



**DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA**

***“AISLAMIENTO E IDENTIFICACION
DE BACTERIAS CONSUMIDORAS DE
ACETATO DE VINILO”***

TESIS DE ESPECIALIZACION EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA

I.B.I. ITZEL MONTSERRAT LARA MAYORGA

ASESORAS: DRA. FLORINA RAMIREZ VIVES
DRA. AINHOA ARANA CUENCA

JUNIO 2007

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	PAG
	I
DEDICATORIA	II
INDICE DE TABLAS	III
INDICE DE FIGURAS	V
ABREVIATURAS	VIII
RESUMEN	IX
CAPITULO I. INTRODUCCION	
1.1 MARCO TEORICO	
1.1.1. Uso e Importancia del Acetato de Vinilo	2
1.1.2. Propiedades del Acetato de Vinilo	2
1.1.3. Toxicidad del Acetato de Vinilo	3
1.1.4. Legislación Acerca del Acetato de Vinilo	4
1.2 ANTECEDENTES	
1.2.1 Estudios Sobre los Efectos Nocivos del Acetato de Vinilo	5
1.2.2 Biodegradación del Acetato de Vinilo	6
1.2.3 Aislamiento de Microorganismos que Degradan el Acetato de Vinilo	7
1.3 JUSTIFICACION	9
1.4 OBJETIVOS	10
CAPITULO II. MATERIALES Y METODOS	
2.1 Estandarización de Técnicas Analíticas	12
2.2 Inóculo	15
2.3 Medio de Cultivo	16
2.4 Enriquecimientos	17
2.5 Aislamiento	17
2.6 Tinción de Gram	19
2.7 Pruebas de Crecimiento con Factores de Crecimiento	19
- Extracto de Levadura	20
- Peptona de Caseína	21

2.8 Pruebas de Crecimiento con los Intermediarios: etanol, acetaldehído y acetato	22
2.9 Cinéticas de Consumo de Acetato de Vinilo	23
2.10 Determinación de Constantes Cinéticas V_{max} y K_s	24
2.11 Microscopía Electrónica	24
2.12 Extracción de ADN	25
2.13 Amplificación de los Génes 16S rADN Bacterianos	26
2.14 Secuenciación de ADN	26
2.15 Identificación Molecular	27

CAPITULO III. RESULTADOS Y

3.1 Aislamiento	29
3.2 Tinción de Gram	30
3.3 Consumo de Acetato de Vinilo	32
3.4 Morfología Colonial y Microscópica	33
3.5 Pruebas de Crecimiento con Factores de Crecimiento	34
3.6 Pruebas de Crecimiento con Intermediarios: etanol, acetaldehído y acetato	38
3.7 Cinéticas de Consumo de Acetato de Vinilo	39
3.8 Determinación de Constantes Cinéticas V_{max} y K_s	42
3.9 Microscopía Electrónica	44
3.10 Extracción de ADN	49
3.11 Secuenciación	49
3.12 Identificación Molecular	52

CAPITULO IV. DISCUSION 54

CAPITULO V. CONCLUSIONES 59

BIBLIOGRAFIA 61

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

Al Laboratorio de Tratamiento de Aguas Residuales y Microbiología Ambiental.

A mis asesoras, Dra. Florina Ramírez Vives y Ainhoa Arana Cuenca.

A mis compañeros del laboratorio, que son más que eso. Al M. en B. Ulises Durán.

Al Dr. Octavio Loera y personal del W104. Al Dr. Pablo Matsumura.

A la Universidad Politécnica de Pachuca. Dr. Alejandro Téllez, Ing. José Novoa, Dra. Patricia Maqueda

Al Dr. Cesar Hernández, IPN. Dra. Laura Márquez, UNAM. I.B. Rocio Martínez.

Al Dr. José Sepúlveda.

Al Comité Científico de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería por evaluar y elegir este trabajo como presentación oral, en el XII Congreso Nacional, junio 2007.

DEDICATORIA

*A Monserrat Mayorga
mi inspiración y ejemplo.*

*A Enrique Lara
razón de ser lo que soy.*

*A Guadalupe Gómez
por el interés en cada aspecto de mi vida.*

INDICE DE TABLAS

CAPITULO I. INTRODUCCION**1.1 MARCO TEORICO**

Tabla 1.1.2.1	Características físicas y químicas del acetato de vinilo.	3
----------------------	---	---

CAPITULO II. MATERIALES Y METODOS**2.1 Estandarización de Técnicas Analíticas**

Tabla 2.1.1.	Composición de las soluciones patrón	12
---------------------	--------------------------------------	----

Tabla 2.1.2.	Preparación de las diferentes concentraciones de las curvas patrón	12
---------------------	--	----

Tabla 2.1.3.	Tiempos de retención de los compuestos identificados	13
---------------------	--	----

Tabla 2.1.4.	Área de pico de cada compuesto en la curva estándar de 100 mg/L	13
---------------------	---	----

