

## **Aislamiento y caracterización de una bacteria oxidadora de Mn proveniente de agua subterránea de Santa Cruz, Hgo., México, afectada por contaminación geogénica**

Dulce Arely Rivera Rodríguez, Alfredo Gracia Zaragoza, Claudia Coronel Olivares, Rosa Icela Beltrán Hernández, Carlos Alexander Lucho Constantino, Maricela Villanueva Ibáñez, Blanca Estela Jaramillo Loranca y Gabriela A. Vázquez Rodríguez

D. Rivera<sup>1</sup>, A. Gracia<sup>1</sup>, C. Coronel<sup>1</sup>, R. Beltrán<sup>1</sup>, C. Lucho<sup>1</sup>, M. Villanueva<sup>2</sup>, B. Jaramillo<sup>2</sup> y G. Vázquez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

<sup>2</sup>Universidad Politécnica de Pachuca

gvazquez@uaeh.edu.mx

F. Trejo, (eds.).Ciencias Biológicas y de la Salud, Proceedings-©ECORFAN-México, Pachuca, 2017.

## Abstract

In Santa Cruz, Hidalgo (Mexico), the public supply came from groundwater geogenically polluted with manganese. The aim of this work was to isolate, identify and cultivate microorganisms able to oxidize Mn and that can be further used in a biological treatment process. An isolate was obtained from groundwater samples of the site, which gave a positive result in the leucoberbelin blue test allowing the detection of oxidized Mn. The isolate was identified as *Bacillus pumilus* by an automated system. This result was supported by the morphological and biochemical characterization of the strain. The isolate was inoculated in shake flasks to evaluate the removal of Mn from the study site groundwater. The strain could oxidize partially the elevated initial Mn content of the samples (of about 4 mg/L), and this after more than 450 hours. However, the level of Mn removal was not clearly different from that reached by the abiotic controls. The feasibility of using *B. pumilus* to remediate geogenic Mn in groundwater has still to be confirmed.

## Manganeso, Contaminación geogénica, Potabilización, Oxidación, Biofiltración

### 1. Introducción

En las aguas subterráneas existen numerosos iones metálicos, los cuales pueden provenir de actividades antropogénicas tales como la agricultura, la minería y las transformaciones industriales, entre otras (Beiger y Jernelöv, 1999; Yepis *et al.* 1999). Asimismo, pueden derivarse de interacciones con el material rocoso circundante. Por ejemplo, en algunos lugares de México, como la Bahía Concepción, en Baja California Sur, y Molango, Hidalgo, se han encontrado altas concentraciones de Fe y Mn en depósitos sedimentarios, los cuales se caracterizan por su carácter exógeno (Juárez-Santillán *et al.*, 2010). Estos depósitos, a su vez, están relacionados con procesos de erosión y diagénesis de rocas; cuando estas interactúan con el agua subterránea provocan contaminación geogénica (Rodríguez *et al.*, 2005). Debido a su elevada toxicidad, el As y el Cr son quizás los contaminantes geogénicos más estudiados.

A pesar de que es necesario para el desarrollo de seres vivos, quienes lo requieren a nivel traza en el medio, el Mn también es un contaminante geogénico común en aguas subterráneas (Ehrlich, 1997). En la naturaleza, el Mn se encuentra en tres estados de oxidación: Mn(II), Mn(III) y Mn(IV). La forma reducida, Mn(II), es soluble y la más frecuente en ausencia de oxígeno y, por ende, en aguas subterráneas (Geszvain *et al.*, 2012). El contacto con aire atmosférico la transforma en Mn(IV), que es insoluble. Por consiguiente, las altas concentraciones de Mn en aguas subterráneas se traducen en depósitos, imparten mal sabor al agua y pueden tener impactos en la salud humana. En efecto, se ha encontrado que una ingesta alta de Mn afecta particularmente a la población infantil, debido a que modifica su capacidad cognitiva y puede reducir su coeficiente intelectual (Amos-Kroohs, 2015).

La normatividad mexicana vigente establece que, en agua de abastecimiento, los límites máximos permisibles son 0.3 y 0.15 mg/L para Fe y Mn, respectivamente (SSA, 2000). La Organización Mundial de la Salud (OMS) sugiere mantener la concentración de Mn por debajo de 0.4 mg/L. En el caso del Fe, la OMS propone como concentración de 0.3 mg/L; sin embargo, no es un valor estricto debido a que este elemento no es considerado tóxico sino esencial en la nutrición humana (WHO, 2011). Los habitantes de la localidad de Santa Cruz, Hidalgo, reportan desde hace varios años que se les suministra agua subterránea con características físicas inusuales (coloración rojiza y sabor metálico, principalmente) atribuibles a la presencia de Fe y Mn (Flores, 2016). Por tal motivo, la mayor parte de la población del lugar no utiliza el agua para la realización de tareas cotidianas. En la localidad son visibles numerosos indicios de que el agua es inadecuada para su consumo, ya que donde hubo escorrentía existen incrustaciones de óxidos, o superficies teñidas de rojo debidas al contacto con el agua.

Para dar solución a este problema, existen diferentes procesos de tratamiento del agua. Los tratamientos fisicoquímicos son los más comunes (Mouchet, 1992). Entre ellos destacan la oxidación (con oxidantes fuertes como  $\text{KMnO}_4$  o  $\text{Cl}_2$ ) seguida de filtración, la filtración acoplada a un intercambiador iónico, los tratamientos *in situ* y con ozono ( $\text{O}_3$ ). En la Tabla 3.1 se incluyen algunos de los métodos fisicoquímicos más comunes para la remoción de Fe y Mn. Sin embargo, estos procesos suelen implicar costos elevados respecto a maquinaria, tecnología y suministro de reactivos. En el caso de la oxidación química con compuestos clorados, el riesgo de formación de intermediarios tóxicos, tales como los trihalometanos, es otro inconveniente de esta tecnología.

