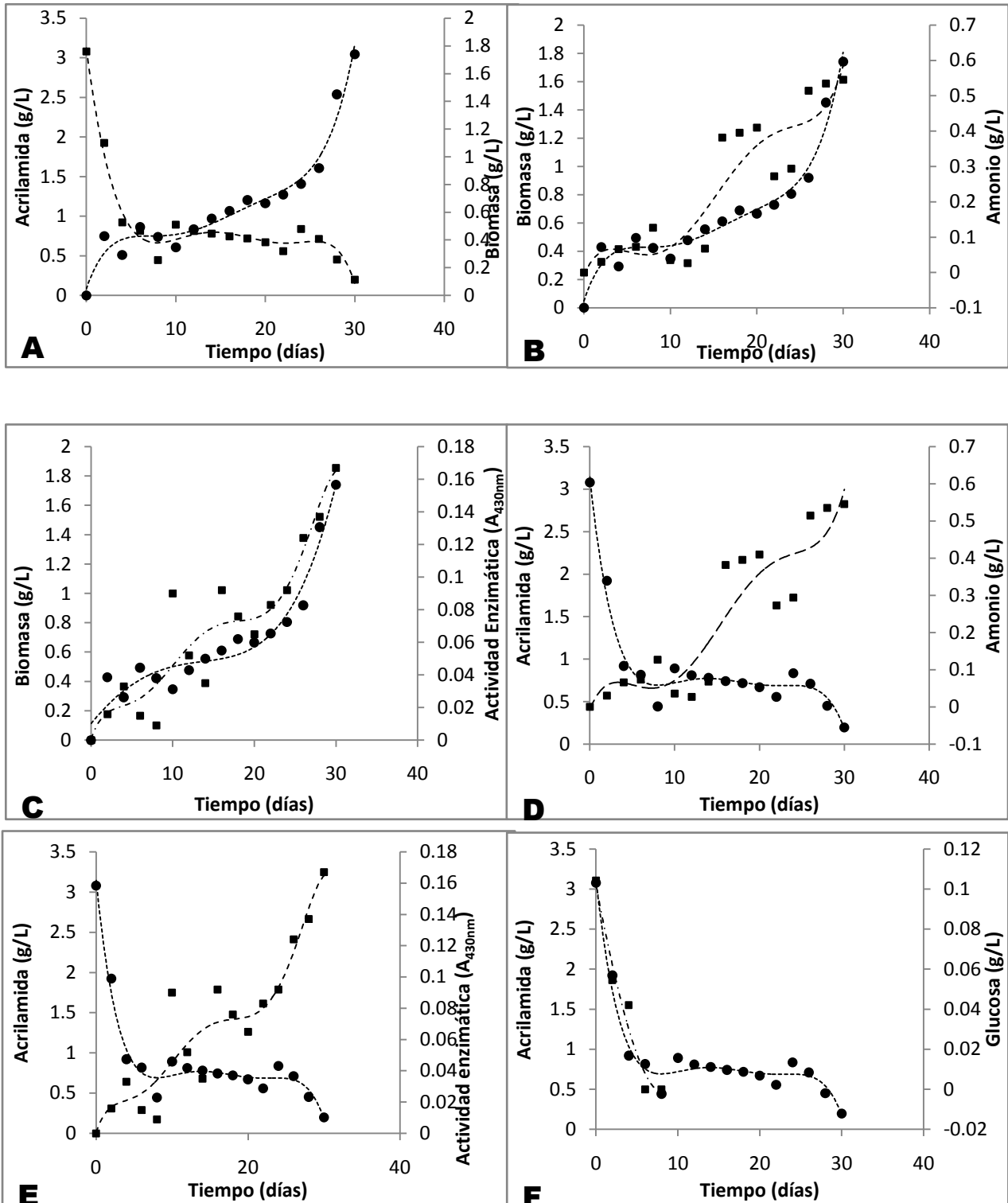


Figura 24. Degradación de acrilamida por *Bacillus subtilis*: A) (---●---) Biomasa- (---■---) Acrilamida residual, B) (---●---) Biomasa- (---■---) Producción de amonio, C) (---●---) Biomasa- (---■---) actividad enzimática, D) (---●---) Acrilamida residual- (---■---) producción de amonio, E) (---●---) Acrilamida residual- (---■---) actividad enzimática y F) (---●---) Acrilamida residual- (---■---) Consumo Glucosa.

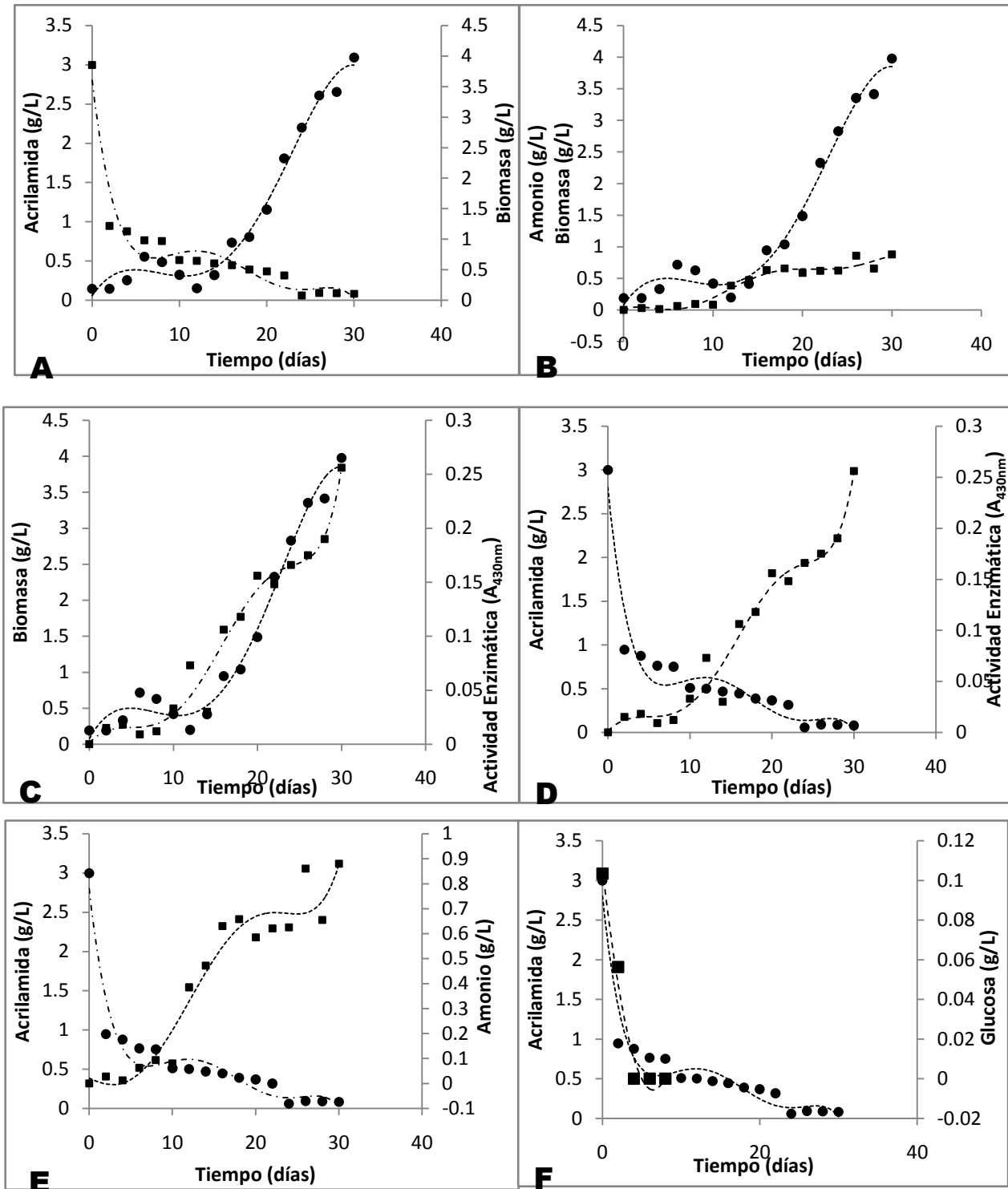


Figura 25. Degradación de acrilamida por *Bacillus weihenstephanensis*: A) (--●--) Biomasa--(- -■- -) Acrilamida residual, B) (--●--) Biomasa--(- -■- -) Producción de amonio, C) (--●--) Biomasa--(- -■- -) actividad enzimática, D) (--●--) Acrilamida residual--(- -■- -) producción de amonio, E) (--●--) Acrilamida residual--(- -■- -) actividad enzimática y F) (--●--) Acrilamida residual--(- -■- -) Consumo Glucosa.

En la Figura 40 en Anexo 8 se observa la disminución en la producción de amonio para *S. marcescens* esto se debe probablemente a que se consume el amonio como fuente de  $N_2$  necesario para el metabolismo de la bacteria, esta suposición se apoya en el hecho de que la fase de su crecimiento exponencial corresponde con el periodo (10 a 30 días) de la disminución de la concentración de amonio en el medio de cultivo (Anexo 8).

#### **6.5.5. Actividad de Imidasa de cepas cultivadas en presencia de acrilamida**

Al identificar si estas bacterias producen la enzima imidasa y a la vez la enzima está involucrada en la degradación de acrilamida o poli(acrilamida), se comprobaría que la actividad microbiana de la lombriz y el ambiente donde se desarrolla, son importantes para la degradación de compuestos como la acrilamida, además permitiría evaluar que bacterias producen en mayor cantidad la enzima y poder usarla en procesos industriales. La importancia de la enzima a nivel industrial se debe a su aplicación en varios procesos como en la producción de aminoácidos (Ogawa *et al.*, 1996).

Las bacterias pueden metabolizar compuestos tóxicos con la ayuda de enzimas capaces de romper los enlaces de dichas moléculas. Conocer que tipo de enzima(s) está involucrada en el metabolismo de un compuesto ayuda a entender el mecanismo de biodegradación y permite mejorar los procesos de biorremediación a escalas mayores.

Medir la actividad de imidasas es una forma de determinar la presencia de enzimas causantes de la degradación de poli(acrilamida) y acrilamida y también demostrar su producción por las cepas estudiadas en esta tesis. Dichas enzimas probablemente son producidas y excretadas al medio de cultivo para degradar la poli(acrilamida) y la acrilamida, de esta manera los productos de la degradación son más fáciles de metabolizar por estas u otras cepas bacterianas. Por lo cual se determinó la actividad enzimática de imidasas en el sobrenadante de los medios de cultivo donde crecieron dichas bacterias suponiendo que estas enzimas son excretadas al medio de cultivo.

Para *C. jejuni* y *S. marcescens* la actividad enzimática de imidasas aumentó en forma constante su actividad de imidasa en los primeros 15 días, posteriormente se observó una ligera disminución de la actividad enzimática en los últimos días. En el caso de *S. marcescens* la actividad de imidasa se incrementó otra vez a partir del día 22 (Figura 39 (B y C) y Figura 40 (C

y D) en Anexo 8), este comportamiento es congruente con el crecimiento, la degradación de acrilamida, y la producción de la enzima.

Los resultados de las evaluaciones de la actividad de imidasas para *K. rosea* y *A. luteolus* se muestran en la Figura 38 y 41 (Anexo 8) donde se observa que presentaron los valores menores de actividad enzimática de las siete cepas estudiadas, este comportamiento es congruente con el crecimiento y la degradación de acrilamida, lo cual indica que la producción de la enzima se ve afectada por el decremento en crecimiento. La baja actividad de dicha enzima también podría ser debida a la presencia de productos del metabolismo bacteriano.

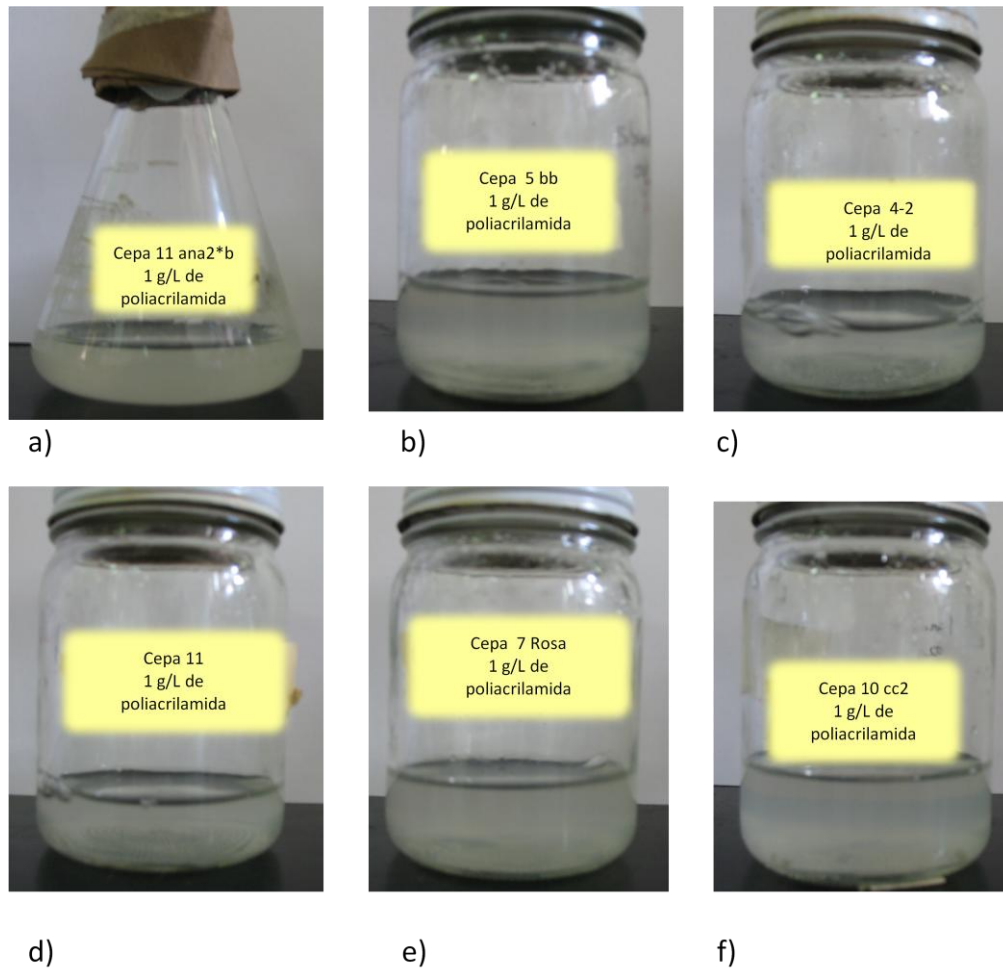
En *B. subtilis* y *B. weihenstephanensis* las actividades de imidasas mostraron un incremento constante durante los 30 días de cultivo y los valores de actividad enzimática fueron los mayores con respecto a las otras cepas estudiadas y este resultado es congruente con el crecimiento, la degradación de acrilamida, la producción de amonio y la producción de la enzima (Figuras 23, 24 y 25). En resumen *B. weihenstephanensis* y *B. subtilis* presentaron el mayor crecimiento, la mayor degradación de acrilamida, la mayor producción de amonio y la mayor actividad de imidasas (Figuras 24 y 25).

#### **6.5.6. Dinámicas de crecimiento en poliacrilamida, glucosa, producción de amonio y actividad enzimática.**

La Poliacrilamida puede ser degradada a su monómero acrilamida, a amonio, acrilato, y hasta su degradación final en forma de CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y aminoácidos (Campos *et al.*, 2008). Por lo tanto se utilizó la formación de amonio como un indicador de la degradación de la poliacrilamida y al mismo tiempo se midió el crecimiento celular para determinar si las bacterias utilizaban a la poliacrilamida como fuente de carbono.

#### **6.5.7. Crecimiento bacteriano en presencia de poliacrilamida**

Las bacterias que se utilizaron para la dinámica de crecimiento en los medios con acrilamida, también se usaron para realizar los ensayos de crecimiento bacteriano en medio mínimo con poliacrilamida con una concentración de 1 g/L, a temperatura ambiente y a 120 rpm. Cabe hacer notar que estos cultivos con las siete cepas bacterianas solo contenían poliacrilamida como única fuente de carbono.



**Figura 26. Desarrollo celular de las cepas: a) *B. weihenstephanensis*, b) *C. jejui*, c) *A.luteolus*, d) *K. rosea*, e) *Planomicrobium sp.* y f) *B. subtilis*, cultivadas en medio mínimo con 1 g/L de poliacrilamida.**

En la Figura 26 se puede observar que la densidad del crecimiento celular de seis cepas bacterianas: *A. luteolus*, *K. rosea*, *Planomicrobium sp.*, *B. subtilis*, *C. jejui* y *B. weihenstephanensis* cultivadas en un medio mínimo con poliacrilamida a concentración de 1 g/L. La mayor densidad celular la presentaron *B. weihenstephanensis*, *B. subtilis*, y en orden descendente *C. jejui* y *Palnomicrobium sp.*

En la Figura 30A y Figura 42A y 45A (Anexo 8) se muestra la dinámica de crecimiento de *Planomicrobium sp.*, *A. luteolus* y *K. rosea*. En el caso de *Planomicrobium sp.*, la biomasa aumentó aproximadamente hasta el día seis al 10 y disminuyó a partir de este día y su fase de crecimiento exponencial inició el día 16. Para *K. rosea* y *A. luteolus* la biomasa incrementó entre el día cuatro a seis, seguida de una disminución el día ocho y después del día 10 se observó un ligero incremento en el crecimiento. Esta disminución de la población bacteriana

puede deberse a la formación de compuestos por la degradación de poliacrilamida y el tiempo en que tardan en adaptarse las bacterias al nuevo compuesto. Al igual que la acrilamida, la poliacrilamida se degrada a acrilato y también en algunas cepas se forman otros compuestos como el metano (Haveroen *et al.*, 2005).

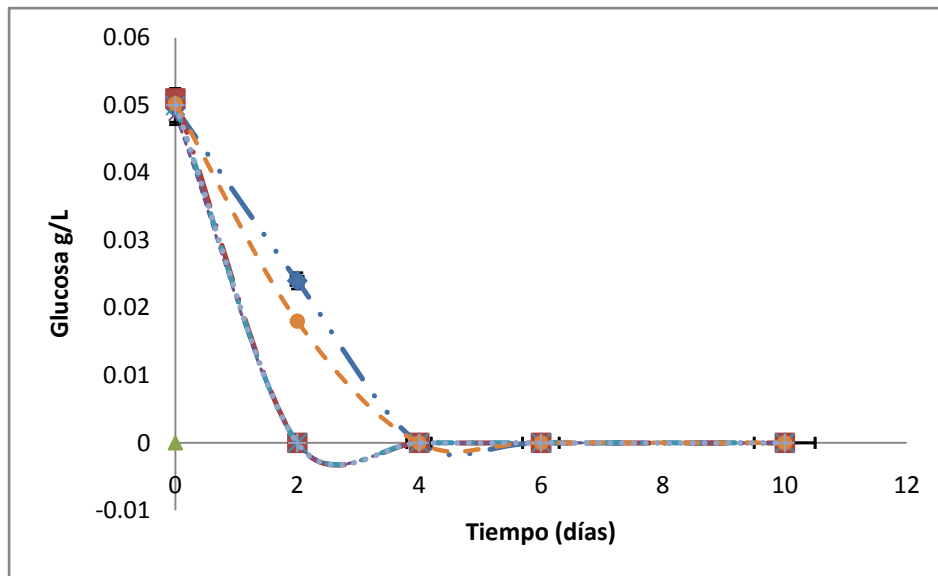
La producción de metano es otro compuesto que se presenta en la degradación de poliacrilamida. En los cultivos bacterianos con poliacrilamidas catiónicas, la formación de metano es menor. Y también con concentraciones altas de poliacrilamida la producción de metano en dichos cultivos disminuye (Campos *et al.*, 2008).