Tabla 2.1.5.	Área de pico de cada compuesto en la curva estándar de 2000 mg/L	14
---------------------	--	----

Tabla 2.1.6.	Ecuaciones y coeficientes R^2 para cada recta en la curva estándar 100 mg/L	14
---------------------	---	----

Tabla 2.1.7.	Ecuaciones y coeficientes R^2 para cada recta en la curva estándar 2000 mg/L	15
---------------------	--	----

2.3 Medio de Cultivo

Tabla 2.3.1.	Composición del medio mineral Visser C/N 1.07	16
---------------------	---	----

Tabla 2.3.2.	Composición de la solución de elementos traza	16
---------------------	---	----

2.7 Pruebas de Crecimiento con Factores de Crecimiento

Tabla 2.7.1.	Composición del medio mineral Visser C/N 10.7	19
---------------------	---	----

Tabla 2.7.2.	Preparación de las diferentes concentraciones de extracto de levadura probadas	20
---------------------	--	----

Tabla 2.7.3.	Preparación de las diferentes concentraciones de peptona de caseína probadas	21
---------------------	--	----

2.8 Pruebas de Crecimiento con los Intermediarios: etanol, acetaldehído y acetato.

Tabla 2.8.1.	Volúmenes agregados de las soluciones de intermediarios y factores de crecimiento	22
---------------------	---	----

2.9 Cinéticas de Consumo de Acetato de Vinilo

Tabla 2.9.1.	Preparación de las diferentes concentraciones a partir de las soluciones 0.25 y 0.5 M de acetato de vinilo	23
---------------------	--	----

Tabla 2.9.2.	Preparación de las diferentes concentraciones a partir de la solución 0.5 M de acetato de vinilo	23
---------------------	--	----

2.13 Amplificación de los Genes 16S rADN Bacterianos.

Tabla 2.13.1.	Condiciones de temperatura, tiempo y ciclos del termociclador	26
----------------------	---	----

CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSION

3. 1 Aislamiento

Tablas 3.1.1.	Descripción de las pruebas realizadas con las tres Cepas morfológicamente diferentes seleccionadas	30
----------------------	--	----

3.5 Pruebas de Crecimiento con Factores de Crecimiento

Tabla 3.5.1.	Valores estadísticos calculados para la prueba de las diferentes concentraciones de extracto de levadura para la Cepa 1 y 2	35
---------------------	---	----

Tabla 3.5.2.	Análisis estadístico de varianza con las diferentes concentraciones de peptona de caseína para la Cepa 2	37
---------------------	--	----

Tabla 3.5.3.	Valores estadísticos calculados para la prueba de las diferentes concentraciones de peptona de caseína para la Cepa 1 y 2	37
---------------------	---	----

3.7 Cinéticas de Consumo de Acetato de vinilo

Tabla 3.7.1.	Concentraciones reales de acetato de vinilo y velocidades de consumo para la Cepa 1	39
---------------------	---	----

Tabla 3.7.2.	Concentraciones reales de acetato de vinilo y velocidades de consumo para la Cepa 2	41
---------------------	---	----

3.8 Determinación de Constantes Cinéticas V_{max} y K_S

Tabla 3.8.1.	Valores de V_{max} y K_S de la Cepa 1 y 2.	43
---------------------	--	----

3.9 Microscopía Electrónica

Tabla 3.9.1.	Medidas de largo y diámetro de la Cepa 1	46
---------------------	--	----

Tabla 3.9.2.	Medidas de largo y diámetro de la Cepa 2	48
---------------------	--	----

3.12 Identificación Molecular

Tabla 3.12.1.	Similitudes de la Cepa 1 con sus parientes más cercanos	52
----------------------	---	----

INDICE DE FIGURAS

CAPITULO I. INTRODUCCION**1.2 ANTECEDENTES**

Figura 1.2.1.	Ruta de biotransformación del acetato de vinilo	8
----------------------	---	---

CAPITULO II. MATERIALES Y METODOS**2.1 Estandarización de Técnicas Analíticas**

Figura 2.1.1.	Rectas obtenidas al graficar las áreas de los picos y las concentraciones de la curva estándar 100 mg/L	14
Figura 2.1.2.	Rectas obtenidas al graficar las áreas de los picos y las concentraciones de la curva estándar 2000 mg/L	15

CAPITULO III. RESULTADOS**3.1 Aislamiento**

Figura 3.1.1.	Cepa 1, aislada de lodo del reactor con limitación de oxígeno	29
Figura 3.1.2.	Cepa 2, aislada de lodo del reactor anaerobio	29
Figura 3.1.3.	Cepa 3, aislada de lodo del reactor anaerobio	30

3.2 Tinción de Gram

Figura 3.2.1.	Morfología microscópica y Gram de las pruebas realizadas	31
----------------------	--	----

3.3 Consumo de Acetato de Vinilo

Figura 3.3.1.	Biodegradación del acetato de vinilo y crecimiento de la Cepa 1	32
Figura 3.3.2.	Biodegradación del acetato de vinilo y crecimiento de la Cepa 2	32