**Tabla 3.1** Métodos fisicoquímicos utilizados para la remoción de Fe y Mn

Método	Característica	Referencia
Aireación seguida por filtración dual o filtración media	Está complementada por un tanque de contacto, solución o flotación y la adición de químicos	Mouchet (1992)
Oxidación química	Sin pre-aireación y seguida por filtración. Se emplean sales de hipoclorito de calcio $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ , $\text{KMnO}_4$ o $\text{Cl}_2$	Salem y Amin (2012); Mouchet (1992)
Filtración con un intercambiador iónico	Se usan como medios filtrantes arena, zeolitas de origen volcánico (tectosilicatos) o arenas natural o artificialmente recubiertas con $\text{MnO}_2$	Salem y Amin (2012); Mouchet (1992)
Silicato de sodio, fosfatos o poli fosfatos	Actúan como agentes secuestrantes	Mouchet (1992)
Tratamientos <i>in situ</i>	Se oxigena el agua del acuífero por medio de pozos de alimentación, y se crea así un área de tratamiento alrededor del pozo principal	Beretta y Sansalone, (2012); Salem y Amin (2012); Mouchet (1992)
Ozono ( $\text{O}_3$ )	Oxidación de Fe y Mn	Blanchard <i>et al.</i> (2014)

Una alternativa sustentable a estos tratamientos es la biofiltración, que se define como la combinación de una acción mecánica de retención de la biomasa mediante filtración y de una transformación microbiana de los contaminantes contenidos en las aguas que se han de tratar (Arango, 2004). Aunque esta tecnología se ha usado profusamente para el tratamiento de aguas residuales, su aplicación en procesos de potabilización es más escasa y reciente, puesto que sus inicios se ubican en la década de 1990 (Mouchet, 1992). La biofiltración para la producción de agua potable normalmente pretende la remoción de materia orgánica y nitrógeno (Basu *et al.*, 2016). Sin embargo, existen reportes de que también permite una remoción adecuada de Fe y Mn (Tekerekopoulou *et al.*, 2013).

Lo anterior es posible porque en numerosos medios acuáticos (*i.e.*, embalses, océanos, aguas residuales, entre otros) existen microorganismos que oxidan al manganeso. Estos organismos son filogenéticamente muy diversos, y se ha reportado como tales a miembros de los phyla Firmicutes, Actinobacteria y Proteobacteria (grupos alfa, beta y gama). Algunos ejemplos de ellos se presentan en la Tabla 3.2. El papel que juega la oxidación de Mn en estas especies no ha sido esclarecido; por una parte, algunas bacterias podrían derivar energía de esta reacción termodinámicamente favorable, lo cual no ha sido demostrado para ningún organismo (Geszvain *et al.*, 2012). Por otra parte, la formación de óxidos de Mn podría contribuir a proteger a las células de especies químicas reactivas o de factores ambientales y ecológicos desfavorables como la radiación UV, la depredación o la infección por fagos (Geszvain *et al.*, 2012). La oxidación microbiana del Mn empieza a utilizarse extensivamente para potabilizar agua subterránea rica en este metal; no obstante, es un método poco empleado aún en México. Por lo anteriormente expuesto, los objetivos de este trabajo fueron aislar, identificar y reproducir microorganismos oxidadores de Mn provenientes del agua subterránea de Santa Cruz, Hidalgo. Una vez aislados, es factible emplearlos en un proceso que permita la remoción de este metal del agua, tal como la biofiltración.

## 2. Metodología

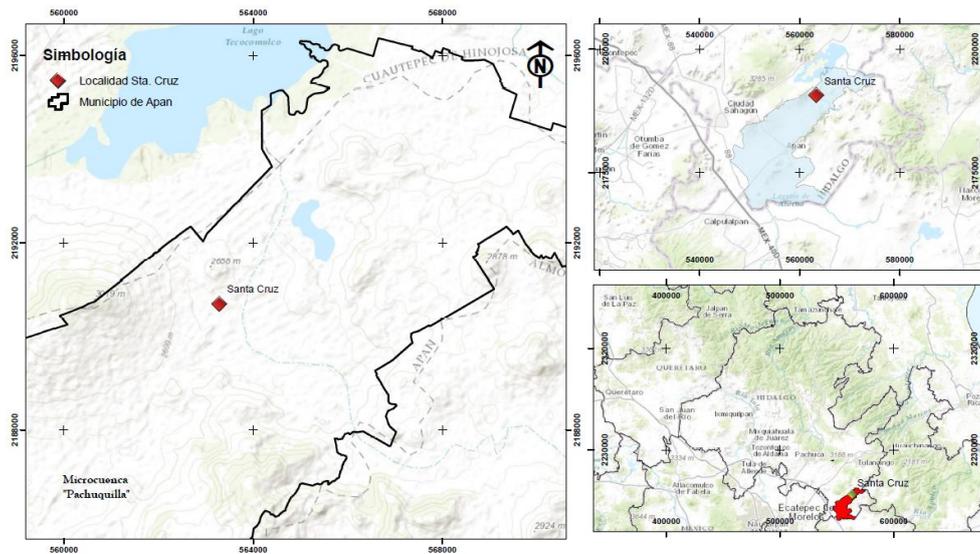
### 2.1 Sitio de estudio y muestreo del agua subterránea

El acuífero de Santa Cruz, Apan, Hidalgo, se encuentra en la parte suroeste del estado de Hidalgo, entre las latitudes norte 19°35' y 19°50', y las longitudes oeste 98°11' y 98°40', con una superficie de drenaje total de 733.2 km<sup>2</sup>. La temperatura media anual varía entre 10°C y 16°C, y la precipitación media anual es de unos 610 mm (CNA, 2015). La Figura 3.1 muestra el sitio de estudio. Las muestras se recolectaron de la única llave de salida del pozo. La boquilla de la llave se limpió con un algodón embebido en alcohol, y posteriormente se drenó la tubería por un tiempo aproximado de cinco minutos. Se tomaron cinco litros de muestra en frascos previamente esterilizados. Estos se transportaron en una hielera y se mantuvieron a 4°C hasta su análisis en el laboratorio.