*B. subtilis*, *B. weihenstephanensis* y *S. marcescens* (Figura 28A, A y Figura 44A (Anexo 8)) presentaron un mayor crecimiento durante los primeros 15 días, y después disminuyó la biomasa permaneciendo con un valor constante y su fase de crecimiento exponencial inició aproximadamente el día 22. En la Figura 43A (Anexo 8) se muestra el comportamiento para *C. jejuni* el cual permaneció en una fase de crecimiento exponencial.

Wen *et al.* (2009) reportaron una fase exponencial durante los primeros dos días, seguida de una fase estacionaria que comenzó en el tercer día para *B. cereus* y *B. flexus*, este comportamiento es similar al observado con *A. luteolus* y *K. rosea*. La presencia de productos de la degradación de la poliacrilamida puede inhibir el crecimiento de las bacterias. En el caso de *C. jejuni* no mostró inhibición en su crecimiento como el observado en las otras bacterias estudiadas (Figura 43 en Anexo 8).

#### **6.5.8. Determinación de Glucosa residual**

Para aumentar la concentración de bacterias en los cultivos con las cepas ensayadas se utilizó la glucosa en el medio de cultivo. Los medios de cultivo tenían una concentración de 1 g/L de poliacrilamida y 0.5 g/L de glucosa como única fuente de carbono, y se incubaron a temperatura ambiente con una agitación de 120 rpm. En la Figura 27 se muestra el consumo de glucosa, la cual es consumida por completo alrededor del cuarto día. Estos resultados coinciden con el crecimiento de las bacterias *S. marcescens* y *K. rosea* que crecen muy bien hasta ese día y al consumirse la glucosa decae su crecimiento (Anexo 8).



**Figura 27. Consumo de glucosa en el cultivo de cepas bacterianas: ◆ *A. luteolus*, ■ *C. jejuni*, ▲ *Planomicrobium sp.*, × *S. marcescens*, ✱ *B. subtilis*, ● *K. rosea*, + *B. weihenstephanensis*. Cultivadas en medio mínimo con 1 g/L de poliacrilamida y 0.05 g/L de glucosa, temperatura ambiente y a 120 rpm.**

Se observó que la mayoría de las bacterias que crecieron en medios con poliacrilamida tienen un comportamiento de crecimiento diauxico, es decir, que utilizan la glucosa para aumentar biomasa y después se adaptan al nuevo compuesto para ser usado como fuente de carbono y degradarlo. Se ha informado que es conveniente utilizar bajas concentraciones de glucosa para la degradación de compuestos xenobióticos, la cual puede ser usada como una fuente de carbono primaria que estimula el crecimiento celular y la expresión de enzimas que degradan otros compuestos que pueden ser utilizados como segunda fuente de carbono. También se ha observado que el crecimiento de bacterias puede mejorar cuando se utiliza una concentración de glucosa menor a 0.2 g/L y a concentraciones mayores provocan que disminuya la eficiencia de remoción de la poliacrilamida (Wen *et al.*, 2009).

#### 6.5.9. Producción de amonio en los medios con poliacrilamida.

Una forma de medir la degradación de poliacrilamida es determinar la concentración de amonio en el medio que se libera. Las bacterias utilizan la poliacrilamida como fuente de nitrógeno,

transformando el polímero a cadenas largas de poliacrilato, el cual no es tóxico y puede ser degradado fácilmente por las bacterias (Campos *et al.*, 2008). El amonio se forma como producto de la degradación de poliacrilamida; se observó en *A. luteolus* y *K. rosea* una producción de amonio en el medio de cultivo de 0.080 g/L y 0.040 g/L respectivamente a los 30 días (Figura 42B y 45B en Anexo 8).

La Figura 43C y 44A (Anexo 8) muestra que *C. jejuni* y *S. marcescens* producen concentraciones de amonio de 0.055 g/L y 0.065 g/L respectivamente a los 30 días de cultivo. Durante los primeros 15 días la formación de amonio fue constante, después se incrementó alrededor del día 20. La formación de amonio en algunos puntos disminuye, esto puede deberse al consumo del nitrógeno por las bacterias.

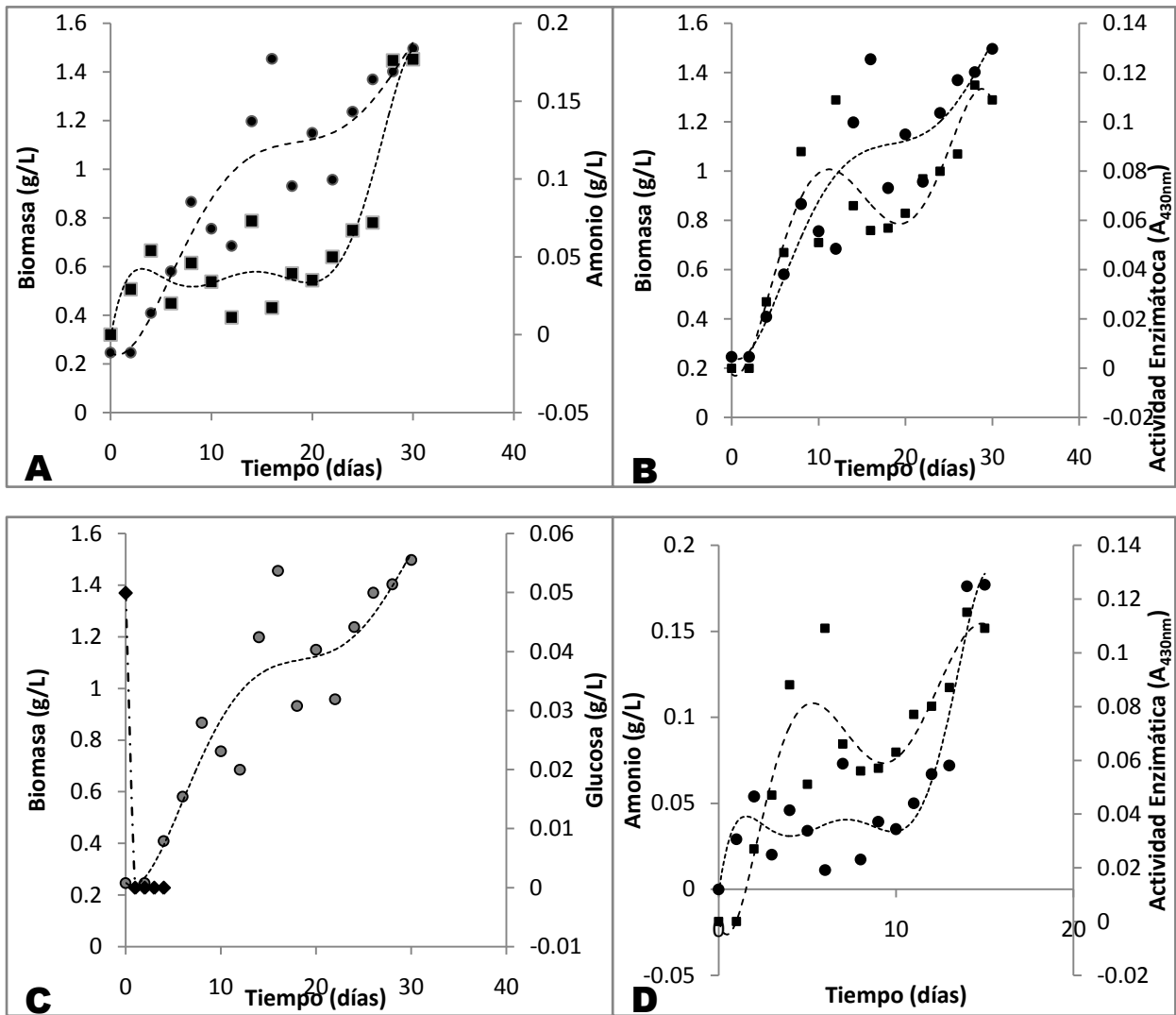
En la Figura 29A y 30A se observa en *Planomicrobium sp* y *B. weihenstephanensis* que la producción de amonio se incrementó en forma exponencial durante los 30 días del cultivo. En cambio *B. subtilis* presentó una fase lenta de producción de amonio hasta los 20 días y posteriormente se observó un incremento constante de producción y este comportamiento corresponde al crecimiento de esta cepa (Figura 28A).

La producción de amonio nos indican que las bacterias que resultaron ser las mejores degradadoras de poliacrilamida fueron *Planomicrobium sp.*, *B. subtilis* y *B. weihenstephanensis*. Siendo *B. subtilis* la mayor productora de amonio con una concentración de 0.170 g/L a los 30 días de cultivo (Figuras 28, 29 y 30).

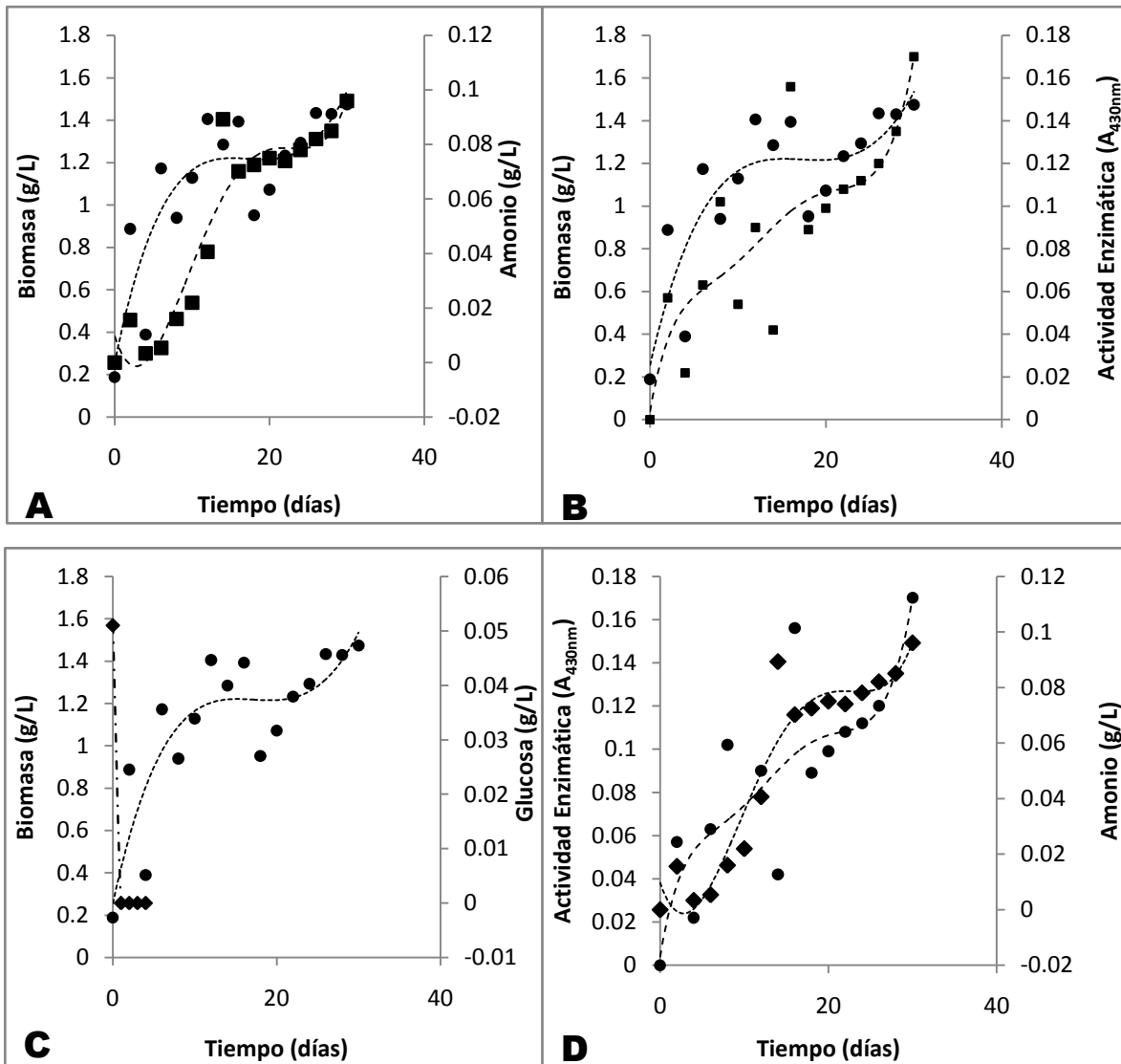
#### **6.5.10. Actividad de Imidasa de cepas cultivadas en presencia de poliacrilamida**

Se ha reportado que enzimas extracelulares de bacterias aeróbicas deaminan la poliacrilamida formando amonio que puede ser transportado dentro de la célula para usarlo como fuente de nitrógeno. Estas enzimas posiblemente rompen los enlaces de la cadena de poliacrilamidas (Haveroen *et al.*, 2005). Prabu & Thatheyus (2007), sugieren que las imidasas podrían estar involucradas en la degradación de la poliacrilamida. Por otro lado estudios realizados, por nuestro grupo de trabajo, con lombricomposta de biosólidos con poliacrilamida mostraron la remoción de esta. Por lo tanto, para comprobar la existencia de bacterias del tracto digestivo de *E. foetida* productoras de imidasas se midió la actividad enzimática de estas enzimas en los cultivos de las bacterias aisladas y con poliacrilamida como única fuente de carbono.

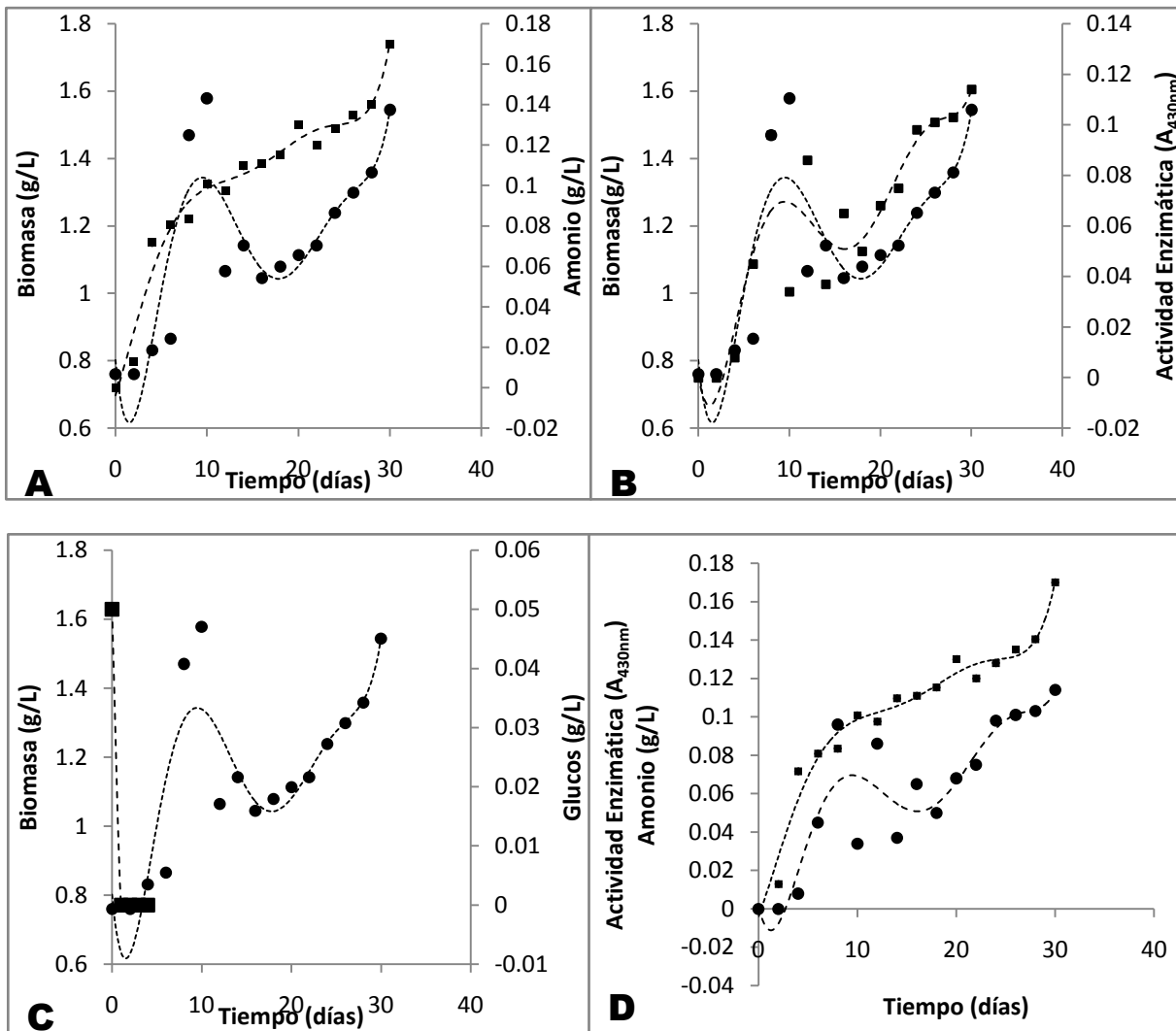




**Figura 28.** Degradación de poliacrilamida por *Bacillus subtilis*: A) (---●---) Biomasa (---■---) Producción de amonio, B) (---●---) Biomasa (---■---) actividad enzimática, C) (---●---) Biomasa (---■---) Consumo de Glucosa y D) (---●---) Producción de amonio (---■---) Actividad enzimática.



**Figura 29. Degradación de poliacrilamida por *Bacillus weihenstephanensis*: A) (●) Biomasa (■) Producción de amonio, B) (●) Biomasa (■) actividad enzimática, C) (●) Biomasa (■) Consumo de Glucosa y D) (●) Producción de amonio (■) Actividad enzimática.**



**Figura 30. Degradación de poliacrilamida por *Planomicrobium sp.*: A) (---●---) Biomasa (---■---) Producción de amonio, B) (---●---) Biomasa (---■---) actividad enzimática, C) (---●---) Biomasa (---■---) Consumo de Glucosa y D) (---●---) Producción de amonio (---■---) Actividad enzimática.**

En la Figura 28, 29, 30 y Anexo 8 se muestra que la actividad enzimática aumentó con respecto al tiempo y disminuyó en los días donde se observó disminución en la densidad celular de las bacterias. Es probable que la excreción de la enzima sea afectada por la formación de otros compuestos que alteran el crecimiento de estas. En *K. rosea* se observó que al disminuir la concentración de poliacrilamida disminuyó la actividad enzimática. Aunque

su densidad celular disminuyó en los últimos días del cultivo, sin embargo se observó un aumento en la formación de nitrógeno, lo cual es una evidencia de la degradación de poliacrilamida (Figura 45<sup>a</sup> en Anexo 8).