**Tabla 3.2** Microorganismos oxidadores de Mn

Microorganismo	Referencia
<i>Acinetobacter</i> sp.	Chunyan <i>et al.</i> (2016); Li <i>et al.</i> (2016)
<i>Alteromonas</i>	Templeton <i>et al.</i> (2005)
<i>Bacillus</i> spp.	Tang <i>et al.</i> (2016); Zaragoza (2011); Cerrato <i>et al.</i> (2010); Gregory <i>et al.</i> (2006); Gregory y Staley (1982)
<i>Bacillus cereus</i>	Cerrato <i>et al.</i> (2010)
Bacterias prostecadas	Arcos <i>et al.</i> (2013)
<i>Bacillus megaterium</i>	Chunyan <i>et al.</i> (2016); Li <i>et al.</i> (2016)
<i>Bacillus pumilus</i>	Cerrato <i>et al.</i> (2010); Tang <i>et al.</i> (2016)
<i>Bacillus simplex</i>	Cerrato <i>et al.</i> (2010)
<i>Bacillus sphaericus</i>	Cerrato <i>et al.</i> (2010)
<i>Beggiatoa</i> sp.	Arcos <i>et al.</i> (2013)
<i>Brevibacillus brevis</i>	Cerrato <i>et al.</i> (2010)
<i>Brevundimonas nasdae</i>	Cerrato <i>et al.</i> (2010)
<i>Caulobacter</i> sp.	Gregory y Staley (1982)
<i>Chromobacterium</i> sp.	Gregory y Staley (1982)
<i>Cytophaga</i> sp.	Gregory y Staley (1982)
<i>Erythrobacter</i>	Tang <i>et al.</i> (2016)
<i>Flavobacterium</i>	Carmichael <i>et al.</i> (2013)
<i>Gallionella</i> spp.	Arcos <i>et al.</i> (2013)
<i>Halomonas</i> spp.	Templeton <i>et al.</i> (2005)
<i>Hyphomicrobium</i> sp.	Gregory y Staley (1982)
Hyphomicrobiacea	Tang <i>et al.</i> (2016)
<i>Janthinobacterium</i>	Carmichael <i>et al.</i> (2013)
<i>Leptothrix</i> spp.	Carmichael <i>et al.</i> (2013); Kielemoes <i>et al.</i> (2001)
<i>Leptothrix discophora</i> SP-6	Emerson y Ghiorse (1992)
<i>Lysinibacillus</i> sp.	Tang <i>et al.</i> (2016)
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	Cerrato <i>et al.</i> (2010)
<i>Marinobacter</i>	Templeton <i>et al.</i> (2005)
<i>Methylarcula</i>	Templeton <i>et al.</i> (2005)
<i>Microbulbifer</i>	Templeton <i>et al.</i> (2005)
Mk-1	Tang <i>et al.</i> (2016)
<i>Pseudomonas</i> spp.	Carmichael <i>et al.</i> (2013); Cerrato <i>et al.</i> (2010); Templeton <i>et al.</i> (2005)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cerrato <i>et al.</i> (2010)
<i>Pseudomonas putida</i>	De Palma (1993)
<i>Pseudomonas saccharophila</i>	Cerrato <i>et al.</i> (2010)
<i>Pseudoxanthomonas</i> sp.	Ashassi-Sorkhabi <i>et al.</i> (2011)
<i>Sphaerotilus</i> sp.	Arcos <i>et al.</i> (2013)
<i>Sphingobacterium</i> sp.	Chunyan <i>et al.</i> (2016); Li <i>et al.</i> (2016)
<i>Sulfitobacter</i>	Templeton <i>et al.</i> (2005)

**Figura 3.1** Localización del área de estudio (pozo de Santa Cruz, Hidalgo)



## 2.2 Aislamiento y cultivo de microorganismos

Para el aislamiento de bacterias oxidadoras de manganeso, se utilizaron medios de cultivo líquido y sólido. Para el medio líquido se disolvieron 0.01 g de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  en 1000 mL de agua de Santa Cruz filtrada a través de una membrana de nitrocelulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro en condiciones de esterilidad. El medio sólido se preparó de igual manera, a excepción de que se añadieron 15 g de agar a agua del pozo de Santa Cruz filtrada. El medio se esterilizó a 120°C y 15 psi por 15 minutos, antes de solidificarlo en cajas de Petri.

Los aislamientos en medio líquido se hicieron añadiendo 1 mL del agua del pozo de Santa Cruz a 9 mL de medio de cultivo. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente y sin agitación por siete días, tras los cuales se mezcló con 90 mL de medio líquido fresco. Pasados siete días, se repitió el procedimiento mezclando con 900 mL de medio. Luego de siete días más, el medio se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos, para posteriormente eliminar el sobrenadante. La biomasa recuperada se almacenó en tubos Eppendorf a los que se añadió el 20% de glicerol para su preservación y se mantuvieron en refrigeración a 4°C (Garrity *et al.*, 2004).

Para el aislamiento en medio sólido se utilizó la técnica de filtración por membrana (APHA, 2012); para ello, se filtraron 100 mL del agua del pozo a través de un filtro de nitrocelulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, que luego se colocó sobre el medio solidificado. Las cajas se incubaron a temperatura ambiente por siete días. Para cultivar las colonias que se obtuvieron, se tomó una asada de las cajas de Petri, que se suspendió en 10 mL de medio líquido. Esta mezcla se llevó progresivamente a 100 y 1000 mL, como se describió anteriormente para el aislamiento en medio líquido. Los 1000 mL se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 minutos, se eliminó el sobrenadante y los botones se resuspendieron en medio líquido con glicerol al 20% y se guardaron en refrigeración.

De los tubos con medio líquido se sembró una asada en medio sólido para obtener cultivos axénicos. Se seleccionó una unidad formadora de colonias (UFC) y a esta cepa se les asignó la clave CASC (“Cepa Aislada de Santa Cruz”) como identificación preliminar.

### 2.3 Prueba cualitativa de oxidación de Mn

Se tomó una asada de la cepa CASC, y se colocó en un papel filtro en condiciones de asepsia. Luego se le adicionaron cuatro gotas de azul de leucoberbelina al 4%. La prueba da positiva si la muestra se tiñe de color azul, lo que indica la presencia de óxidos de manganeso (De Palma, 1993).

### 2.4 Identificación de las cepas aisladas

Para la identificación de la CASC, se partió de un cultivo cuya resiembra no fuera mayor a las 24 horas. La UFC se analizó en el equipo Vitek MS Plus (bioMérieux™), que utiliza el método de espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) acoplada a un detector de iones (tiempo de vuelo o *Time-of-Flight*) MALDI-TOF para analizar el perfil de proteínas específico a cada especie. El análisis se realizó en el Laboratorio de Bacteriología Médica del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

### 2.5 Caracterización morfológica y bioquímica

A la cepa CASC se le hizo tinción de Gram, tinción de esporas y tinción de flagelos, así como pruebas de caracterización morfológica para determinar forma, borde, elevación, textura, color, crecimiento en tubo inclinado por estría recta, crecimiento superficial en medio líquido, y crecimiento en medio semi-sólido por punción. También se evaluó su crecimiento en glucosa, fructosa, ramnosa, rafinosa y lactosa, y se llevaron a cabo las siguientes pruebas bioquímicas: fenilalanina desaminasa, reducción de  $\text{NO}_3^-$ , Voges-Proskauer, tolerancia a NaCl, sulfuro indol-movilidad, catalasa, hidrólisis de caseína, hidrólisis de esculina, hidrólisis de gelatina e hidrólisis de almidón (Benson, 2002; De Vos *et al.*, 2009). Estas mismas pruebas se llevaron a cabo simultáneamente con dos organismos de referencia (*Bacillus subtilis* CDBB-B 1009 y *Escherichia coli* ATCC 35218).

### 2.6 Evaluación de la remoción de Mn

Para este estudio, se tomó una asada de la CASC, que se suspendió en 10 mL de medio de cultivo líquido. Esta mezcla se llevó progresivamente a 100 y 1000 mL, como se describió en el apartado 2.3 para el aislamiento en medio líquido. El volumen final de 1000 mL se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos. El centrifugado se dividió en seis partes, cada una de las cuales se utilizó para inocular los matraces como se describe a continuación.

A cada uno de siete matraces Erlenmeyer de 250 mL con tapón de rosca se le adicionó 220 mL del agua subterránea de Santa Cruz filtrada a través de una membrana de nitrocelulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Cuatro de los matraces (R1, R2, R3 y R4) se inocularon con un sexto del cultivo obtenido como se describió arriba. Dos de ellos (T1 y T2) también se inocularon, pero fueron posteriormente autoclavados a 120°C y 15 psi por 15 minutos, con la finalidad de desactivar la biomasa y detectar así oxidación abiótica del Mn. También se preparó un matraz control que no fue inoculado. En la Tabla 3.3 se resume cómo se prepararon los matraces. Todos los matraces se colocaron en un Orbital Shaker, Osheng a 120 rpm, que se introdujo a una incubadora General Purpose Incubator, Shell Lab®, a una temperatura de 30-32°C por 456 h.

**Tabla 3.3** Identificación y descripción de los matraces empleados para evaluar la remoción de Mn por parte de la cepa aislada

Matraz	Contenido y descripción
Control	Agua del pozo de Santa Cruz, no inoculada
T1 y T2 (Testigos abióticos)	Agua del pozo de Santa Cruz, inoculada y posteriormente esterilizada a 120°C, 15 psi, durante 20 minutos
R1, R2, R3 y R4 (Réplicas)	Agua del pozo de Santa Cruz, inoculada

Se tomaron muestras que se recolectaron en recipientes de polietileno de 20 mL. A los 10 mL de muestra que se tomaron, se les adicionó 1.0 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado. Las muestras se refrigeraron a 4°C hasta su análisis por espectroscopía de absorción atómica de llama, para lo cual se utilizó un espectrofotómetro SpectrAA (Varian 880, E.U.A.). Los resultados de los ensayos inoculados (R1, R2, R3 y R4) y de los testigos autoclavados (T1 y T2) se representaron por su promedio y desviación estándar.