En la Figura 43B y 44B (Anexo 8) se observó un incremento constante la actividad enzimática de imidasa en *C. jejui* y *S. marcescens* durante los 30 días de cultivo.

En la Figura 28B y 29B se muestra la actividad enzimática de *B. subtilis* y *B. weihenstephanensis* donde se observó un comportamiento similar a las cepas anteriores. Para *C. jejui*, *S. marcescens*, *B. subtilis* y *B. weihenstephanensis*, la actividad enzimática de imidasas aumentó en función del tiempo. La posible inhibición por otros compuestos formados de la degradación como acrilato y la presencia de la poliacrilamida solo se observó en los primeros 15 días de la cinética.

En resumen todas las cepas que crecieron en el medio mínimo con poliacrilamida mostraron actividad enzimática en los medios de cultivo y estos resultados apoyan la hipótesis de la producción de imidasas por estas bacterias, y estas enzimas son excretadas al medio de cultivo, además que su producción está directamente relacionada al crecimiento de la bacteria (Figuras 28, 29, 30, Anexo 8 y Tabla 17).

Con los datos obtenidos de biomasa y la cantidad de producto de las cepas que crecieron en los medios mínimos con 3 g/L de acrilamida., se calculó la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y el rendimiento de producto por cantidad de sustrato consumido ( $Y_{p/s}$ ) Los parámetros se determinaron en la zona exponencial del crecimiento porque es la parte lineal y se puede aplicar las ecuaciones para su cálculo: ( $\mu = \frac{\ln X - \ln X_0}{t}$  y  $Y_{p/s} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = (Y^P/x)(Y^x/s)$ ).

En la Tabla 15 se presentan los datos obtenidos de los cultivos, tal como se esperaba en todos los casos las velocidades específicas de crecimientos fueron bajas. En el caso de *A. luteolus* presentó la mayor velocidad específica de crecimiento, seguida por *Kocuria rosea* y *S. marcescens*, esta velocidad de crecimiento corresponde al tiempo donde están presentes las dos fuentes de carbono glucosa y acrilamida, es probable que la velocidad específica de crecimiento sea mayor debida al consumo de la fuente de más fácil asimilación, la glucosa. *Planomicrobium sp*, y *Serratia marcescens* presentaron un crecimiento con comportamiento diauxico que se pueden observar en las Figura 23, 30 y en Anexo 8. En los dos casos se reportan dos velocidades de crecimiento, la primera corresponde al crecimiento con glucosa y la segunda debida a la acrilamida. Para *Planomicrobium sp*, la primer etapa se presentó durante los primeros ocho días, con un valor de  $0.004 \text{ h}^{-1}$ , Al término de este sustrato, la bacteria tardó aproximadamente una semana en adaptarse al nuevo sustrato, la acrilamida, y

comenzó la segunda fase exponencial del día 16 al 30, la cual corresponde con la mayor producción de amonio, producto de la degradación de acrilamida.

A pesar de este comportamiento, las velocidades específicas de crecimiento son muy parecidas, es probable que durante los primeros 8 días la bacteria haya consumido muy pocas cantidades de acrilamida o que tal vez este compuesto afecte la velocidad de crecimiento tal como lo indica Cavins & Friedman, (1968) que tiene un efecto inhibitorio sobre las proteínas con grupos sulfhidrilo y por lo tanto afecta el crecimiento de los microorganismos. Para *S. marcescens* el comportamiento fue similar, la primera etapa se presentó en la primera semana y la velocidad de crecimiento ( $0.018 \text{ h}^{-1}$ ) fue mayor que la obtenida en la segunda etapa ( $0.001 \text{ h}^{-1}$ ) con una fase de adaptación de dos semanas. Se ha reportado que *S. marcescens* crece con una velocidad de  $0.2 \text{ h}^{-1}$  en glucosa a  $20 \text{ g/L}$ , (Longo *et al.*, 1999). Como se puede observar el crecimiento en presencia de acrilamida es 10 veces menor.

*B. subtilis* y *B. weihenstephanensis* presentaron velocidades de  $0.005 \text{ h}^{-1}$  y *C. jejui* con  $0.002 \text{ h}^{-1}$ , en estos casos no se presentó comportamiento diauxico o de cometabolismo, posiblemente estas bacterias utilizan la acrilamida como fuente de carbono o nitrógeno desde el principio. Para *B. subtilis* se ha reportado que crece a una velocidad específica de  $0,35 \text{ h}^{-1}$ , en un medio con glucosa a  $200 \text{ g/L}$  (Seok *et al.*, ., 2002).

**Tabla 15. Velocidades específicas de crecimiento, rendimiento Yp/s, velocidad específica de formación de producto y velocidad específica de consumo de sustrato de las bacterias crecidas en el medio mineral con acrilamida.**

Cepa	$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	Y p/s ( $\frac{\text{g P}}{\text{g S}}$ )	Y p/s ( $\frac{\text{g P}}{\text{g S}}$ )	qp ( $\frac{\text{gp}}{\text{gB.h}}$ )	qp ( $\frac{\text{gp}}{\text{gB.h}}$ )	qs ( $\frac{\text{gs}}{\text{gB.h}}$ )	qs ( $\frac{\text{gs}}{\text{gB.h}}$ )
	Primer etapa	Segunda etapa	Primer etapa	Segunda etapa	Primer etapa	Segunda etapa	Primer etapa	Segunda etapa
<i>Arthorbacter luteolus</i>	0.046	SUE	0.020	SUE	0.0016	SUE	0.092	SUE
<i>Crocino bacterium jejui</i>	0.002	SUE	0.010	SUE	0.00026	SUE	0.0272	SUE
<i>Planomicrobium sp..</i>	0.004	0.002	0.011	0.010	0.00026	0.00008	0.018	0.0008
<i>Bacillus subtilis</i>	0.005	SUE	0.396	SUE	0.004	SUE	0.003	SUE
<i>Serratia marcescens</i>	0.018	0.001	0.020	0.003	0.000006	0.001	0.036	0.0003
<i>Kocuria sp.</i>	0.018	SUE	0.120	SUE	0.000002	SUE	0.001	SUE
<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	0.005	SUE	1.03	SUE	0.0005	SUE	0.0005	SUE

SUE.- Solo hubo una etapa

El rendimiento Yp/s da una medida de la eficiencia del proceso. *B. subtilis* y *B. weihenstephansensis* presentaron los valores más altos de rendimiento:  $0.396 \text{ gp/gs}$  y  $1.0$

gp/gs respectivamente, el cual indica que la mayoría del sustrato es transformado a amonio y acrilato (Buranasilp & Charoenpanich, 2011). En el caso de *Kocuria sp.*, *Planomicrobium sp.*, *S. marcescens* y *A. luteolus*, el sustrato puede ser consumido para formar otros compuestos como acrilato que se menciono anteriormente o CO<sub>2</sub> los cuales no fueron medidos. En comparación con *B. subtilis.*, *C. jejui* y *S. marcescens* en su segunda fase exponencial, presentaron valores de rendimiento muy pequeños, como se mencionó es probable que el sustrato haya sido utilizado por los mismos microorganismos como fuente de nitrógeno para la formación de otros compuestos como aminoácidos y proteínas y también para el mantenimiento celular, pero con estos valores se puede inferir que a partir del sustrato consumido no se produce una gran cantidad de amonio y que por lo tanto la asimilación de acrilamida por estas bacterias es muy baja, ya sea porque la acrilamida resulte tóxica de acuerdo a lo reportado por Cavins & Friedman, (1968) o debido a las condiciones del medio (pH, temperatura, concentración de oxígeno)., por lo tanto, para mejorar el proceso es necesario modificar las condiciones de crecimiento bacteriano.

**Tabla 16. Velocidad específica de crecimiento, rendimiento Yp/x y velocidad especifica de formación de producto de las bacterias crecidas en medios con poli(acrilamida).**

Cepa	$\mu$ (h <sup>-1</sup> ) Primer etapa	$\mu$ (h <sup>-1</sup> ) Segunda etapa	Y p/x ( $\frac{g P}{g B}$ ) Primer etapa	Y p/x ( $\frac{g P}{g B}$ ) Segunda etapa	qp ( $\frac{gp}{gB.h}$ ) Primer etapa	qp ( $\frac{gp}{gB.h}$ ) Segunda etapa
Arthorbacter luteolus	0.018	0.007	0.0044	0.031	0.00006	0.0001
Crocino bacterium jejui	0.001	SUE	0.038	SUE	0.00008	SUE
Planomicrobium sp..	0.006	0.001	0.028	0.118	0.00017	0.00011
Bacillus subtilis	0.005	0.001	0.046	0.042	0.0002	0.0004
Serratia marcescens	0.029	0.002	0.017	0.075	0.0004	0.0001
Kocuria sp.	0.014	0.004	0.001	0.027	0.0001	0.00008
Bacillus weihenstephanensis	0.007	0.009	0.065	0.091.	0.0001	0.0001

SUE.- Solo hubo una etapa

En la Tabla 16 se presentan los resultados de la velocidad específica de crecimiento y rendimiento Yp/x de las cepas que crecieron en medios mínimos con 1g/L de poli(acrilamida). En la mayoría de los casos se presentó el comportamiento diauxico, excepto para *Crocino bacterium jejui*.

En el caso de *A. luetolus*, *S. marcescens* y *Kocuria sp* presentaron los valores más altos de velocidad de crecimiento (0.014 h<sup>-1</sup>, 0.018 h<sup>-1</sup> y 0.029h<sup>-1</sup>), estas velocidades corresponden al

tiempo en el cual la glucosa es consumida (primeros 5 días), además presentaron una segunda velocidad que es menor debida al cambio de otra fuente carbono de menor asimilación que es la poli(acrilamida), las velocidades disminuyeron casi a la mitad, pero en el caso de *S.marcescens* disminuyó hasta 10 veces menos. Las fases de adaptación fueron de 2 a 3 semanas, aproximadamente dos semanas más que en el caso de la acrilamida. Esto pudo ser debido a la complejidad del sustrato que fue un polímero.

En los casos de *B. subtilis*, *B. weihenstephanensis* y *Planomicrobium sp.*, presentaron la primer velocidad específica de crecimiento máxima hasta la segunda semana, es decir una semana de retardo con respecto a las otras bacterias. La fase de adaptación duró una semana. En el caso de *B. weihenstephanensis* la velocidad de crecimiento fue prácticamente la misma en la segunda etapa, con estos datos se propone que probablemente estas tres bacterias tardaron más tiempo en adaptarse a la segunda fuente de carbono y a la posible presencia de acrilamida, producto de la degradación de la poli(acrilamida) y a los productos de esta como el poli(acrilato), acrilato y  $\beta$ -hidroxipropionato. Weng *et al.*, (2010), reportó que a mayor concentración de poli(acrilamida) la degradación es más difícil y también el crecimiento se vuelve más lento. En este caso los autores solo reportan densidades ópticas y observaron que al usar una mayor concentración de poli(acrilamida) estas disminuyen casi 10 veces.

Analizando el rendimiento de producto formado por biomasa producida durante el crecimiento bacteriano para estos medios de cultivo, no se evaluó la concentración de poli(acrilamida), por lo tanto no se reportó el rendimiento  $Y_p/s$ , en este caso se utilizó la producción de amonio.

Para el caso de *C. jejuni*, el rendimiento es bajo, pero la formación de amonio y la producción de biomasa es a causa del consumo de poli(acrilamida). En general los valores de rendimiento son bajos como en el caso de acrilamida,

Weng *et al.*, (2010), reportó que a mayor concentración de poli(acrilamida) la degradación es más difícil., con 50 mg/L de poli(acrilamida) indicaron un 70% de degradación, y con 1000 mg/L la degradación fue de 5 a 20%. Solo *Planomicrobium sp* dio un rendimiento de 0.118 gp/gs, lo cual correspondería a un 12 %. Lo anterior indica que se debe trabajar en las condiciones del medio para mejorar estos valores, como ya se había comentado anteriormente en el caso de la acrilamida.

La velocidad específica de consumo de sustrato  $q_s$  se calculó con la siguiente ecuación:  $q_s = r_s/x$  (g sustrato  $h^{-1}g_{biomasa}^{-1}$ ) y la velocidad específica de formación del producto  $q_p$ , se calculó de acuerdo a lo siguiente:  $q_p = r_p/x$  (g producto  $h^{-1}g_{biomasa}^{-1}$ ). Como se puede observar los valores de  $q_p$  y  $q_s$  fueron muy bajos tanto para la producción de amonio usando como sustrato acrilamida (tabla 15) o poli(acrilamida) (tabla 16), lo cual concuerda con los datos de crecimiento que fue muy lento en todos los casos y fue hasta la segunda y tercera semana

cuando empezó la producción de amonio. Al analizar los datos de velocidad específica de crecimiento y los valores de  $q_p$ , se encontró que la producción de amonio no está asociada al crecimiento, por lo que la estrategia para incrementar la obtención de estos productos consistiría en contar con una concentración celular elevada sometida a condiciones tales que el mantenimiento sea grande, lo cual podría lograrse, aumentando la tonicidad del medio y también modificando la temperatura o el pH (Ertola *et al.*, 1994). Para incrementar la densidad celular también podría incrementarse la concentración de glucosa de 50 mg/L a 200 mg/L (Wen *et al.*, 2010).

En la Tabla 17 se presentan los datos obtenidos de los cultivos de las siete cepas estudiadas de la densidad celular, la degradación de acrilamida, la producción de amonio liberado y actividad enzimática de imidasas a los 30 días de cultivo, donde se observa que *B. weihenstephanensis* es la bacteria que presenta la mayor densidad celular y mayor porcentaje de remoción de acrilamida, este resultado concuerda con la producción de amonio y corresponde con el valor de la actividad enzimática de imidasa, siendo el mayor valor de las siete bacterias estudiadas (Figura 25). Y en segundo lugar en cuanto a degradación de acrilamida, crecimiento celular, producción de amonio y actividad enzimática, se encuentra *B. subtilis* (Figura 24). Los resultados muestran que hubo un 97% de remoción de la acrilamida a los 30 días de cultivo por bacterias del género *Bacillus* (Tabla 17).

*Planomicrobium sp.* y *C. jejui* presentan un alto porcentaje de remoción pero baja producción de amonio (Tabla 17). *C. jejui* tiene la menor actividad enzimática de las siete bacterias estudiadas, es posible que la actividad o producción de la enzima sea inhibida por otros compuestos que se forman de la degradación de acrilamida. La relación actividad/biomasa es de alrededor de 0.30 para *Planomicrobium sp.*, *B. subtilis* y *B. weihenstephanensis* (datos no mostrados).

Los resultados anteriores concuerdan con lo informado por Shukor *et al.*, (2009b) con *Pseudomonas*, utilizando 0.5 g/L de acrilamida como única fuente de carbono y lograron una degradación del 30% en 4 días. En este trabajo se logró una degradación de aproximadamente de 2 g/L de acrilamida en 4 días, es decir una remoción del 60 % y del 97 % a los 30 días con *B. weihenstephanensis* y *B. subtilis*.



**Tabla 17. Biomasa, remoción de acrilamida, producción de amonio y actividad enzimática de imidasa en cultivos microbianos.**

Cepa	Biomasa (g/L)	Acrilamida residual (g/L)	Remoción de acrilamida (%)	Producción de amonio (g/L)	Actividad enzimática (A <sub>430nm</sub> )
	Biomasa final reportada	Mf		Mf	>Actividad reportada
<i>Arthrobacter luteolus</i>	1.18	1.24	38.8	0.0205	0.068
<i>Crocínobacterium jejui</i>	0.71	0.53	81.07	0.0309	0.066
<i>Planomicrobium sp.</i>	1.53	0.69	75.7	0.040	0.113
<i>Serratia marcescens</i>	1.19	1.62	50	0.008	0.08
<i>Bacillus subtilis</i>	1.74	0.19	97	0.545	0.167
<i>Kocuria rosea</i>	1.39	1.36	47.3	0.102	0.072
<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	3.97	0.079	97.35	0.880	0.256

Edad del cultivo 30 días. Concentración inicial de acrilamida 3 g/L. Mf = Datos de cultivo a los 30 días

En la tabla 18 se presenta el resumen de los datos obtenidos de biomasa, de producción de amonio y actividad enzimática de imidasa por la degradación de poli(acrilamida). Las cepas *Planomicrobium sp.*, *B. subtilis* y la *B. weihenstephanensis* son las que presentan mayor crecimiento celular, seguidas de la *C. jejui* y *Serratia marcescens*. Sin embargo, las cepas *B. subtilis* y *B. weihenstephanensis* tienen la mayor actividad enzimática, en segundo lugar se encuentran *C. jejui* y *Planomicrobium sp.* Por otro lado, la mayor producción de amonio es reportada en *Planomicrobium sp.*, *S. marcescens* y *B. weihenstephanensis*. Con estos resultados se puede concluir que *B. weihenstephanensis* es la que degrada poli(acrilamida) en un porcentaje mayor, posiblemente porque hay una mayor síntesis de la enzima que se refleja en el valor de la actividad de la enzima imidasa, siendo el mayor de todas las cepas estudiadas (Figura 29). También, *Planomicrobium sp.* y *B. subtilis* son la bacterias que degradan más cantidad de poli(acrilamida) de acuerdo a los datos obtenidos por la producción de amonio durante el proceso (Figuras 28 y 30). La relación actividad/biomasa es de alrededor de 0.3-0.5 para *Planomicrobium sp.*, *B. subtilis* y *B. weihenstephanensis* (datos no mostrados). Por otro lado, *A. luteolus* tiene la menor producción de amonio y valor de actividad enzimática. Posiblemente a mayor edad del cultivo (60 días aproximadamente) se pudiera observar una mayor degradación de poli(acrilamida) y mayor valor de la actividad enzimática de la imidasa.