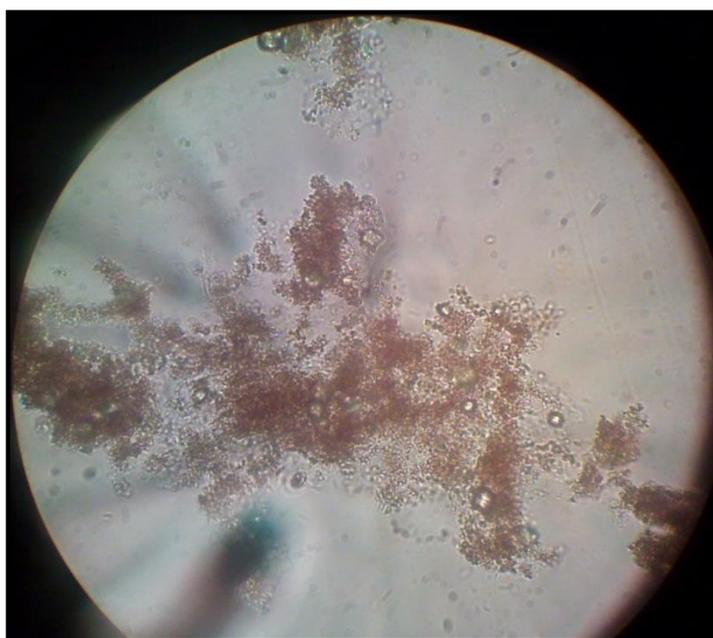
### 3 Resultados y discusión

#### 3.1 Aislamiento y cultivo de microorganismos

El aislamiento en medio sólido no permitió el crecimiento de bacterias, pero el medio líquido sí. Esta cepa, CASC, pudo luego ser conservada tanto en medio líquido como en sólido. Al observar cultivos axénicos de esta cepa en un microscopio binocular de contraste de fases (Figura 3.2), se observa que tiene una forma bacilar.

Las colonias de la cepa CASC presentan las siguientes características (Tabla 3.4): se componen de células móviles, presentan esporas, son translúcidas, pequeñas (de 0.4 x 2.1 µm), y se desprenden fácilmente del asa de siembra. La prueba cualitativa de la leucoberbelina permitió corroborar la presencia de coloración azul, que es indicativa de la presencia de Mn oxidado (De Palma, 1993).

**Figura 3.2** Observación de la cepa CASC a 100X



### 3.2 Identificación de las cepas aisladas

En el equipo Vitek MS Plus (BioMerieux™) se detectaron las proteínas ribosomales del microorganismo en cuestión, cuyo perfil es específico y pudo compararse con la base de datos del equipo. Las pruebas del control de calidad interno (*Escherichia coli* ATCC 8739), así como la calibración del equipo, fueron aceptables. Con base en los resultados obtenidos, las cepas fueron identificadas como *Bacillus pumilus* con un valor de confianza de 99.9%.

Algunas de sus características de la cepa se describen a continuación: *Bacillus pumilus* pertenece al phylum Firmicutes, a la clase Bacilli, al orden Bacillales, a la familia Bacillaceae y al género *Bacillus*. Este microorganismo es aerobio, Gram-positivo y móvil. Son bacilos pequeños (0.6-0.7 x 2.0-3.0  $\mu\text{m}$ ); forman esporas cilíndricas o elipsoidales que se encuentran centralmente, paracentralmente y subterminalmente en esporangios no estirados. La morfología colonial es variable: las colonias pueden ser arrugadas e irregulares, y no son pigmentadas. La mayoría son lisas y opacas. Su temperatura de crecimiento es 5 - 50 °C. El crecimiento se produce a pH 6.0 y 9.5, aunque algunas cepas crecen a pH de 4.5 (De Vos *et al.*, 2009).

Existen diferentes estudios que indican que *Bacillus pumilus* contiene enzimas, tales como lacasas y peroxidasas, que contribuyen a la oxidación del Mn. Además, forma esporas, por lo que resiste altas concentraciones de cloro. Esta bacteria puede habitar en aguas subterráneas y potables (Cerrato *et al.*, 2010; Gounot, 1994).

### 3.3 Caracterización morfológica y bioquímica

Los resultados del análisis de la morfología de las colonias de la cepa CASC se muestran en la Tabla 3.4; son similares a lo reportado por De Vos *et al.* (2009), quienes mencionan que las colonias de *Bacillus* pueden ser arrugadas e irregulares, no pigmentadas y en gran mayoría lisas y opacas. En la Figura 3.3 se observa la morfología de las colonias de la cepa CASC, mientras que en la Figura 3.4 se muestra la tinción de esporas de esta cepa, que son ovaladas y subterminales. En la Tabla 3.5 se muestran los resultados de la caracterización bioquímica de la cepa CASC y de dos bacterias de referencia. Cabe resaltar que los resultados de la cepa CASC son idénticos a diez de los reportados para *Bacillus* según De Vos *et al.* (2009).

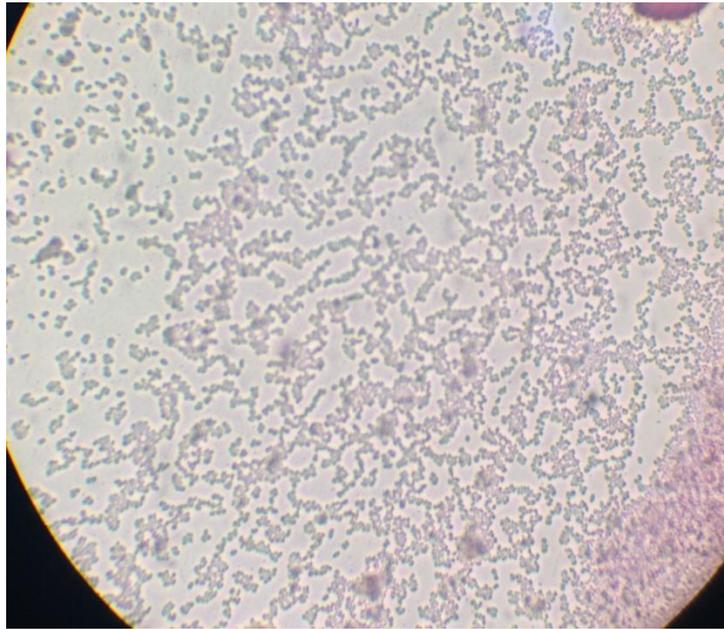
**Tabla 3.4** Morfología colonial y crecimiento de CASC en medio de cultivo sólido, crecida a 25°C por 48 horas

Forma	Borde	Elevación	Textura	Color	Crecimiento en tubo inclinado por estría recta	Crecimiento superficial en medio líquido	Crecimiento en medio semi-sólido por punción
Circular	Entero	Convexa	Viscosa	No pigmentado	Difuso	Pelculado	Papilar

**Figura 3.3** Colonias de la cepa CASC, con elevación convexa, forma circular y sin pigmentación**Tabla 3.2** Resultados de la caracterización bioquímica de CASC

Pruebas Bioquímicas	CASC	Ec	Bs
Tinción de Gram	+	-	-
Tinción de Esporas	+	-	+
Tinción de Flagelos	+	+	+
Fenilalanina desaminasa	-	+	-
Reducción de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-	+	+
Voges-Proskauer	+	+	-
Tolerancia a NaCl	-	+	+
Sulfuro	+	+	-
Indol	+	+	-
Movilidad	+	+	-
Catalasa	+	+	-
Hidrólisis de Caseína		+	+
Hidrólisis de Esculina	+	+	+
Hidrólisis de Gelatina	-	+	-
Hidrólisis de Almidón	-	-	+
Crecimiento en glucosa	+	+	++
Crecimiento en fructosa	++	ND	++
Crecimiento en ramnosa	++	+	+
Crecimiento en rafinosa	++	-	++
Crecimiento en lactosa	+++	+	+
CASC: Cepa Aislada de Santa Cruz; Ec: <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218; Bs: <i>Bacillus subtilis</i> CDBB-B 1009 Crecimiento: + Escaso; ++ Moderado; +++ Abundante ND: No determinado			

**Figura 3.4** Cepa CASC, con esporas ovaladas subterminales

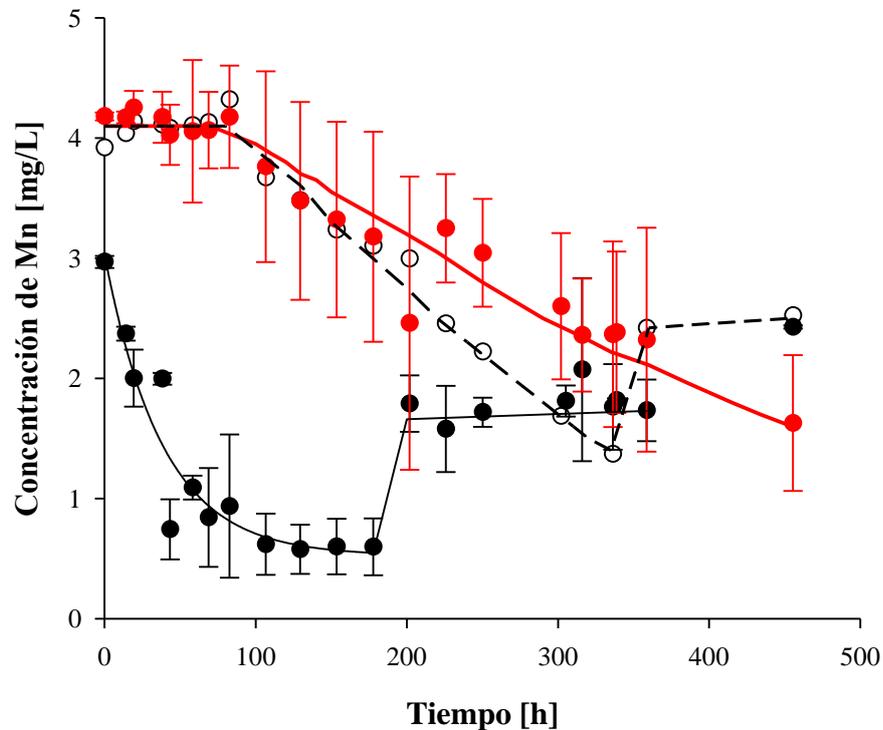


### **3.4 Evaluación de la remoción de Mn**

El Gráfico 3.1 muestra los resultados del seguimiento de la concentración del Mn contenido en el agua subterránea de la localidad de Santa Cruz luego de que se le pusiera en contacto con la cepa CASC. En paralelo se corrieron dos testigos abióticos distintos; en el primero (denominado control) no se agregó la cepa CASC, mientras que el segundo sí se inoculó con dicha cepa, mas posteriormente se sometió a esterilización para inactivarla.

Como indica la Gráfico 3.1, en los ensayos inoculados y activos se observó un período de latencia de alrededor 80 horas, durante las cuales la concentración de Mn no se modificó apreciablemente. Cabe destacar que esta concentración inicial del agua subterránea de Santa Cruz (más de 4 mg/L) es muy superior al límite máximo permisible establecido por la legislación mexicana para el agua de abastecimiento, a saber, 0.15 mg/L (SSA, 2000). Tras 80 horas de exposición, el contenido del metal empezó a disminuir a velocidad constante; esta tendencia se mantuvo hasta el final de la evaluación. Al cabo de 450 horas de cultivo, la remoción de Mn alcanzó 61%. Debe señalarse la gran variabilidad de los datos arrojados por los ensayos inoculados con la cepa CASC viable, que se reflejó en su desviación estándar (representada por las barras de error de la curva).