**Tabla 18. Biomasa, producción de amonio y actividad de imidasa en cultivos microbianos con poliacrilamida**

No.	Cepa	Biomasa (g/L)	Producción de amonio (g/L)	Actividad enzimática (A <sub>430nm</sub> )
		Biomasa final	Mf	>Actividad reportada
1	<i>Arthrobacter luteolus</i>	1.27	0.043	0.060
2	<i>Crocino bacterium jeju</i>	1.40	0.051	0.122
3	<i>Planomicrobium sp.</i>	1.54	0.170	0.114
4	<i>Serratia marcescens</i>	1.40	0.063	0.105
5	<i>Bacillus subtilis</i>	1.49	0.176	0.109
6	<i>Kocuria rosea</i>	1.32	0.069	0.144
7	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	1.47	0.096	0.170

Edad del cultivo 30 días. Concentración inicial de poliacrilamida 1 g/L. Mf = Datos de los cultivos a los 30 días

Haveroen *et al.* (2005) reportaron que enzimas extracelulares de bacterias aeróbicas desaminan la poliacrilamida formando amonio que puede ser transportado dentro de la célula para usarlo como fuente de nitrógeno. *Azomonas macrocytogenes* y *Pseudomonas spp* demostraron capacidad de usar la poliacrilamida como fuente de nitrógeno. La cantidad de nitrógeno liberado fue de 0.2 g/L. Sugieren que la presencia de poliacrilamida puede estimular las actividades bacterianas como metanogénesis, en ambientes anaerobios. Pero no hay evidencia de que la poliacrilamida puede ser usada como fuente de carbono, debido al crecimiento limitado. Campos *et al.*, (2008).

*B. weihenstephanensis* tiene la mayor actividad enzimática, seguida por *K. rosea* y *C. jeju*, por lo cual estas bacterias son las que producen más enzima en el medio de cultivo para romper la cadena de poliacrilamida.

Se pensaría que la asimilación de poliacrilamida es más fácil, ya que el compuesto no es tóxico por las bacterias, pero con los datos obtenidos de amonio, la asimilación del monómero de acrilamida es mayor, es probable que se necesite más energía para romper la cadena del polímero y después asimilar los productos formados, que utilizar el monómero solo (Anexo 8).

La degradación de poliacrilamida se mide por parámetros como el crecimiento y producción de amonio. Las bacterias asiladas del tracto digestivo de *E. foetida*, que presentaron mayor crecimiento en el medio con poliacrilamida fueron *Planomicrobium sp*, *B. subtilis* y *B. weihenstephanensis*. Las de menor crecimiento son: *A.luteolus*, *C. jeju* y *S. marcescens*.

Caesar-TonThat *et al.* (2008) aislaron bacterias aeróbicas y heterotróficas del suelo tratado con poliacrilamida y observaron que la adición de poliacrilamida favorece el crecimiento y función de las bacterias en el suelo. Algunas de estas cepas son similares a las encontradas en este estudio.

Wen *et al.* (2009) en su investigación obtuvieron un 70% de eficiencia de remoción de poliacrilamida que es alcanzado a las 96 h a una concentración de 0.5 g/L por *B. cereus* y *B. flexus*, sus resultados indicaron que la PAM puede ser usada como fuente de carbono y encontraron que concentración de glucosa menor a 0.2 g/L mejora la degradación de poliacrilamida. Así mismo que, los grupos amido de la cadena son rotos o metabolizados o transformados o eliminados por las enzimas de las bacterias.

## 7. CONCLUSIONES

1. Se aislaron 42 cepas de bacterias del tracto digestivo de *E. foetida* en agar TSA. De estas, 14 cepas crecieron en medio de cultivo mínimo con 1 g/L de acrilamida como única fuente de carbono. Y siete cepas en medio de cultivo mínimo con 3 g/L de acrilamida
2. Se identificaron diez especies diferentes por pruebas bioquímicas comerciales, solo *Serratia marcescens* y *Bacillus subtilis*, coincidieron con los resultados de la caracterización molecular del 16S rARN y *Kocuria sp*, coincidió únicamente con el género.
3. Se identificaron 13 cepas bacterianas a nivel de género y de especie mediante la caracterización molecular de su 16S rARN: *Kocuria rosea*, *Serratia marcescens*, *Planomicrobium sp.*, *Arthrobacter oxydans*, *Microbacterium schleiferi*, *Bacillus subtilis*, *Arthrobacter luteolus*, *Crocino bacterium jeju*, *Paenibacillus sp.*, *Micrococcus yunnanensis*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Janibacter melonis* y *Kocuria sp*.
4. *B. subtilis*, *A. luteolus*, *C. jeju*, *S. marcescens*, *K. rosea*, *B. weihenstephanensis* y *Planomicrobium sp*, crecieron en medios de cultivo mínimo con 3 g/L de acrilamida
5. *B. subtilis*, *A. luteolus*, *C. jeju*, *S. marcescens*, *K. rosea*, *B. weihenstephanensis* y *Planomicrobium sp*, crecieron en medios de cultivo mínimo con 1 g/L de poliacrilamida.
6. *B. subtilis* y *B. weihenstephanensis* presentaron la mayor densidad celular y el mayor porcentaje de remoción de acrilamida (97%), acorde con la producción de amonio y con el mayor valor de la actividad de imidasa, de las siete bacterias estudiadas.
7. *B. weihenstephanensis* mostró ser la mejor productora de imidasas de acuerdo a los resultados obtenidos de dicha actividad enzimática en los medios de cultivo con acrilamida y poliacrilamida donde creció.
8. La mayor producción de amonio (0.170 g/L) se observó con *Planomicrobium sp.*, y *B. subtilis* cultivadas en medio mínimo con 1g/L de poliacrilamida, siendo dos veces mayor que la

concentración obtenida con *B. weihenstephanensis* y cuatro veces mayor a la obtenida con las otras bacterias usadas en el presente estudio.

9. *A. luteolus* y *K. rosea* probablemente consumen glucosa y acrilamida para degradar el compuesto. *S. marcescens* y *Planomicrobium sp.* necesitan incrementar su biomasa con un sustrato fácil de asimilar, para adaptarse a la acrilamida. *B. subtilis*, *B. weihenstephanensis* y *C. jejuni*, usan la acrilamida como fuente de carbono.
10. La mayoría de las cepas cultivadas en presencia de poliacrilamida, probablemente utilizaron la glucosa como fuente para incrementar su biomasa, y después adaptarse a la poliacrilamida. *C. jejuni* no presentó este comportamiento, consume poliacrilamida desde el principio.
11. Se esperaba velocidades de crecimiento lento de las siete bacterias cultivadas, este parámetro posiblemente fue afectado por la toxicidad de la acrilamida, la complejidad del polímero y la presencia de nuevos compuestos formados de la degradación. Esto se refleja en los valores de  $q_p$ ,  $q_s$  y en los rendimientos  $Y_{p/s}$  para acrilamida y  $Y_{p/x}$ . Una forma de mejorar estos parámetros es probar nuevas condiciones de cultivo.
12. Se demostró la producción de imidasa(s) en las siete cepas de bacterias cultivadas con acrilamida o con poliacrilamida, mediante la determinación de su actividad enzimática, la remoción de estos compuestos así como la producción de amonio.
13. Las bacterias aisladas e identificadas del tracto digestivo de *E. foetida*, no han sido reportadas como cepas que producen imidasas y/o participan en la degradación de acrilamida y/o poliacrilamida. Pero con los datos obtenidos es probable que las cepas degradan acrilamida y poliacrilamida, esta última en menor porcentaje.

## **PERSPECTIVAS**

- 1.- Estudiar la degradación de acrilamida y poliacrilamida con las siete bacterias hasta 60 días de incubación. Estudiar el efecto del pH y temperatura en dichos cultivos.
  
- 2.- Analizar las siete cepas que no se estudiaron en este trabajo, ya que no fueron tomadas en cuenta por crecer lento en acrilamida, pero si crecieron en poliacrilamida como única fuente de carbono.
  
- 3.- Llevar el estudio a nivel de un biorreactor de tanque agitado de 5 L.

## 8. REFERENCIAS

1. Acevedo, C.; Pelaez, J.; Gasca, G.; Guzman, C. 1998. Tecnología para la producción de lombricomposto.
2. Bao, M.; Chen, Q.; Li, Y.; Jiang, G.. 2010. Biodegradation of partially hydrolyzed polyacrylamide by bacteria isolated from production water after polymer flooding in an oil field. *Journal of Hazardous Materials*. 105-110.
3. Benitez, C.; Lucas, A.; Aispurú, G.; Alvarez, M.; Llanos, I.; Quintana, R.; Miño, C.; Aguirre, M.; Brandan, N. 2004. Efectos de un potencial hepatotóxico: la Acrilamida Monomérica, en un modelo murino. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad Nacional del Nordeste. Resumen M-078.
4. Black, C.A. 1995. Methods of soil analysis part 2, chemical and microbiological properties, in cheid in the series Agronomy. *American society of Agronomy inc.*, Editorial Madison, Wisconsin, USA, 1995.
5. Brito-Vega, H.; Espinosa-Victoria, D. 2009. Bacterial Diversity in the Digestive Tract of Earthworms (Oligochaeta). *Journal of Biological Sciences*. 9(3): 192-199.
6. Buranasilp, K.; Charoenpanich, J. 2011. Biodegradation of acrylamide by *Enterobacter aerogenes* isolated from wastewater in Thailand. *Journal of Environmental Sciences*. 23(3): 396–403.
7. Byzov, B.; Khomyakov, V.; Kharin, S. 2007. Fate of soil bacteria and fungi in the gut of earthworms. *European Journal of Soil Biology*. 43: 149-156.
8. Caesar-TonThat, T.; Busscher, W.; Novak, J.; Gaskin, J-F.; Kim, Y. 2008. Effects of polyacrylamide and organic matter on microbes associated to soil aggregation of Norfolk loamy sand. *Applied Soil Ecology*. 40: 240 – 249.
9. Campos, E.; Almirall, M.; Mtnes-Almela, J.; Palatsi, J.; Flotats, X. 2008. Feasibility study of the anaerobic digestion of dewatered pig slurry by means of polyacrylamide. *Bioresource Technology*. 99: 387–395.

10. Capdevila, J. 2007. Síntesis de cerámicos tecnológicos mediante métodos de combustión de geles de acrilamida. Universidad de Barcelona. Facultad de Química. [en línea]. [http://www.tdr.cesca.es/TESIS\\_UB/AVAILABLE/TDX-0510107-142216//08.XGC\\_CAP6.pdf](http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UB/AVAILABLE/TDX-0510107-142216//08.XGC_CAP6.pdf). 28 de Noviembre.
11. Cavins, J F., Friedman, M. 1968. Specific modification of sulfhydryl groups with beta-unsaturated compounds. *Journal of Biological Chemistry*, 243: 3357–3360.
12. Contreras-Ramos, S.; Ivarez-Bernal, D.; Dendooven, L. 2006. *Eisenia fetida* increased removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil. *Environmental Pollution*. 141:396-401.
13. Contreras-Ramos, S.; Ivarez-Bernal, D.; Dendooven, L. 2008. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil amended with biosolid or vermicompost in the presence of earthworms (*Eisenia fetida*). *Soil Biology & Biochemistry*. 40: 1954–1959.
14. Edwards, U.; Rogall, T.; Blocker, H.; Emde, M.; Bottger, E. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res*. 17:7843–7853.
15. Ertola R., Yantorno O., Mignone C. 1994. Microbiología Industrial Monografía OEA Reimpresión 2006. Departamento de Educación, Cultura, Ciencia y Tecnología. Derechos Reservados. Organización de los Estados Americanos 1889 F Street N.W. Washington, D.C. 20006, USA.
16. García-López & Alfaro-Macedo. 2007. Acrilamida en alimentos para consumo humano. *Rev Sanid Milit Mex*. 61(6): 384-388.
17. García, R.; Peralta, P. 2008. Cometabolismo en la biodegradación de hidrocarburos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 7(1): 1-12.
18. Geissen, V.; Gómez-Rivera, P.; Lwanga, E.; Mendoza, R.; Narcías, A.; Marcías, E. 2008. Using earthworms to test the efficiency of remediation of oil-polluted soil in tropical Mexico. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 71:638– 642.



19. Gomez-Eyles, J.; Collins, C.; Hodson, M. 2009. Relative proportions of polycyclic aromatic hydrocarbons differ between accumulation bioassays and chemical methods to predict bioavailability. *Environmental Pollution*. 158:278–284.
20. Gutiérrez, E.; Juárez, A.; Mondragón, J.; Rojas, L. 2007. Dinámica poblacional de la lombriz *Eisenia foetida* en estiércol composteado y fresco de bovino y ovino. *REDVET*. VIII (7): 1695-7504.
21. Gupta, R.; Garg, V. 2009. Vermiremediation and nutrient recovery of non-recyclable paper waste employing *Eisenia fetida*. *Journal of Hazardous Materials*. 162: 430–439.
22. Guzmán, C. 2008. Optimización del proceso de vermicomposteo de biosólidos industriales y su trascendencia en suelos alterados. Tesis de Licenciatura. UPIBI. IPN
23. Haveroen, M.; MacKinnon, M.; Fedorak, P. 2005. Polyacrylamide added as a nitrogen source stimulates methanogenesis in consortia from various wastewaters. *Water Research* 39:3333–3341.
24. Hyung-Jung, K.; Kwang-Hee, S.; Chang-Jun, C. & Hor-Gil, H. 2004. Analysis of Aerobic and Culturable Bacterial Community Structures in Earthworm (*Eisenia foetida*) Intestine. *Agric. Chem. Biotechnol.* 47(3): 137-142.
25. IUPAC. 2006. Nomenclatura de compuestos con grupos funcionales insaturados [en línea]. <http://www2.udec.cl/~organica/pregrado/nomencl3.htm>. 28 de Noviembre.
26. Klages, F. 2005. Química Orgánica sistemática. Tomo I. Editorial Reverte. España. 368-369.
27. Lee, C., Lin, Y., Tang, C.Y., Yang, Y. 2003. Identify Amino Acid Candidates Critical for Function of Rat Imidase by Cross-reference Voting in Imidase SuperFamily. In SAC. 127-134

28. Lin, L.; Hsu, W-H.; Hsu, W-Y.; Kan, S. & Hu, H. 2005. Phylogenetic analysis and biochemical characterization of a thermostable dihydropyrimidinase from *alkaliphilic Bacillus sp. TS-23*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 88: 189–197.
29. Longo A. S., Novella, I., Garcia, L., Diaz, Mario. 1999. Comparison Of *Bacillus Subtilis* And *Serratia Marcescens* As Protease Producers Under Different Operating Conditions. *Journaolf Bioscience And Bioengineering*. 88 (1): 35-40.
30. López, D. 2004. Evaluación del efecto de la densidad poblacional inicial y dos ambientes sobre el crecimiento de la lombriz roja californiana (*eisenia foetida*) en la ix región. Universidad Católica de Temuco. Chile. [en línea] <http://biblioteca.uct.cl/tesis/daniel-aguilera/tesis.pdf>. 1 de Diciembre.
31. López-Hernández, J. 2007. Detección de bacterias del tracto digestivo de la lombriz roja californiana por PCR. Tesis de Licenciatura. UPIBI. IPN
32. Maboeta, M. and Rensburg, L. 2003. Vermicomposting of industrially produced woodchips and sewage sludge utilizing *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 56: 265–270.
33. McMurry, J. 2008. Química orgánica. 7° Edición. Editorial Cengage Learning. 929.
34. Mendoza, L. 2008. Manual de lombricultura. CECYTECH-DG-UI-ENC-001. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. [en línea] <http://www.cecyltech.edu.mx/Pdf/manuallombricultura.pdf>. 1 de Diciembre.
35. Molinares, R. 2006. Identificación y caracterización de las bacterias asociados a la pared intestinal de *onchochaeta borincana* (oligochaeta: glossoscolecidae). Universidad de Puerto Rico. Biología.
36. Monge-Amaya, O.; Valenzuela-García, J.; Acedo-Félix, E.; Certucha-Barragan, M.; Almendáriz-Tapia, F. 2008. Biosorción de cobre en sistema por lote y continuo con bacterias aerobias inmovilizadas en zeolita natural (clinoptilolita). *Rev. Int. Contam. Ambient*. 24 (3): 107-115

37. Moreno, N.; Rubio, A.; Gutiérrez, F.; Cameán, F. & Hardisson de la Torre, A. 2007. La acrilamida, como contaminante químico de procesado: Revisión. *Rev. Toxicol.* 24: 1-9.
38. Ogawa, J.; Soog, C.; Honda, M. & Shimizu, S. 1996. Novel Metabolic Transformation Pathway for Cyclic Imides in *Blastobacter sp. Strain A17p-4*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(10): 3814-3817.
39. Ogawa, J.; Soong, C.; Honda, M. and Shimizu, S. 1997. Imidase, a dihydropyrimidinase-like enzyme involved in the metabolism of cyclic imides. *Eur. J. Biochem.* . 243:322-327.
40. Pacheco, A. 2010. Humus: Mejorando suelos y complementado la fertilización. [en línea] <http://guarico.com.ve/?p=1968>. 29 de Junio.
41. Peláez, C.; Mejía, A.; Planas, A. 2004. Development of a solid phase kinetic assay for determination of enzyme activities during composting. *Process Biochemistry*.39:971-975.
42. Prabu, C.; Thatheyus, A. 2007. Biodegradation of acrylamide employing free and immobilized cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 60: 69–73.
43. Rieg, S.; Bauer, T.; Peyerl-Hoffmann, G.; Held, J.; Ritter, W.; Wagner, D.; Vinzenz, W.. & Serr, A. 2010. Paenibacillus larvae Bacteremia in Injection Drug Users. *Emerging Infectious Diseases*. 16 (3):487-489.
44. Rodríguez, L.; Martínez, R. 2006. Manual de laboratorio de Bioquímica Microbiana. UPIBI. 10.
45. Rodríguez, R. 2010. Aprovechamiento de residuos orgánicos a través de composteo y lombricomposteo. U.A.A.A.N. Departamento de Fitomejoramiento [en línea]

[http://www.uaaan.mx/academic/Horticultura/Memhort05/aprov\\_residuos.pdf](http://www.uaaan.mx/academic/Horticultura/Memhort05/aprov_residuos.pdf). 24 de Noviembre.

46. Schaefer, M.; Petersen, O.; Filser, J. 2005. Effects of *Lumbricus terrestris*, *Allolobophora chlorotica* and *Eisenia fetida* on microbial community dynamics in oil-contaminated soil. *Soil Biology & Biochemistry*. 37: 2065–2076.
47. Seok, O., Byung-Gee, K., Hyun, P. 2002. Importance of specific growth rate for subtilisin expression in fed-batch cultivation of *Bacillus subtilis spoIIIG* mutant. *Enzyme and Microbial Technology*. 30: 747–751.
48. Shi, Y.; Cui, L.; Yuan, J. 2007. Gene Cloning, Expression, and Substrate Specificity of an Imidase from the Strain *Pseudomonas putida* YZ-26. *CURRENT MICROBIOLOGY*. 55: 61–64.
49. Shukor, M.; Gusmanizar, N.; Azmi, A.; Hamid, M.; Ramli, J.; Shamaan, N.; Syed, M. 2009a. Isolation and characterization of an acrylamide degrading *Bacillus creus*. *J. Environ. Biol.* 57-64.
50. Shukor, M. Y; Gusmanizar, N; Ramli, J; Shamaan, N. A; Maccormack, W. P. & Syed, M. A. 2009b. Isolation and characterization of an acrylamide-degrading *Antarctic bacterium*. *J. Environ. Biol*, 30(1), 107-112.
51. Silva, O. 2010. *Serratia marcescens*. *Rev. chil. infectol.*, 27: 209-210.
52. Smith, E.; Prues, S. and Oehme, F. 1996. Environmental Degradation of Polyacrylamides. 1. Effects of Artificial Environmental Conditions: Temperature, Light, and pH. *ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY*. 35:121–135.
53. Soong, C.; Ogawa, J.; Sukiman, H.; Prana, T.; Prana, M.; Shimizu, S. 1998. Distribution of cyclic imide-transforming activity in microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*. 158:51-55.