**Gráfico 3.1** Seguimiento de la concentración de Mn en el agua subterránea de Santa Cruz. Los símbolos representan los promedios de los datos experimentales excepto para el matraz control (○), para el que no se realizaron réplicas. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. Las líneas representan tendencias aproximadas



- : Matraces inoculados con la cepa CASC viable
- : Matraces inoculados con la cepa CASC y posteriormente autoclavados)

El control (testigo no inoculado) siguió una tendencia semejante: la concentración de Mn empezó a disminuir después de una latencia de cerca de 80 horas, pero a una velocidad mayor que la mostrada por los ensayos inoculados. Sin embargo, luego de aproximadamente 340 horas, la remoción de Mn cesó y la concentración de este metal empezó a aumentar. Lo anterior podría explicarse por la formación abiótica de óxidos de Mn, que a su vez adsorbieron Mn disuelto a su superficie. Así, el aumento de la concentración del metal podría deberse a una desorción del Mn disuelto. Tras 450 horas de evaluación, la remoción del metal fue del 42%.

Los testigos inoculados y posteriormente esterilizados exhibieron una disminución en la concentración de Mn disuelto completamente distinta; esta remoción, también abiótica, siguió una cinética de primer orden durante las primeras 180 horas de evaluación. Después de este tiempo, también se constató un incremento en la concentración del Mn disuelto. En estos matraces, la biomasa inactivada podría haber servido como catalizador de la formación abiótica de óxidos de Mn que, como en el caso del ensayo control, habrían adsorbido Mn disuelto durante la primera fase de la evaluación. Luego de 180 horas, se habría producido también una desorción del metal.

## 4 Conclusiones

Se logró aislar una cepa del agua subterránea de la localidad de Santa Cruz (CASC), que fue identificada como *Bacillus pumilus*. Las caracterizaciones morfológica y bioquímica de la CASC ratifican este resultado. Los ensayos realizados para monitorear la remoción del Mn disuelto en el agua de Santa Cruz por parte de *B. pumilus* mostraron, por una parte, cierta eficacia, aunque en un periodo extendido; por otra parte, esta eliminación fue parecida a la alcanzada de modo abiótico. Nuestros resultados muestran lo problemático que resulta distinguir la oxidación biótica del Mn de la que no lo es, y este inconveniente deberá ser subsanado para demostrar concluyentemente la factibilidad del empleo de *B. pumilus* en el tratamiento del agua de la comunidad de Santa Cruz.

## 5 Agradecimientos

Los autores reconocen el apoyo financiero del PRODEP-SEP al proyecto "Remoción biológica de Fe y Mn de agua subterránea mediante la obtención de Óxidos Biológicos con Potencial Valor Agregado" (Red Temática de Colaboración en Ingeniería de Procesos Avanzados de Sistemas Ambientales). Los autores agradecen al Ing. Pablo Irving Fragoso López por su ayuda en la elaboración del mapa del sitio de muestreo. También agradecen a la Dra. Ma. Guadalupe Aguilera Arriola y al Dr. Victor Manuel Bautista de Lucio por proporcionar las facilidades para el uso del equipo Vitek MS Plus, del Laboratorio de Bacteriología Médica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN. D. A. Rivera-Rodríguez agradece la beca otorgada por el Consejo Mexicano de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

## 6 Referencias

- Amos-Kroohs, R. M., Bloor, C. P., Qureshi, M. A., Vorhees, C. V., Williams, M. T. (2015). Effects of developmental exposure to manganese and/or low iron diet: Changes to metal transporters, sucrose preference, elevated zero-maze, open-field, and locomotion in response to fenfluramine, amphetamine and MK-801. *Toxicology Reports*, 2, 1046-1056.
- APHA (2012). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 22nd edition. American Public Health Association American, American Water Works Association y Water Environment Federation, Washington D. C., pp. 3-14, 4-115, 4-120, 4-156 y 9-56.
- Arango, Á. (2004). La biofiltración, una alternativa para la potabilización del agua. *Lasallista de Investigación*, 1(2), 61-66.
- Arcos, Y., Bentacur, J., Peñuela, G., Aguirre, N. (2013). Relación entre las formas solubles de hierro y manganeso y la presencia de bacterias oxidadoras de ambos elementos en el embalse Riogrande II-Don Matías (Antioquia, Colombia). *Revista Facultad de Ingeniería*, 55, 45-54.
- Ashassi-Sorkhabi, H., Moradi-Haghighi, M., Zarrini, G. (2011). The effect of *Pseudoxanthomonas* sp. as manganese oxidizing bacterium on the corrosion behavior of carbon steel. *Materials Science and Engineering C*, 32, 303-309.
- Basu, O. D., Dhawan, S., Black, K. (2016). Applications of biofiltration in drinking water treatment – a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91(3), 585-595.
- Beiger, K., Jernelöv, A. (1999). General aspect of specific data on ecological effects of metals. In *Handbook on the toxicology of metals*, 2nd edition. Elsevier, London, pp. 253-268.