54. Su, T.; and Yang, Y. 2000. Identification, Purification, and Characterization of a Thermophilic Imidase from Pig Liver. *Protein Expression and Purification*. 19:289–297.
55. Sylđatk, O., C; Altenbuchner, R., M; Siemann, M. 1999. Microbial hydantoinases ± industrial enzymes from the origin of life? *Appl Microbiol Biotechnol*. 51: 293-309.
56. Tai, Y.; Lee, C.; Yang, Y. 2006 Evolutional relationship between imidase from legume and *Rhizobium leguminosarum*. National Chiao Tung University, Hsinchu, Taiwan 300, R.O.C. Dept. of Biological Science and Technology.
57. Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; Kumar, S. 2007. MEGA4. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*. 24(8): 1596-1599.
58. Tripathi, G.; Bhardwaj, P. 2004. Comparative studies on biomass production, life cycles and composting efficiency of *Eisenia fetida* (Savigny) and *Lampito mauritii* (Kinberg). *Bioresource Technology*. 275–283.
59. Tyl, R.; Friedman, M. 2003. Effects of acrylamide on rodent reproductive performance. *Reproductive Toxicology*. 17:1-13.
60. Vivas, A.; Moreno, B.; Garcia-Rodriguez, S.; Benitez, E. 2009. Assessing the impact of composting and vermicomposting on bacterial community size and structure, and microbial functional diversity of an olive-mill waste. *Bioresource Technology*. 100:1319–1326.
61. Wampler, D. & Ensign, S. 2005. Photoheterotrophic Metabolism of Acrylamide by a Newly Isolated Strain of *Rhodopseudomonas palustris*. *Applied and Environmental Microbiology*. 71 (10): 5850-5857.
62. Wang, C-C.; Lee, C-M. 2007. Isolation of the Acrylamide Denitrifying Bacteria from a wastewater Treatment System Manufactured with Polyacrylonitrile Fiber. *Curr Microbiol*. 55:339-343.

63. Wauters, G.; Charlier, J.; Janssens, M. & Delmée, M. 2000. Identification of *Arthrobacter oxydans*, *Arthrobacter luteolus* sp. nov., and *Arthrobacter albus* sp. nov., Isolated from Human Clinical Specimens. *J Clin Microbiol.* 38(6): 2412–2415.
64. Wen, Q.; Chen, Z.; Zhao, Y.; Zhang, H.; Feng, Y. 2009. Biodegradation of polyacrylamide by bacteria isolated from activated sludge and oil-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials.* Xxx: xxx–xxx.
65. Ya-Wei, S.; Xiao-Qin, L.; Peng, S.; Xue-Yao, Z. 2010. Characterization of zinc-binding properties of a novel imidase from *Pseudomonas putida* YZ-26. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 494: 1–6
66. Yoon, J.-H.; Lee, H. B.; Yeo, S.-H.; & Choi, J.-E. 2004. *Janibacter melonis* sp. nov., isolated from abnormally spoiled oriental melon in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54:1975-1980.

## **NORMAS**

1. NMX-AA-137-SCFI-2007  
POTABILIZACIÓN DEL AGUA PARA USO Y CONSUMO HUMANO –  
POLIACRILAMIDAS – ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA

## 9. ANEXOS

### ANEXO 1

Para determinar la concentración de glucosa se debe preparar una curva de calibración y las muestras como se muestra en la siguiente tabla:

Tubo	Blanco	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	M *
Medio (µL)	600	570	540	480	420	360	300	240	180	120	60	-	-
Glucosa (300µg/mL)(µL)	-	30	60	120	180	240	300	360	420	480	540	600	-
Reactivo Ac 3.5 DNS (µL)	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400
Muestra *													600

Las muestras se tratan como la fila y columna M\*. Todos los tubos se colocan en baño maría a ebullición durante 5 minutos.

Enfriar en baño de hielo y leer en el espectrofotómetro a 540 nm ajustando con el blanco.

Para preparar el reactivo del Ácido 3,5 Dinitrosalisílico:

Pesar 5.3 g del Ac. 3,5 DN y 9.9 g de NaOH en 700 mL de agua destilada. Adicionar uno a uno, resolviendo primero antes de adicionar el siguiente, los reactivos: 153 g de tartrato de sodio y potasio, 8.8 g de fenol y 4.16 g de metabisulfito de sodio, en ese orden.

**ANEXO 2**

**Tabla 19. Morfología colonial de las bacterias aisladas de *E. foetida***

Bacteria	Tamaño (cm)	Color	Forma	Elevación	Borde	Luz Reflejada	Luz transmitida
1-1-2-col ama	0.3	Amarilla	Circular	Convexa	Entero	Brillante	Translúcida
3-2	0.5	Anaranjado	Irregular	Convexa	Ondulado	Brillante	Translúcida
4-1	0.5	Amarilla	Circular	Convexa	Entero	Brillante	Translúcida
4-2	0.5	Amarilla	Circular	Convexa	Entero	Brillante	Translúcida
5	0.4	Blanca	Irregular	Plana	Entero	Mate	Transparente
5 col ama	0.2	Amarilla	Circular	Convexa	Entero	Brillante	Translúcida
5 col ana	0.2	Anaranjado	Circular	Convexa	Entero	Brillante	Translúcida
5 col blanca blanca	0.5	Blanca	Irregular	Plana	Ondulado	Mate	Translúcida
5 col blanca 2	0.5	Blanca	Circular	Convexa	Entero	Brillante	Translúcida
5 col b/ana							
6-1	0.2	Blanca	Circular	Convexa	Entero	Brillante	Translúcida
6-2	0.1	Blanca	Circular	Convexa	Entero	Mate	Translúcida
7N	0.2	Blanca	Circular	Plana	Entero	Brillante	Translúcida
7B	0.2	Blanco/ Anaranjado	Circular	Plana	Entero	Mate	Translúcida
7Rosa	0.2	Rosa	Circular	Plana	Entero	Brillante	Transparente
7R	0.1	Rosa	Circular	Plana	Entero	Mate	Transparente
8R'	0.5	Blanca	Circular	Convexa	Entero	Brillante	Translúcida
8''2	0.2	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Mate	Transparente
9-1-A	0.3	Blanca	Circular	Plana	Entero	Mate	Transparente
9-1-1	0.2	Anaranjado/r ojo	Circular	Plana	Entero	Mate	Translúcida
9-1	0.2	Rojo	Circular	Convexa	Ondulado	Brillante	Translúcida
9-2							
9-2-R	0.2	Rojo/rosa	Irregular	Convexa	Entero	Brillante	Translúcida



9-2ana	0.4	Rojo/ Anaranjado	Circular	Convexa	Ondulado	Mate	Translúcida
10cc1	0.2	Blanca	Irregular	Umbilicada	Ondulado	Mate	Translúcida
10cc2	0.5	Blanca	Irregular	Umbilicada	Ondulado	Mate	Translúcida
10cc2-1	0.2	Blanca	Circular	Plana	Ondulado	Brillante	Translúcida
11-A-1	0.5	Blanca	Circular	Convexa	Entero	Mate	Translúcida
11ana1*							
11ana1	0.5	Anaranjado	Circular	Plana	Entero	Brillante	Translúcida
11ana(1)							
11-2	0.3	Anaranjado	circular	Plana	Ondulado	Mate	Transparente
11ana2*							
11 ana 2	0.3	Anaranjado	circular	Plana	Ondulado	Mate	Transparente
11ana2*ana- blanca	0.4	Blanca	Irregular	Plana	Entero	Brillante	Translúcida
11ana2*ana b/ana	0.5	Anaranjado claro	Circular	Convexa	Entero	Brillante	Translúcida
11	0.4	Anaranjado oscuro	Circular	Plana	Ondulado	Mate	Translúcida
13 AST	0.5	Anaranjado claro	Irregular	Convexa	Ondulado	Brillante	Transparente
15-1	0.2	Blanco	Irregular	Plana	Ondulado	Mate	Transparente
15-1-B	0.2	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Mate	Translúcida
15-1-R	0.2	Rojo	circular	Convexa	Entero	Brillante	Translúcida
15-2	0.2	Rojo	Circular	Convexa	Entero	Brillante	Translúcida

ANEXO 3

Tabla 20. Resultados de Prueba de Gram

Bacteria	Forma	Gram
1-1-2-col ama	Coco	Positivo
3-2	Coco	Positivo
4-1	Coco	Positivo
4-2	Coco	Positivo
5	Coco	Positivo
5 col ama	Coco	Positivo
5 col ana	Bacilo	Positivo
5 col blanca blanca	Bacilo	Negativo
5 col blanca 2	Bacilo	Positivo
5 col b/ana	Bacilo	Negativo
6-1	Coco	Negativo
6-2	Coco	Negativo
7N	Coco	Negativo
7B	Coco	Positivo
7Rosa	Coco	Positivo
7R	Coco	Positivo
8R'	Coco	Negativo
8''2	Coco	Negativo
9-1-A	Coco	Positivo
9-1-1	Coco	Negativo
9-1	Bacilo	Negativo
9-2	Coco	Negativo
9-2-R	Coco	Negativo
9-2ana	Bacilo	Negativo
10cc1	Bacilo	Positivo
10cc2	Bacilo	Positivo
10cc2-1	Coco	Negativo
11-A-1	Coco	Negativo
11ana1*	Bacilo	Negativo
11ana1	Coco	Negativo
11ana(1)	Coco	Positivo
11-2	Coco	Negativo
11ana2*	Coco	Positivo
11 ana 2	Coco	Positivo
11ana2*ana-blanca	Coco	Positivo
11ana2*ana b/ana	Bacilo	Positivo
11	Coco	Positivo
13 AST	Coco	Negativo
15-1	Coco	Negativo
15-1-B	Cocobacilo	Negativo
15-1-R	Cocobacilo	Negativo
15-2	Bacilo	Negativo



<b>SAC</b>	Fermentación/oxidación de sacarosa	-	+	+	+	-	+	+	+
<b>MEL</b>	Fermentación/oxidación de melobiosa	-	+	+	+	-	+	-	-
<b>AMY</b>	Fermentación/oxidación de amigdalina	-	+	+	+	-	+	+	+
<b>ARA</b>	Fermentación/oxidación de arabinosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacteria identificada		<i>Alcaligenes spp.</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Xhantomonas maltophilia</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>

Tabla 22. Resultados de las pruebas bioquímicas de bacterias gran positivas. Pruebas BBL Crystal

Prueba	Reacción	Bacterias Gram positivas															
		1-1-2-col ama	3-2	4-1	4-2	7B	7 Rosa	5 blanca 2	5 col ana	5 col ama	10cc1	10cc2	11 ana 1 (1)	11 ana 2*	11 ana 2* blanca	11 ana 2* b/ana	11
FCT	Control negativo Fluorescente	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FGC	4MU-β-D- glucosida	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FPR	L-prolina- AMC	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
FAR	L-arginina- AMC	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-
FME	L-metionina- AMC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-
FCE	4MU-β-D- celobiosa	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+
FHO	4MU-fosfato	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
FPY	L-ácido piroglútamico- AMC	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-

<b>FTR</b>	L-triptofano-AMC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+
<b>FVA</b>	L-valina-AMC	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<b>FPH</b>	L-felilalanina-AMC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<b>FGS</b>	4MU- $\alpha$ -D-glucosida	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
<b>ARA</b>	Arabinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>MAL</b>	Maltosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<b>DXT</b>	Dextrina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<b>MNT</b>	Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>GAL</b>	Galactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>AGN</b>	N-acetil-D-glucosamina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<b>TRE</b>	Trihalosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<b>MNS</b>	Manosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>MTT</b>	Maltotriosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<b>POG</b>	ONPG & p-n-p- $\beta$ -D-glucosida	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+
<b>AGL</b>	p-n-p- $\beta$ -D-glucosida	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
<b>PCE</b>	p-n-p- $\alpha$ -D-celobiosida	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
<b>BGL</b>	p-n-p- $\beta$ -D-glucosida	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+
<b>PHO</b>	p-n-p-fosfato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
<b>PPG</b>	p-n-p- $\beta$ -D-galactosida & p-n-p- $\alpha$ -D-galactosida	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<b>URE</b>	Urea	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-

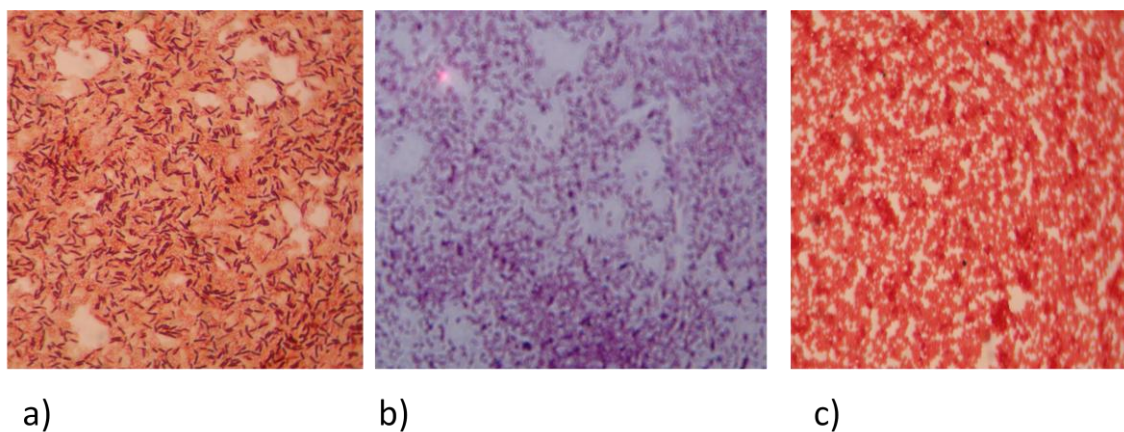
ESC	Esculina	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
ORN	Ornitina	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+
Bacteria Identificada																	
		<i>Micrococcus luteus</i>															
		<i>Kocuria sp.</i>															
		<i>Micrococcus luteus</i>															
		<i>Micrococcus luteus</i>															
		<i>Micrococcus luteus</i>															
		<i>Kocuria sp.</i>															
		<i>Bacillus pumilus</i>															
		<i>Paenibacillus sp.</i>															
		<i>Micrococcus luteus</i>															
		<i>Bacillus subtilis</i>															
		<i>Bacillus subtilis</i>															
		<i>Kocuria rosea</i>															
		<i>Kocuria rosea</i>															
		<i>Bacillus cereus</i>															
		<i>Micrococcus luteus</i>															
		<i>Staphylococcus sciuri</i>															



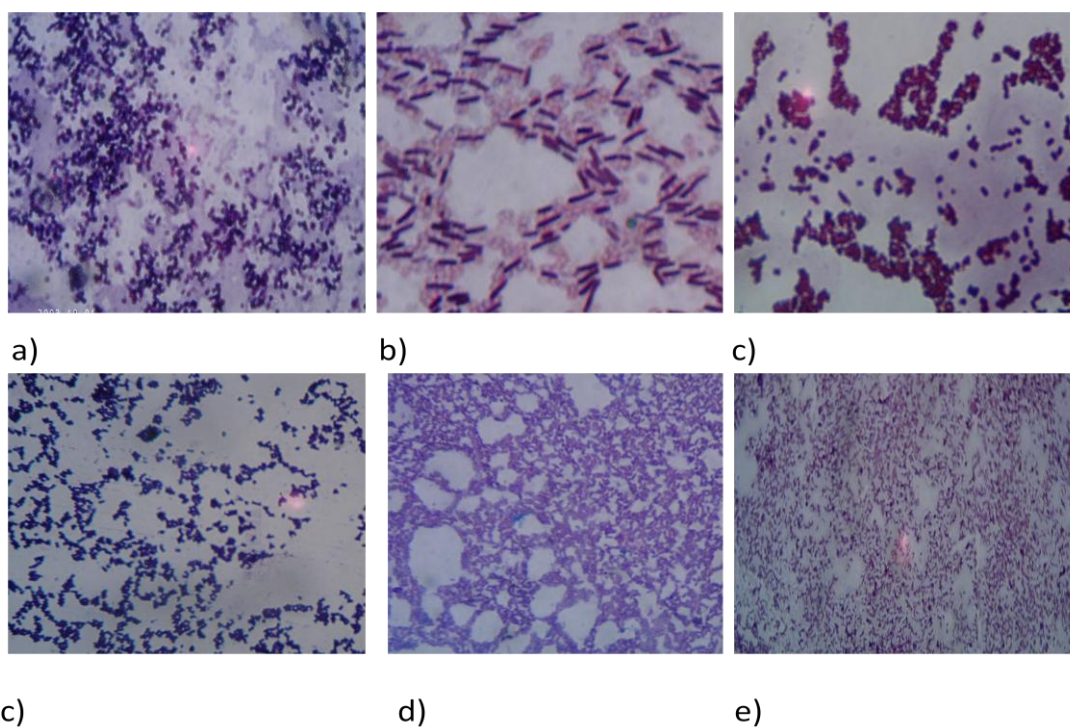
Figura 31. Pruebas Bioquímicas API 20E de algunas bacterias asiladas de *E. foetida*.