- Benson, H. (2002). Microbiological Applications. In *Laboratory Manual in General Microbiology*, 8th edition. Mc Graw Hill, New York, E.U.A.
- Berretta, C., Sansalone, J. (2012). Fate of phosphorus fractions in an adsorptive-filter subject to intra- and inter-event runoff phenomena. *Environment Management*, 103, 83-94.
- Blanchard, C. L., Hidy, G. M., Tanenbaum, S. (2014). Ozone in the southeastern United States: An observation-based model using measurements from the SEARCH network. *Atmospheric Environment*, 88, 192- 200.
- Carmichael, M., Carmichael, S., Santelli, C., Strom, A., Bauer, S. (2013). Mn(II)-oxidizing bacteria are abundant and environmentally relevant members of ferromanganese deposits in caves of the Upper Tennessee River basin. *Geomicrobiology Journal*, 30(9), 779-800.
- Cerrato, J., Falkinham, J., Dietrich, A., Knocke, W., McKinney, C., Pruden, A. (2010). Manganese-oxidizing and -reducing microorganisms isolated from biofilms in chlorinated drinking water systems. *Water Research*, 44, 3935-3945.
- Chunyan, L., Shuting, W., Xiaopeng, D., Xiaosong, C., Meng, F., Ning, H., Dapeng, L. (2016). Immobilization of iron- and manganese-oxidizing bacteria with a biofilm-forming bacterium for the effective removal of iron and manganese from groundwater. *Bioresource Technology*, 220, 76–84.
- CNA (2015). Actualización de la disponibilidad media anual de agua en el acuífero Apan (1320), Estado de Hidalgo. Comisión Nacional del Agua, México D. F. Recuperada el 6 de julio de 2017, de [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/103069/DR\\_1320.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/103069/DR_1320.pdf).
- De Palma, S. (1993). Oxidación de Manganeso por *Pseudomonas putida*. Tesis de la Universidad de Harvard, Cambridge, Massachusetts, 63-69.
- De Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N., Ludwig, W., Rainey, F., Schleifer, K., Whitman W. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume Three: The *Firmicutes*, 2nd Edition. Springer-Verlag, New York, pp. 19-21.
- Ehrlich, H. L. (1997). Microbes and Metals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48, 687-692.
- Emerson, D., Ghiorse, W. (1992). Isolation, Cultural Maintenance, and Taxonomy of a Sheath-Forming Strain of *Leptothrix discophora* and Characterization of Manganese-Oxidizing Activity Associated with the Sheath. *Environmental Microbiology*, 58, 4001-4010.
- Flores, A. R. (6 de noviembre de 2016). Grave contaminación con manganeso en pozo de Santa Cruz. Plaza Juárez. Recuperado el 14 de agosto de 2017, de <http://www.plazajuarez.mx/index.php/region/item/48968-grave-contaminacion-con-manganeso-en-pozo-de-santa-cruz>
- Garrity, G. M., Bell, J.A., Lilburn, T. G. (2004). Taxonomic Outline of the Prokaryotes. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edition. Release 5.0. Springer-Verlag, New York, pp. 1-399.
- Geszvain, K., Butterfield, C., Davis, R. E., Madison, A. S., Lee, S. W., Parker, D. L., Soldatova, A., Spiro, T. G., Luther, G. W., Tebo, B. M. (2012). The molecular biogeochemistry of manganese (II) oxidation. *Biochemical Society Transactions*, 40(6), 1244-1248.

- Gounot, A. M. (1994). Microbial oxidation and reduction of manganese: consequences in groundwater and applications. *FEMS Microbiology Reviews*, 14(4), 339-349.
- Gregory, J., Yifan, E., Bradley, M. (2006). Manganese (II)-oxidizing *Bacillus* spores in Guaymas basin hydrothermal sediments and plumes. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3184-3190.
- Gregory, E., Staley, J. (1982). Widespread Distribution of Ability to Oxidize Manganese Among Freshwater Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 44, 509-511.
- Juárez-Santillán, L. F., Lucho-Constantino, C. A., Vázquez-Rodríguez, G. A., Cerón-Ubilla, N. M., Beltrán-Hernández, R. I. (2010). Manganese accumulation in plants of the mining zone of Hidalgo, Mexico. *Bioresource Technology*, 101, 5836-5841.
- Kielemoes, J., Bultinck, I., Storms, H., Boon, N., Verstraete, W. (2001). Occurrence of manganese-oxidizing microorganisms and manganese deposition during biofilm formation on stainless steel in a brackish surface water. *Microbial Ecology*, 39, 41-55.
- Li, C., Wang, S., Du, X., Cheng, X., Fu, M., Hou, N., Li, D. (2016). Immobilization of iron- and manganese-oxidizing bacteria with a biofilm-forming bacterium for the effective removal of iron and manganese from groundwater. *Bioresource Technology*, 220, 76-84.
- Mouchet, P. (1992). From Conventional to Biological Removal of Iron and Manganese in France. *Journal-American Water Works Association*, 84(4), 158-167.
- Rodríguez, A. A., Villaseñor, M. G., Canet, C., Prol-Ledesma, R., Camprubí A. (2005). Clasificación de los yacimientos de manganeso y ejemplos de depósitos mexicanos e internacionales. *Boletín de Mineralogía*, 16, 33-43.
- Salem, M. G., Amin, E. (2012). Enhanced removal of dissolved iron and manganese from nonconventional water resources in Delta District, Egypt. *Energy Procedia*, 18, 983-993.
- SSA (2000) NOM-127-SSA1-1994, Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización, Secretaría de Salud, México. Recuperada el 18 de diciembre de 2015, de <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/m127ssa14.html>
- Tang, W., Gong, J., Wu, L., Li, Y., Zhang, M, Zeng, X. (2016). DGGE diversity of manganese mine samples and isolation of a *Lysinibacillus* sp. efficient in removal of high Mn (II) concentrations. *Chemosphere*, 165, 277-283.
- Tekerlekopoulou, A. G., Pavlou, S., Vayenas, D. V. (2013). Removal of ammonium, iron and manganese from potable water in biofiltration units: a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88(5), 751-773.
- Templeton, A., Staudigel, H., Tebo, B. (2005). Diverse Mn(II)-Oxidizing Bacteria Isolated from Submarine Basalts at Loihi Seamount. *Geomicrobiology Journal*, 22, 127-139.
- WHO (2011). *Manganese in Drinking-water*. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water, World Health Organization, Ginebra. Recuperado el 20 septiembre de 2015, de [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/chemicals/manganese.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/manganese.pdf)

Yepis, O., Fundora, O., Pereira, C., Crespo, T. (1999). La contaminación ambiental por el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados en el cultivo del tomate. *Scientia Gerundensis*, 24, 5-12.

Zaragoza, J. (2011). Aislamiento de cepas de *Bacillus* productoras de proteasas con potencial uso industrial. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias, Universidad Autónoma de Nuevo León, México.