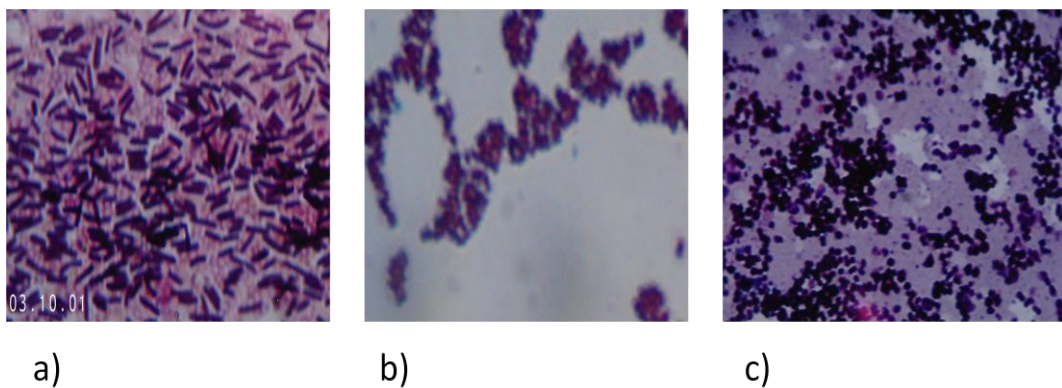
ANEXO 5



**Figura 32. Morfología microscópica de bacterias gram negativas. a) 5 blanca blanca, b) 9-2-R, c) 15-1-b**



**Figura 33. Morfología microscópica de bacterias gram positivas. a) 4-2, b) 10 cc2, c) 11 ana 2\* b/ana, d) 11 ana 1(1) y e) 7B**



**Figura 34. Morfología microscópica de bacterias gram positivas: a) 10 cc1, b) 11 y c) 1-1-2 col ama**

## ANEXO 6

### Ejemplo de Secuencia Completas Gram positiva

#### 1-1-2- col ama

GNNNGTNTGNGNNGCTAAACTGCAGTCGACGATGAAGCCCGGCATGCTGGGTG  
GATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTAACTCTGGGAT  
AAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGAGCGTCCACCGCATGGTGGGT  
GTTGGAAAGATTTATCGGTTTTGGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGA  
GGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGC  
CACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT  
ATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGC  
CTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCA  
GAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGA  
GCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTTGTCGCGTCTGT  
CGTGAAGTCCGGGGCTTAACCCCGGATCTGCGGTGGGTACGGGCAGACTAGAG  
TGCAGTAGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGG  
AGGAACACCGATGGCGAAAGCAGATCTGCGGTGGGTACGGCAGACTAGAGTGCA  
GTAGGGAGACTGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGAAC  
ACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCAT  
GGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGTTGGGCAC  
TAGGTGTGGGGACCATTCCACGGTTTCCGCGCCGCGAGCTAACGCATTAAGTGCC  
CCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC  
GCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCA  
AGGCTTGACATGTTCTCGATCGCCGTAGAGATACGGTTTTCCCTTTGGGGCGGGT  
TCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAA  
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCCATGTTGCCAGCACGTAGTGGTGGGGA  
CTCATGGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGAGGACGACGTCAAATC  
ATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTTACGCATGCTACAATGGCCGGTACAATGGG  
TTGCGATACTGTGAGGTGGAGCTAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGG  
GGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTTCGGAGTTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAAC  
GCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGTCACGAAA  
GTCGGTAACACCCGAAGCCGNGAGCCGAACCTCAGGCTCGAGCCGTACNNNTAN  
AGCGNCANCNAGNNNNNNN

### Ejemplo de secuencias completas de bacterias gram negativas

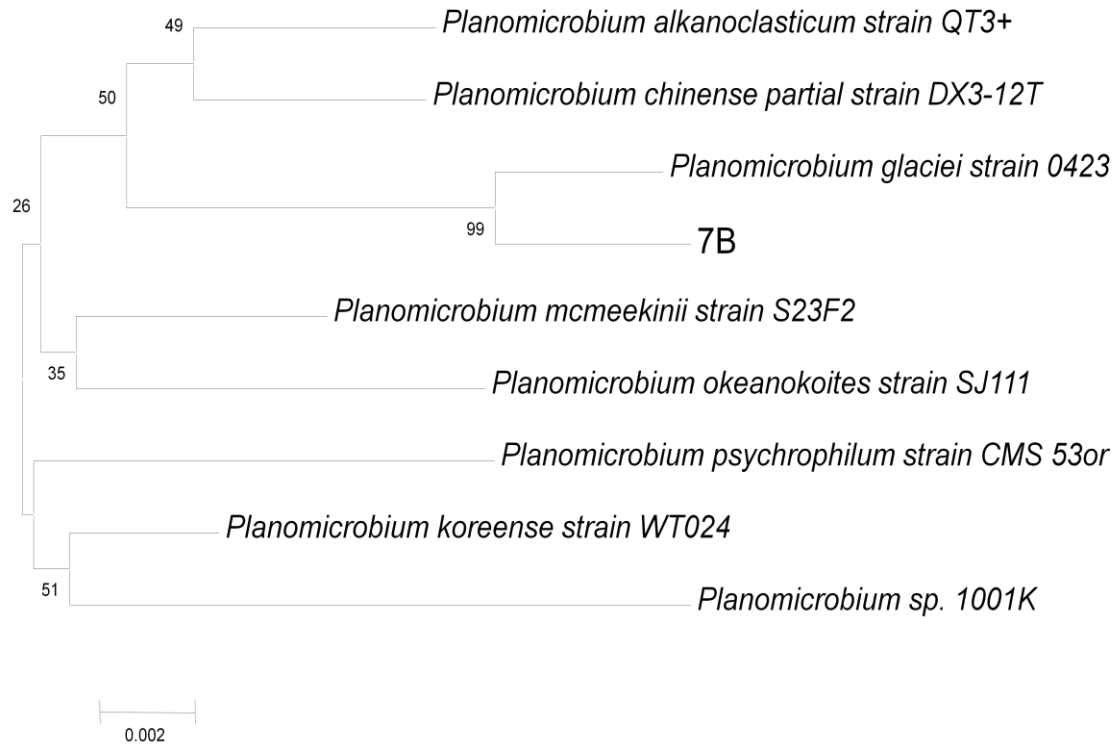
#### 9-2-R

NNCATNNCGNNGCTTACACATGCAGTCGAGCGGTAGCACAAAGGGAGCTTGCTCC  
TGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAG  
GGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCAAGACCAAAGA  
GGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTA  
GGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGAC  
CAGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG  
GAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAA  
GGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGGTGGGCTTAATAC  
GCTCATCAATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAG  
CCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGC  
ACGCAGGCGGTTTTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGGCTCAACCCTGGGAA

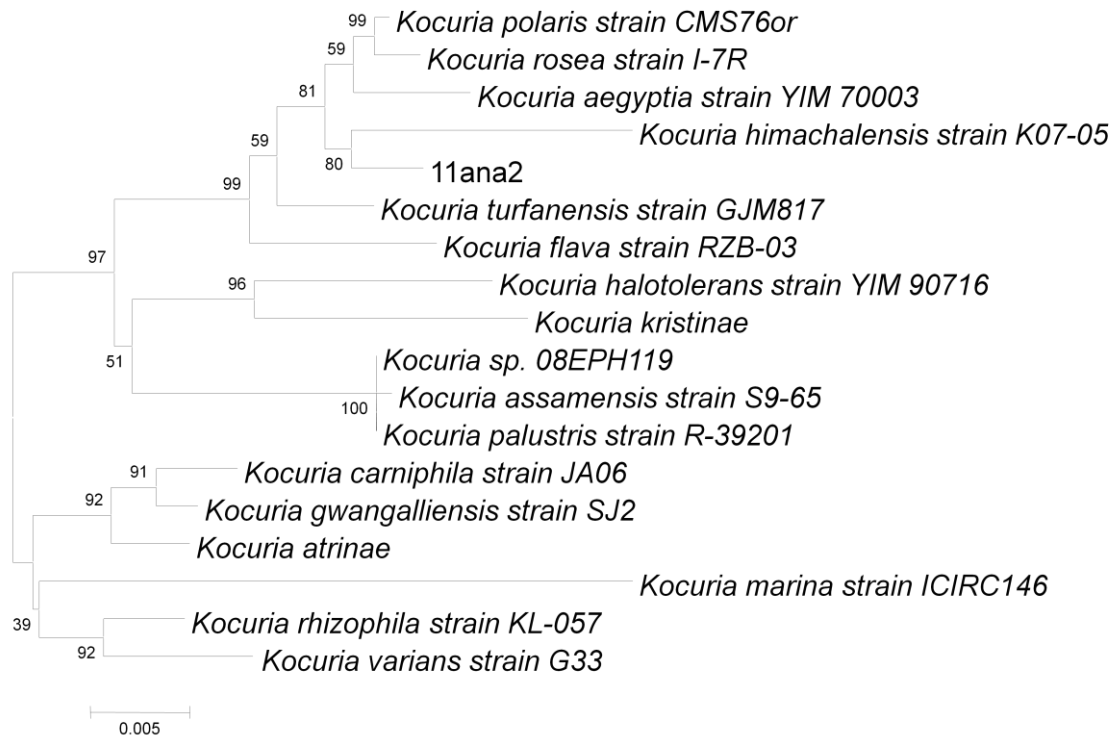
CTGCATTTGAAACTGGGCAAGCTAGAGTTCTCGTAGAGGGGGGTAGGAAATNCCA  
AGGTGTAGCCGGTGGAAATGCGTAGGAGAATCTTGGAAGGGAATACCGGGTGGG  
CGAAAGGCGGCCCCCTGGGANGAAAGACTGGAGCGTTTGTAAAGGTCAGAATGT  
GAAATGGGCTCAACCTTGGAAGTGCCTTTGAAACTGCAAGCTAGAGTCTTCGTAG  
ANAGGGGGTAGAANNAGGTGTAGCGGTTAAATGCGTAGANGATTCTGGAGGAAT  
ACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAAGACTGACGCTCCAGGTGCGGAA  
AGCGGTGGGGGAGCAAACAGGATAGATACCNGGTAGNCCACCGCTGTAAACGAT  
GTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAAT  
CGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGG  
CCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTAC  
CTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACTC  
TGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAG  
TCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTCCGGCCGGGAACT  
CAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAT  
CATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAAAGAGAA  
GCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTACGTCGTAGTCCGGATTGGA  
GTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGC  
TACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGG  
GTTTGCAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTANNANNTTGGATN  
NTNNCNN

## ANEXO 7

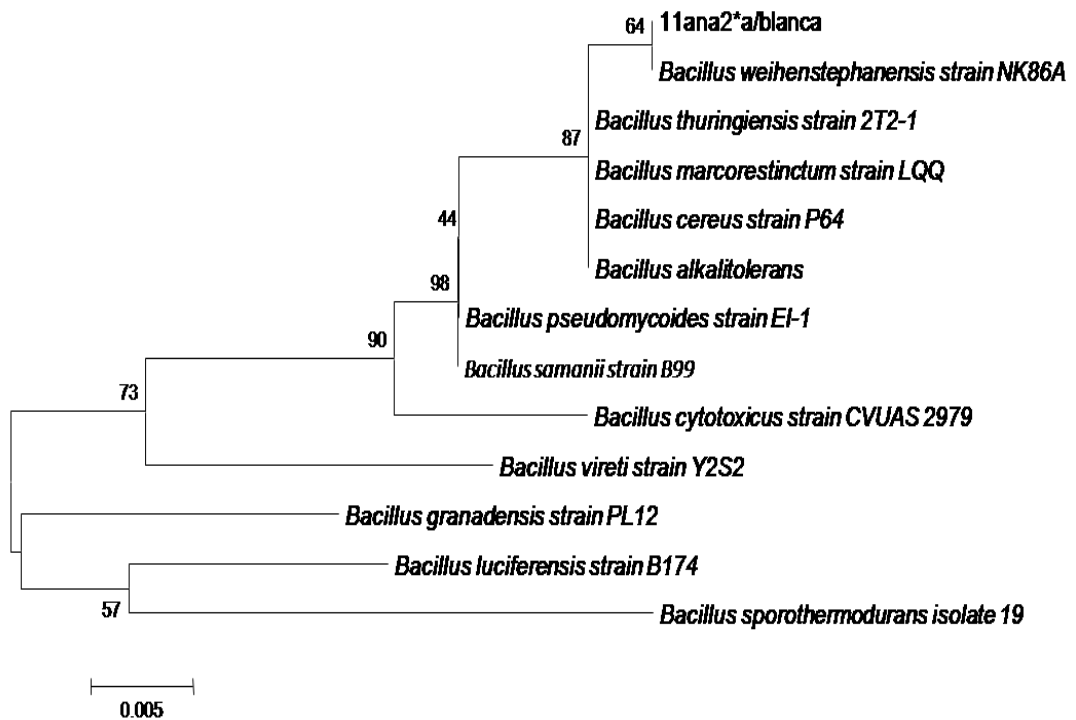
Ejemplos de árboles filogenéticos:



**Figura 35. Posición filogenética de la bacteria 7B. El árbol se construyó con secuencias completas. El árbol está dibujado a escala con las longitudes de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol. Se utilizó el algoritmo “Neighbor-joining” y método de Tamura-nei. La bacteria 7B tiene una similitud del 99% con *Planomicrobium* sp.**



**Figura 36. Posición filogenética de la bacteria 11 ana2\*. El árbol se construyó con secuencias completas. El árbol está dibujado a escala con las longitudes de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol. Se utilizó el algoritmo “Neighbor-joining” y método de Tamura-nei. La bacteria 11 ana2\* tiene una similitud del 80% con *Kocuria himachalensis*.**



**Figura 37. Posición filogenética de la bacteria 11 ana2\*anablanca. El árbol se construyó con secuencias completas. El árbol está dibujado a escala con las longitudes de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol. Se utilizó el algoritmo "Neibor-joining" y método de Tamura-nei. La bacteria 11 ana2\*anablanca tiene una similitud del 64% con *Bacillus weihenstephanensis***

ANEXO 8

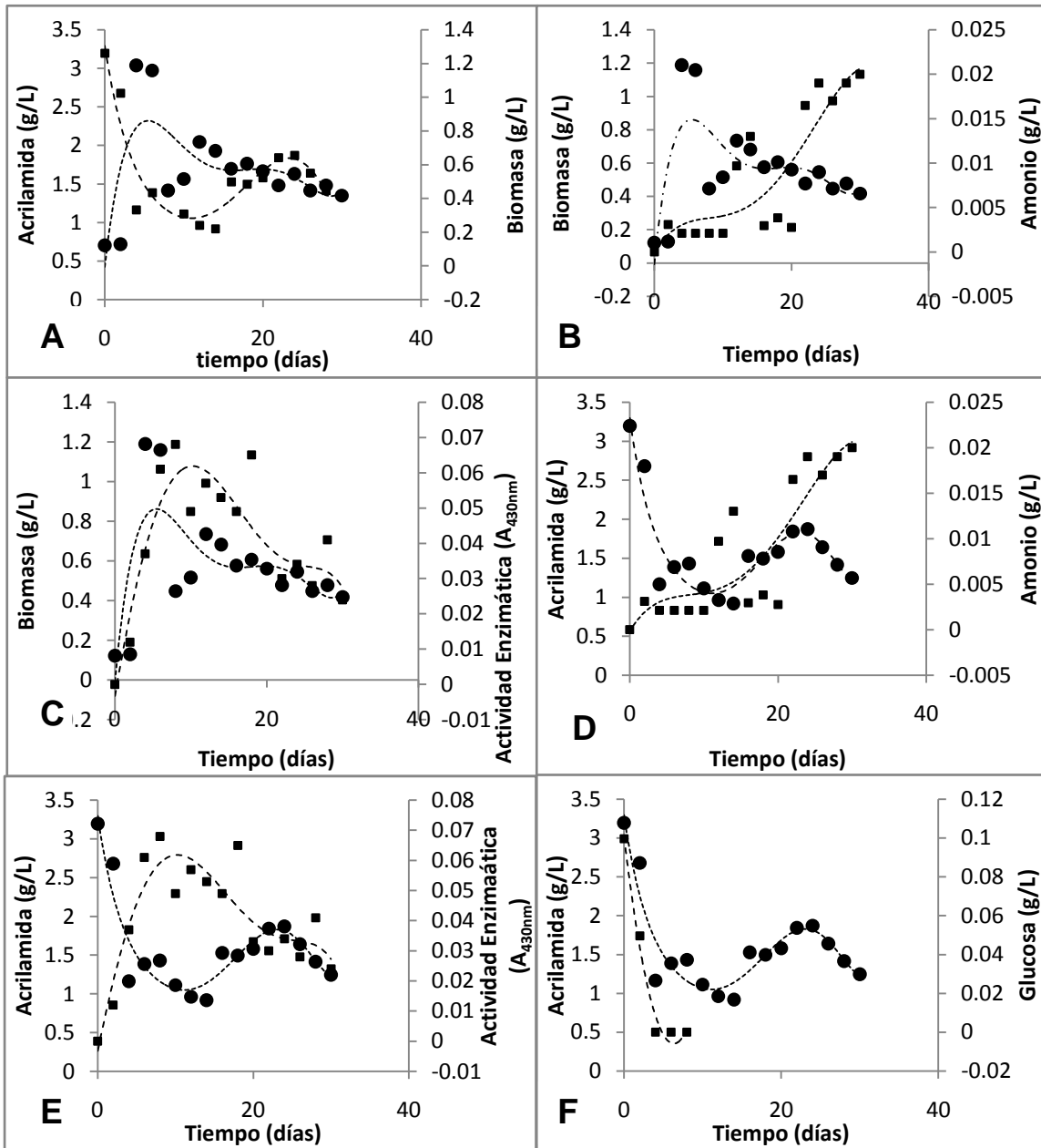


Figura 38. Degradación de acrilamida por *Arthrobacter luteolus*: A) (●) Biomasa-(■) Acrilamida residual, B) (●) Biomasa-(■) Producción de amonio, C) (●) Biomasa-(■) Actividad enzimática, D) (●) Acrilamida residual-(■) producción de amonio, E) (●) Acrilamida residual-(■) Actividad enzimática y F) (●) Acrilamida residual-(■) Consumo Glucosa.



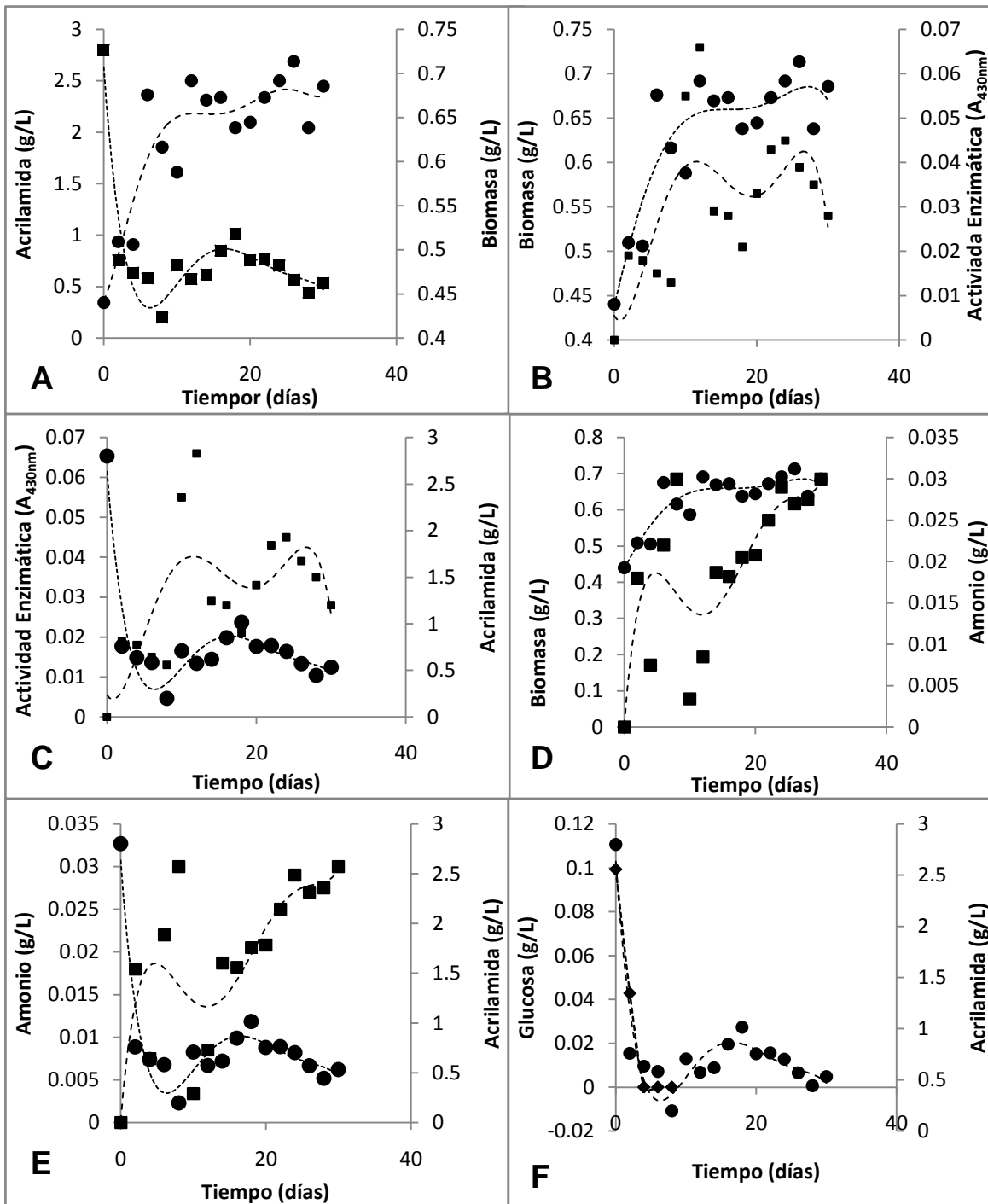


Figura 39. Degradación de acrilamida por *Crocinobacterium jejui*: A) (●) Biomasa (- ■ -) Acrilamida residual, B) (●) Biomasa (- ■ -) Actividad enzimática, C) (●) Acrilamida residual (- ■ -) Actividad enzimática, D) (●) Biomasa, (- ■ -) Producción de amonio, E) (●) Producción de amonio (- ■ -) Acrilamida residual y F) (●) Acrilamida residual (- ■ -) Consumo Glucosa.

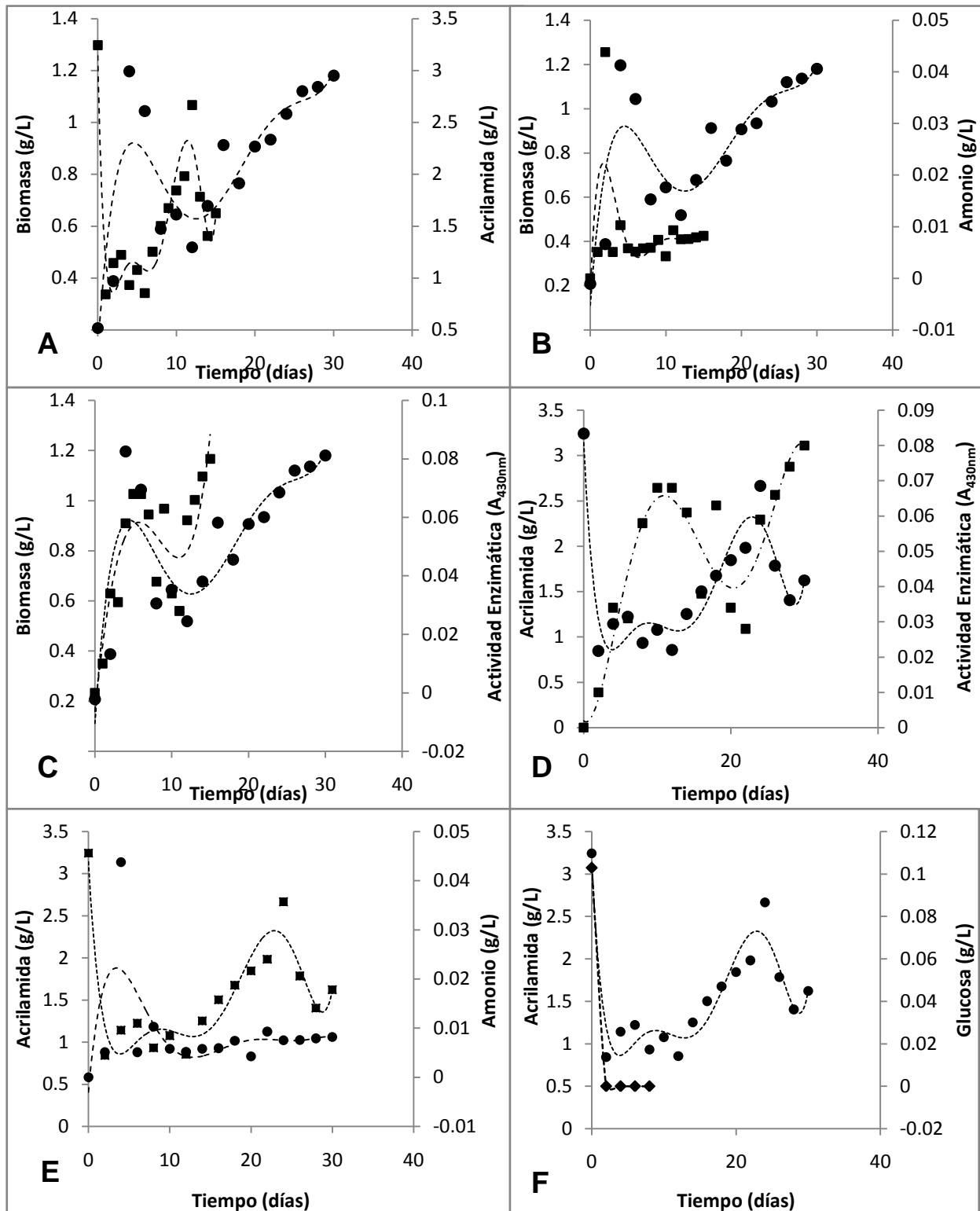


Figura 40. Degradación de acrilamida por *Serratia marcescens*: A) (---●---) Biomasa (---■---) Acrilamida residual, B) (---●---) Biomasa (---■---) Producción de amonio, C) (---●---) Biomasa (---■---) Actividad enzimática, D) (---●---) Acrilamida residual (---■---) Actividad enzimática, E) (---●---) Acrilamida residual (---■---) Producción de amonio y F) (---●---) Acrilamida residual (---■---) Consumo Glucosa.

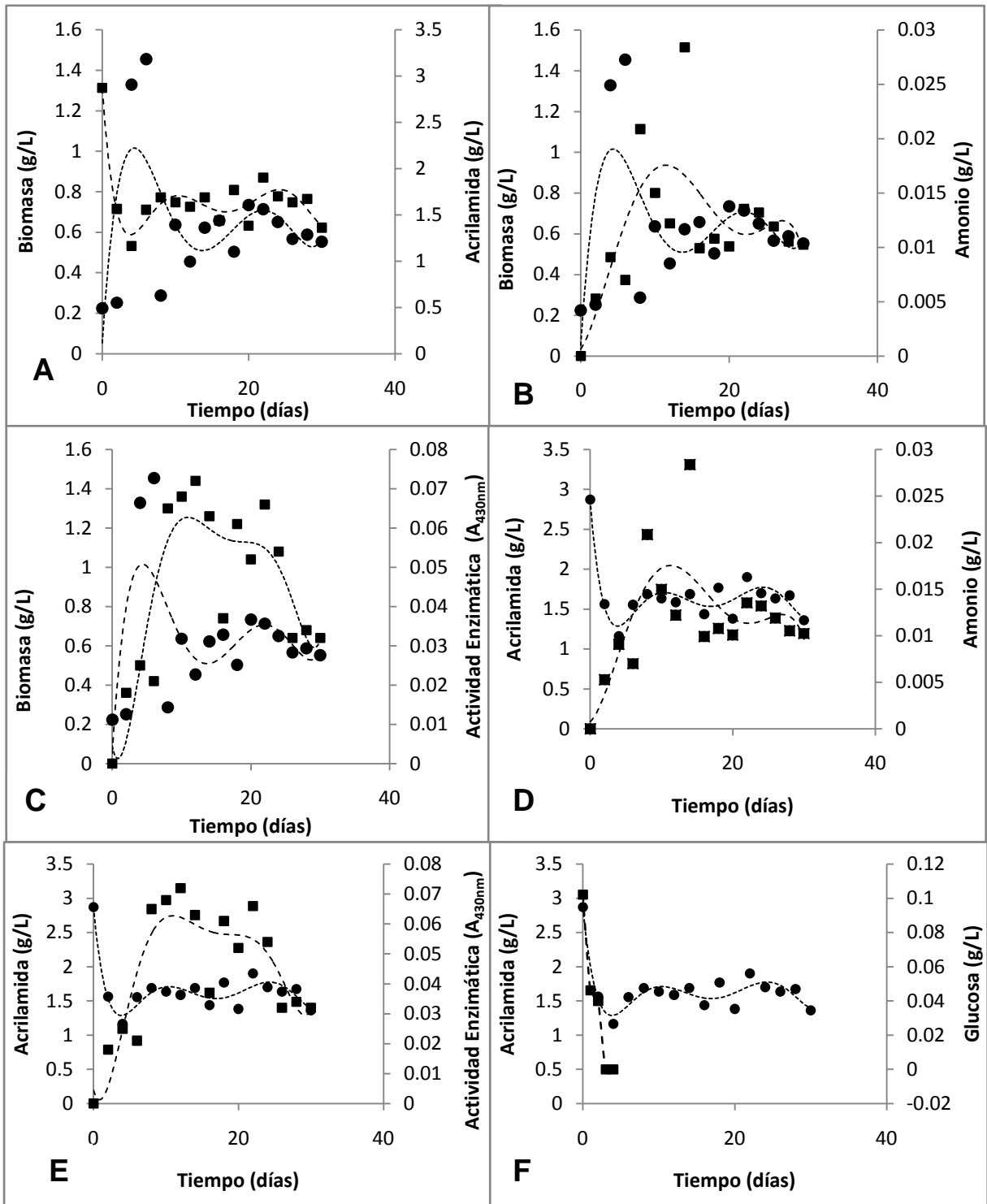


Figura 41. Degradación de acrilamida por *Kocuria rosea*: A) (●) Biomasa (■) Acrilamida residual, B) (●) Biomasa (■) Producción de amonio, C) (●) Biomasa (■) Actividad enzimática, D) (●) Acrilamida residual (■) Actividad enzimática, E) (●) Acrilamida residual (■) Producción de amonio y F) (●) Acrilamida residual (■) Consumo Glucosa.

**Poliacrilamida**

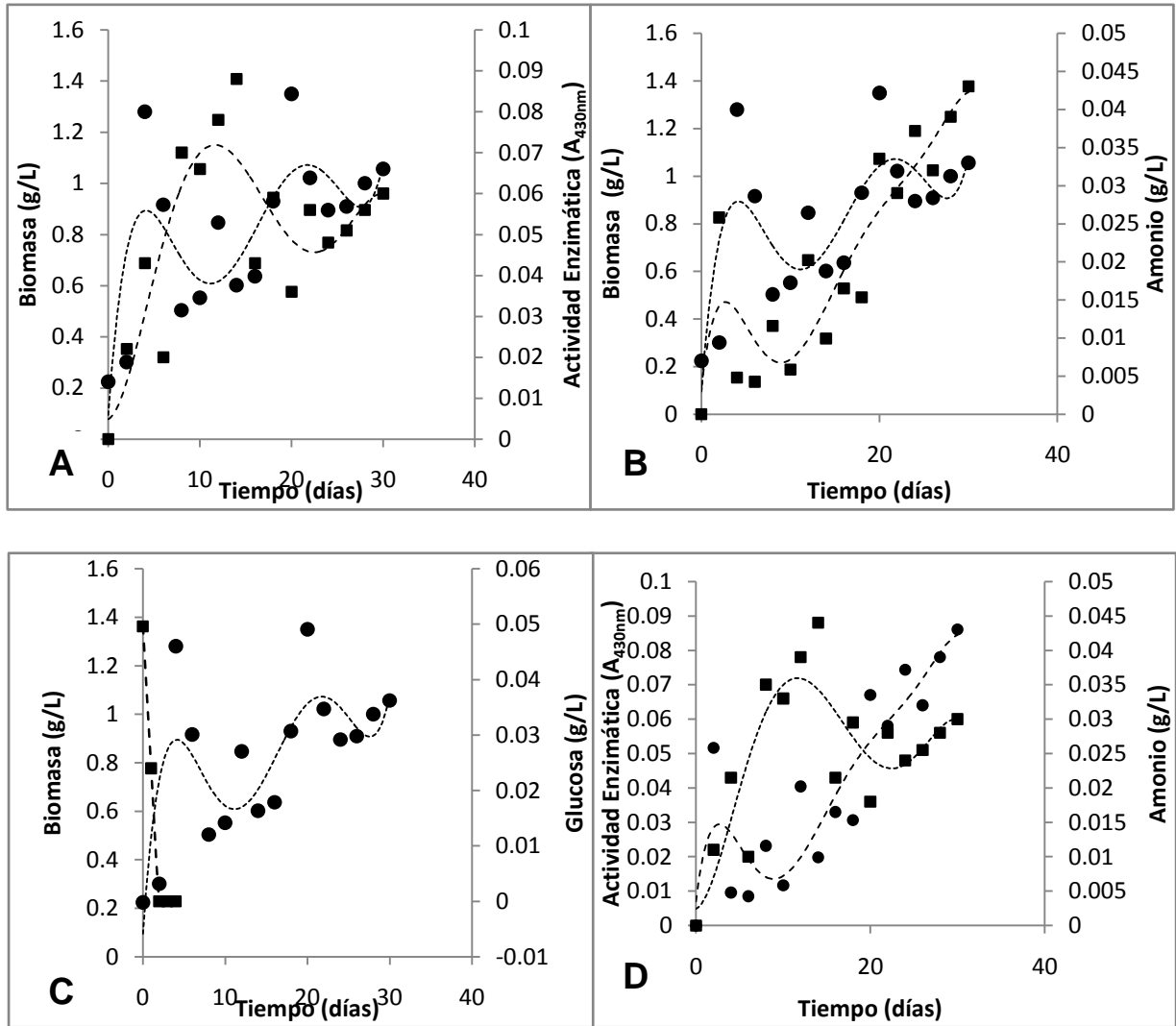


Figura 42. Degradación de poliacrilamida por *Arthrobacter luteolus*: A) (---●---) Biomasa (---■---) Actividad enzimática, B) (---●---) Biomasa (---■---) Producción de amonio, C) (---●---) Biomasa (---■---) Consumo de Glucosa y D) (---●---) Actividad enzimática (---■---) Producción de amonio.

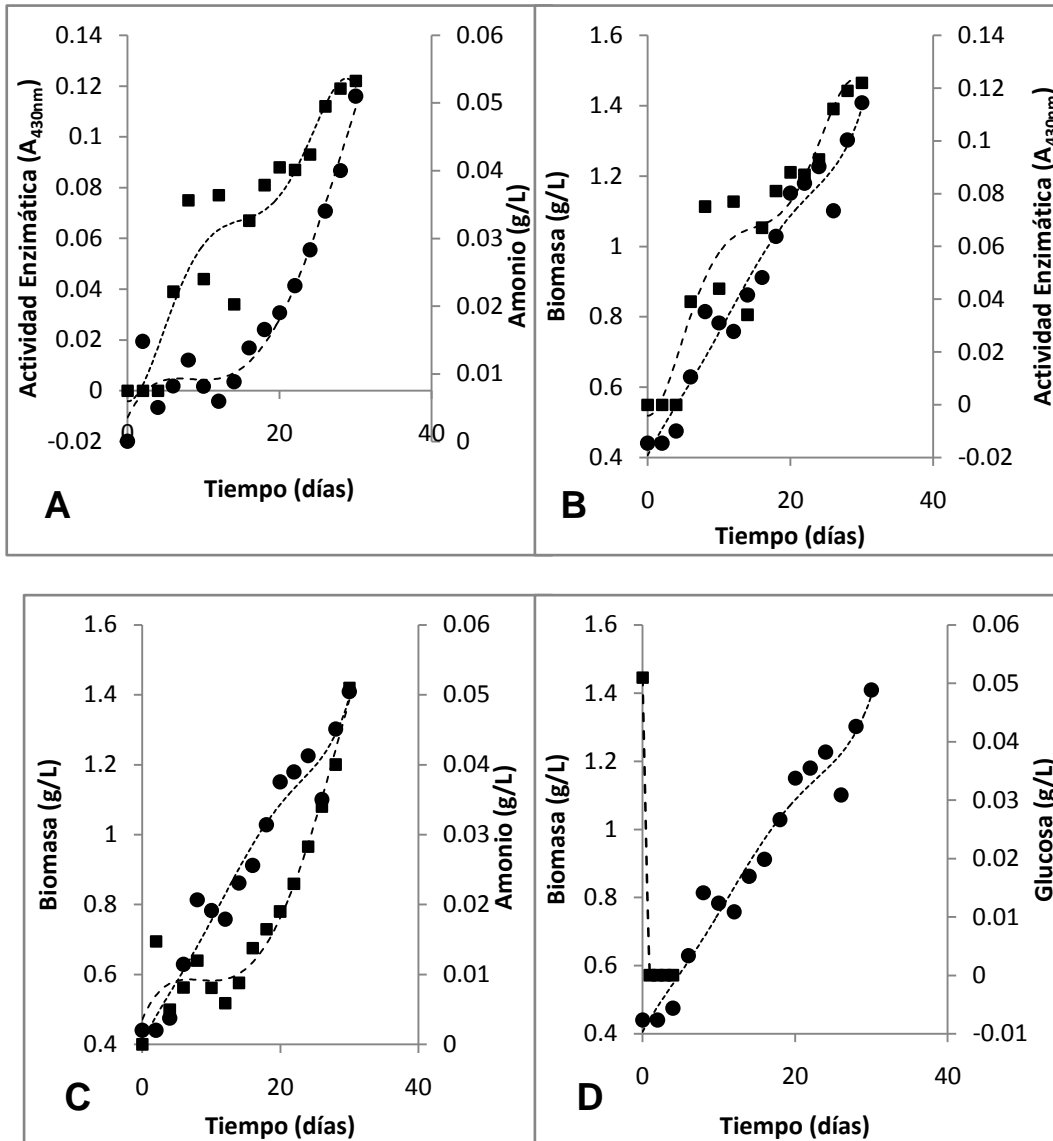


Figura 43. Degradación de poliacrilamida por *Crocinobacterium jejui*: A) (●) Actividad enzimática (■) Producción de amonio, B) (●) Biomasa (■) Actividad enzimática, C) (●) Biomasa (■) Producción de amonio y D) (●) Biomasa (■) Consumo de Glucosa.

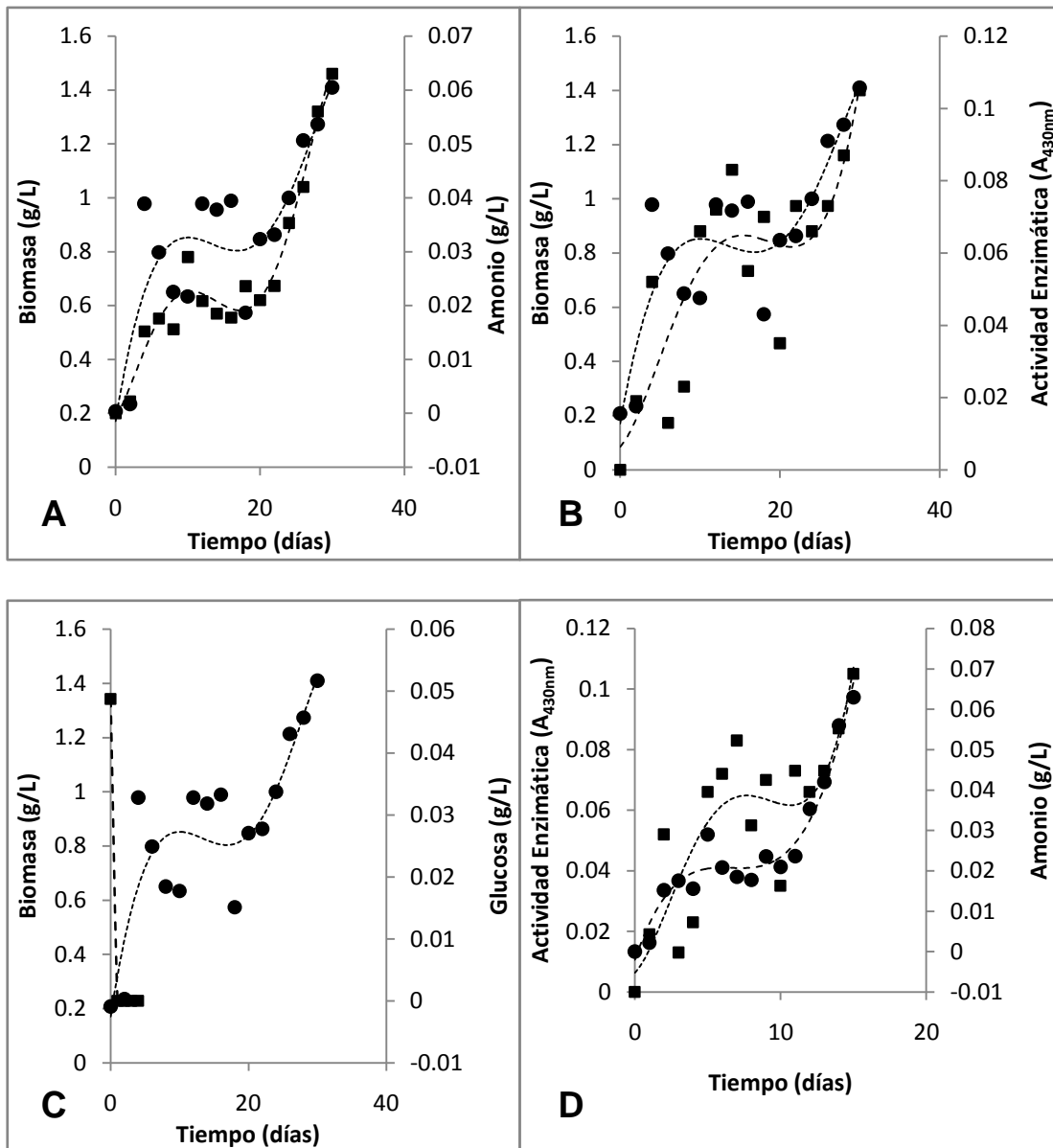


Figura 44. Degradación de poliacrilamida por *Serratia marcescens*: A) (●) Biomasa-(■) Producción de amonio, B) (●) Biomasa-(■) Actividad enzimática, C) (●) Biomasa-(■) Consumo de glucosa y D) (●) Producción de amonio (■) Actividad Enzimática.

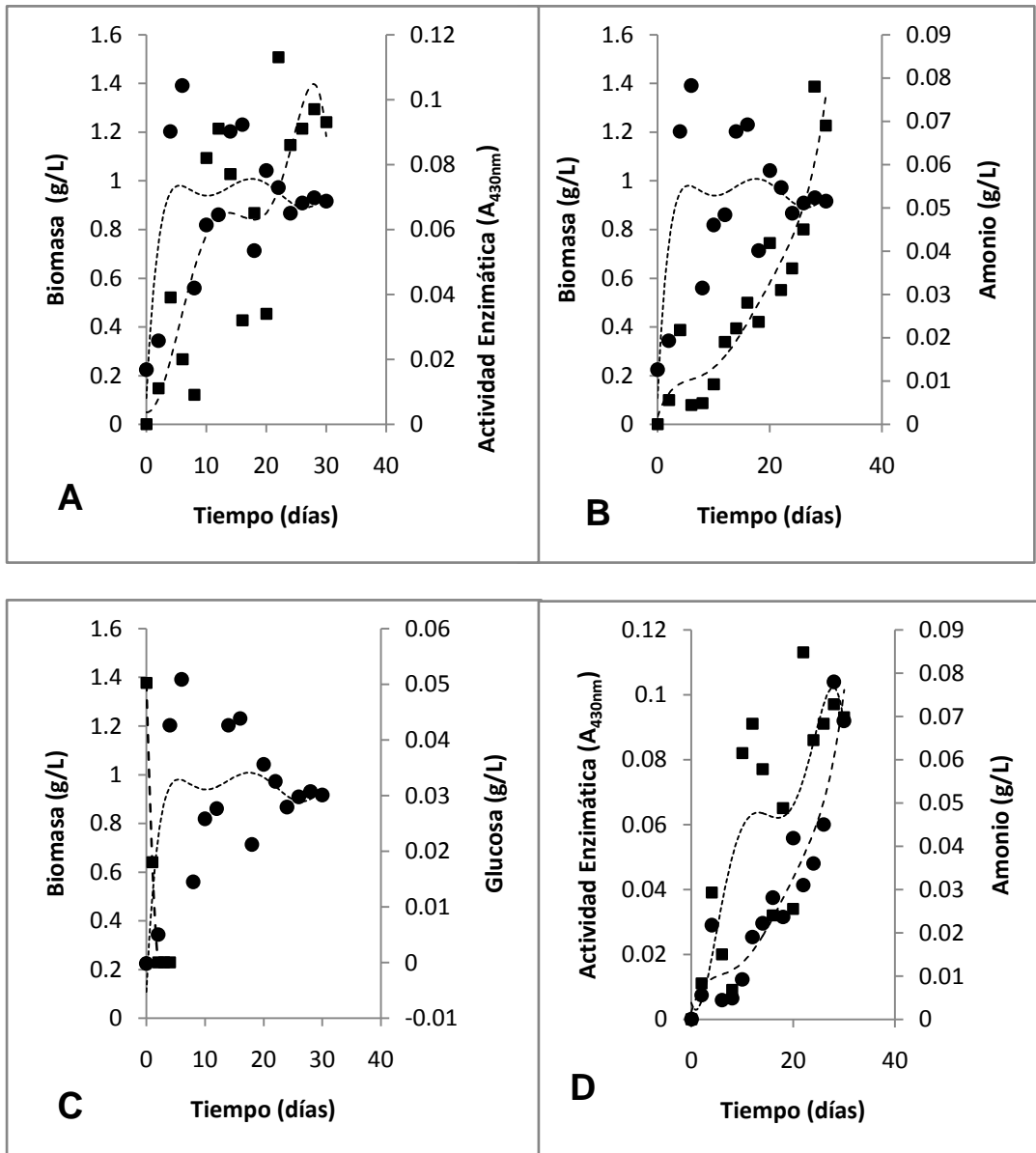


Figura 45. Degradación de poliacrilamida por *Kocuria rosea*: A) (---●---) Biomasa (---■---) Actividad enzimática, B) (---●---) Biomasa (---■---) Producción de amonio, C) (---●---) Biomasa (---■---) Consumo de glucosa y D) (---●---) Actividad enzimática (---■---) Producción de amonio.

## **ANEXO 9**

Buffer de Hipoclorito de sodio: Pesar 9.96 g de fosfato de sodio dibásico isolver en 65 mL de agua destilada en agitación magnética hasta que esté completamente disuelto y transparente.

Disolver 2.96 g de Hidróxido de Sodio en 10 ml de agua destilada y agregar a la solución anterior lentamente en agitación magnética.

Posteriormente agregar 10 mL de hipoclorito (cloralex) agitar hasta homogenizar.

Medir pH, en caso necesario ajustar hasta 13 con solución de hidróxido de sodio 1M.

### **Determinación de acrilamida**

Para determinar el compuesto se realizó una curva tipo partiendo de un estándar de acrilamida a una concentración de 100µg/mL, y se trabajo con diferentes concentraciones: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 100 µg/mL. Para determinar la concentración de acrilamida en las muestras, se tomó 5 mL de medio de cultivo cada dos días, y algunas muestras se centrifugaron a 6000 rpm por 1 min. La curva tipo y las muestras se midieron a 210 nm con un Espectro UV-visible Cintra 10e BGC.



## ANEXO 10

### Asistencia y Participación al XXXVI Congreso Nacional de Microbiología, Morelia, Michoacan, Junio 2010

#### Microorganismos del tracto digestivo de *Eisenia sp.* biosólidos Industriales.

Ilse Yazmín Arciniega-Carreón, Ma. de Lourdes Moreno-Rivera, Ma. Del Carmen  
Oliver-Salvador, M Olivia Franco-Hernández  
Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología Av. Acueducto S/N Col. La Laguna  
Ticomán,  
Tel 57296000 Ext 56324 Email: ofranco@acei.upibi.ipn.mx  
Palabras clave: *Eisenia foetida*, lombricomposta.

#### Introducción

Una alternativa para el tratamiento de basura orgánica y algunos compuestos tóxicos es el vermicomposteo con *Eisenia foetida*, en conjuntos con los microorganismos del suelo transforman los desechos en algo más fácil de biodegradar para mejorar la calidad del suelo. En el intestino de la lombriz ocurren procesos de fraccionamiento, desdoblamiento, síntesis y enriquecimiento enzimático y microbiano, incrementando significativamente la velocidad de degradación y mineralización del residuo y la capacidad de eliminar microorganismos patógenos de plantas y animales. Pero aún se desconoce el mecanismo completo de este proceso. El objetivo es identificar las poblaciones microbianas en el tracto digestivo de *Eisenia sp.* Por técnicas convencionales y moleculares.

#### Materiales y Métodos

Las poblaciones microbianas fueron aisladas del tracto digestivo de *Eisenia sp.*, por medio de lava-dos con solución salina, las muestras se cultivaron en medios diferenciales (Agar Sellers y Sanders) y un medio general (TSA). Las colonias aisladas se sometieron a pruebas de Gram y bioquímicas para identificar su género. La amplificación del gen 16S rDNA fue realizada con iniciadores p27F(5'AGA GTT TGA TCCTGG CTC AG-3') y p1525R (5'GTT ACC TG TTA CGA CTT-3'). La búsqueda de secuencias similares a la de la obtenida se realizó por medio del programa BLAST1, la búsqueda de secuencias en el orden de familia fue realizada en el programa Tax Browser. Las alineaciones se realizaron en el programa CLUSTAX. Los árboles filogenéticos fueron construidos con el programa Mega 3.

#### Resultados y discusión

Se aislaron 300 colonias de las cuales mediante pruebas bioquímicas se logró obtener el género solo de 16. Más del 50% de estas bacterias se pueden adaptar a diferentes fuentes de carbono. Los árboles filogenéticos fueron construidos a nivel de familia. La cepa Con1, 20, I3 y 27 resultaron tener como la especie más cercana *Bacillus sonorensis* EF433411 con el 98%, a *Bacillus pumillus* EF203211 con el 96% *Staphylococcus warneri* L37603 con el 98% y a *Planococcus citreus* AM180768, con el 99% de similitud respectivamente.

#### Conclusiones

1. Los géneros identificados, poseen propiedades benéficas para la biorremediación del ambiente.
2. Los métodos de identificación molecular y convencional son complementarios.
3. El 82% de las bacterias aisladas son desnitrificantes proceso que ayuda a la recuperación del N<sub>2</sub> que se pierde en la atmósfera

#### Agradecimientos.

Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología.

#### Bibliografía.

- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers.1990. Basic local alignment search tool. J.Mol. Biol. 215:403- 410.
- Edwards, A. 1984. The use of earthworms in the break-down and Management of organic wastes. Ed. Earth-worm Ecology..

Asistencia y participación en el 7° Encuentro Nacional de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional, Mazatlan, Sinaloa Octubre 2010.

**BACTERIAS AISLADAS DEL TRACTO DIGESTIVO DE E. FOETIDA TOLERANTES A ALTAS CONCENTRACIONES DE ACRILAMIDA.**

**Ilse Yazmín Arciniega-Carreón, Ma. de Lourdes Moreno-Rivera, Ma. Del Carmen Oliver-Salvador, M Olivia Franco-Hernández\***

Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología Av. Acueducto S/N Col. La Laguna Ticomán,

Tel 57296000 Ext 56324 Email: ofranco@acei.upibi.ipn.mx

Palabras clave: *Eisenia foetida*, lombricomposta.

**Introducción.** Una alternativa para el tratamiento de algunos compuestos tóxicos como la acrilamida (AM), es el vermicomposteo con *Eisenia foetida*. En conjunto con los microorganismos del suelo transforman los desechos en compuestos biodegradables para mejorar la calidad del suelo. En el intestino de la lombriz ocurren procesos de fraccionamiento, desdoblamiento, síntesis y enriquecimiento enzimático y microbiano, incrementando significativamente la velocidad de degradación y mineralización del residuo, pero aún se desconoce el mecanismo completo del proceso. El objetivo es aislar poblaciones microbianas del tracto digestivo de *Eisenia sp.* y analizar la tolerancia de los microorganismos por la acrilamida.

**Metodología.** Se obtuvieron muestras de la lombriz roja californiana de la vermicomposta cultivada con desechos orgánicos y lodos, se realizaron lavados con solución salina al 3% durante 10 minutos. En tubos conteniendo solución salina estéril se hizo diluciones mismas que fueron sembradas en medio TSA, agar sellar y Sanders. Se incubó a 35°C durante 24h, transcurrido ese lapso de tiempo se procede a la selección de cepas con morfología colonial diferente entre ellas, siendo sembradas en tubos de 13/100 con medio TSA.

**Resultados y discusión.** Para el aislamiento, se consideraron las diferencias morfológicas, bioquímicas y de tolerancia a la concentración de AM. Se aislaron 14 cepas. La mayoría resultó translúcida, de forma circular y con tamaños de radio iguales o menores a los 0.5 cm. Se obtuvieron colonias de color naranja, amarillo y blanco, el crecimiento fue de forma filiforme y equimulado. Se encontraron cocos y bacilos, negativos y positivos. Como se puede observar en el cuadro 1, la cepa 4-1, 4-2, 10-cc-2 y 7B son las que crecen y toleran hasta 1g/L. Las cepas 6-1, 6-2, 7N, 8R', 9-1, 11-A-1, 11-ana-1 y 11-ana-2 presentan crecimiento hasta 500 mg/L de AM. Las cepas 3-2 y 13 AST, no crecieron a ninguna concentración de AM. Con estos resultados se puede descartar aquellas bacterias que no crecieron en el medio, debido a que no utilizan la AM. Se pretende encontrar *Pseudomonas* y *Bacillus* que de acuerdo a diversos autores han demostrado que son capaces de usar poliacrilamida como fuente de carbono y nitrógeno. Para comprobar estos resultados es necesaria la identificación de los microorganismos por técnicas convencionales y técnicas de biología molecular.

**Conclusiones y perspectivas.** Las cepas con mayor tolerancia fueron la 4-1, 4-2 y 10 cc2, creciendo en concentraciones de 1g/L de acrilamida y pueden pertenecer a las bacterias reportadas que utilizan la poliacrilamida como fuente de carbono. Estas cepas, serán identificadas y se les realizará pruebas para determinar si producen la enzima imidasa, es posible que estas bacterias utilicen la enzima para degradar este compuesto con mayor facilidad.

**Agradecimientos.** Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología a CONACyT y al ICyTDF.

**Asistencia y participación en el VIII Encuentro Participación de la Mujer en la  
Ciencia, Guanajuato, Mayo 2011**

**BACTERIAS AISLADAS DEL TRACTO DIGESTIVO DE EISENIA FOETIDA  
TOLERANTES A ALTAS CONCENTRACIONES DE ACRILAMIDA**

Y. Arciniega-Carreón, M. L. Moreno-Rivera, M. C. Oliver Salvador, M. O. Franco  
Hernández

*Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. e-mail:  
ofranco@acei.upibi.ipn.mx*

**Introducción.** Una alternativa para el tratamiento de algunos compuestos tóxicos como la acrilamida (AM), es el vermicomposteo con *Eisenia foetida*. En el intestino de la lombriz ocurren procesos que incrementan la velocidad de biodegradación de un compuesto. El objetivo es aislar e identificar poblaciones microbianas del tracto digestivo de *Eisenia sp.* y analizar la tolerancia de los microorganismos por la acrilamida.

**Metodología.** Los microorganismos aislados del tracto digestivo fueron sembrados en medio TSA. Con las colonias aisladas se realizaron los ensayos de crecimiento en un medio que contenía diferentes concentraciones de acrilamida. Las bacterias que crecieron hasta 1g/L se identificaron por técnicas de biología molecular. Se amplificó el gen 16S y la búsqueda de secuencias similares a la de la obtenida se realizó por medio del programa BLAST. Fue construido un árbol filogenético con el programa Mega 5.

**Resultados y discusión.** Para el aislamiento de microorganismos, se consideró la morfología y tolerancia a la concentración de AM. Se identificaron 4 bacterias que crecieron hasta concentraciones de 1g/L, de las cuales se elaboró su árbol filogenético a nivel familia. La bacteria 1-1-2 col ama tiene una identidad del 99% con *micrococcus yunnanensis*; 15-1-R con *Serratia nametodiphila*; 10cc2 con *Bacillus subtilis* y 11 ana 2\* blanca con *Bacillus weihestephanensis*.

**Conclusiones.** Las bacterias crecieron hasta una concentración de 1g/L de acrilamida. Se identificó que las bacterias pertenecen al género de *Micrococcus yunnanensis*, *Serratia nametodiphila*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus weihestephanensis*. Los géneros identificados, poseen propiedades benéficas para la biorremediación del ambiente.

**Agradecimientos.** Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología a CONACyT y al ICyTDF.