3.4 Morfología Colonial y Microscópica

Figura 3.4.1.	Morfología colonial y microscópica de la Cepa 1	33
Figura 3.4.2.	Morfología colonial y microscópica de la Cepa 2	33

3.5 Pruebas de Crecimiento con Factores de Crecimiento

Figura 3.5.1.	Velocidad de crecimiento con diferentes concentraciones de extracto de levadura de la Cepa 1	34
Figura 3.5.2.	Velocidad de crecimiento con diferentes concentraciones de extracto de levadura de la Cepa 2	34
Figura 3.5.3.	Consumo de acetato de vinilo con 0.1 y 1.0 g/L de extracto de levadura de la Cepa 1	35
Figura 3.5.4.	Consumo de acetato de vinilo con 0.1 y 1.0 g/L de extracto de levadura de la Cepa 2	36
Figura 3.5.5.	Velocidades de crecimiento con diferentes concentraciones de peptona de caseína para la Cepa 1	36

3.6 Pruebas de Crecimiento con Intermediarios: *etanol, acetaldehído y acetato.*

Figura 3.6.1.	Prueba de crecimiento medida por D. O. con los intermediarios de la degradación del acetato de vinilo de la Cepa 1	38
----------------------	--	----

3.7 Cinéticas de Consumo de Acetato de Vinilo

Figura 3.7.1.	Consumo de acetato de vinilo de la Cepa 1 a diferentes concentraciones	39
Figura 3.7.2.	Gráfica de Monod para el consumo de la Cepa 1	40
Figura 3.7.3.	Consumo de acetato de vinilo de la Cepa 2 a diferentes concentraciones	40
Figura 3.7.4.	Gráfica de Monod para el consumo de la Cepa 2	41

3.8 Determinación de Constantes Cinéticas V_{max} y K_S

Figura 3.8.1.	Gráfica del método Lineweaver.Burk para la Cepa 1	42
Figura 3.8.2.	Gráfica del método Eddie-Hofstee para la Cepa 1	42
Figura 3.8.3.	Gráfica del método Lineweaver.Burk para la Cepa 2	43
Figura 3.8.4.	Gráfica del método Eddie-Hofstee para la Cepa 2	43

3.9 Microscopia Electrónica

Figura 3.9.1.	Microscopia electrónica de la Cepa 1 a 5,000 de aumento y 10kV	44
Figura 3.9.2.	Microscopia electrónica de la Cepa 1 a 7,000 de aumento y 13kV	44
Figura 3.9.3.	Microscopia electrónica de la Cepa 1 a 13,000 de aumento y 13kV	45
Figura 3.9.4.	Microscopia electrónica de la Cepa 1 a 20,000 de aumento y 13kV	45
Figura 3.9.5.	Microscopia electrónica de la Cepa 2 a 13,000 de aumento y 13kV	46
Figura 3.9.6.	Microscopia electrónica de la Cepa 2 a 13,000 de aumento y 13kV	47
Figura 3.9.7.	Microscopia electrónica de la Cepa 2 a 13,000 de aumento y 13kV	47
Figura 3.9.8.	Microscopia electrónica de la Cepa 2 a 20,000 de aumento y 13kV	48

3.10 Extracción de ADN

Figura 3.10.1.	Foto del gel donde se corrió el ADN obtenido de la Cepa 1 y 2	49
-----------------------	---	----

3.11 Secuenciación

Figura 3.11.1.	Secuencia y cromatograma obtenidos para la reacción de secuenciación derecha de la Cepa 1	50
Figura 3.11.2.	Secuencia y cromatograma obtenidos para la reacción de secuenciación izquierda de la Cepa 1	50
Figura 3.11.3.	Secuencia y cromatograma obtenidos para la reacción de secuenciación derecha de la Cepa 2	51
Figura 3.11.4.	Secuencia y cromatograma obtenidos para la reacción de secuenciación izquierda de la Cepa 2	51

3.12 Identificación Molecular

Figura 3.12.1.	Dendograma filogenético de la Cepa 1	53
-----------------------	--------------------------------------	----


ABREVIATURAS

UASB	Reactor de lecho de lodos de flujo ascendente
DQO	Demanda Química de Oxígeno
LD ₅₀	Dosis Letal 50
mg/L	Miligramos por litro
mg/L-d	Miligramos por litro por día
O ₂	Oxígeno
CO ₂	Bióxido de carbono
CH ₄	Metano
Ppm	Partes por millón
mg/kg	Miligramos por kilogramo
v/v	Volumen/volumen
μM	Micromolar
pH	Potencial de hidrógeno
ADN	Acido desoxirribonucleico
μm	Micrómetros
Mm	Milímetros
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
HCl	Acido clorhídrico
C/N	Relación carbono - nitrógeno
M	Molar
°C	Grados centígrados
Nm	Nanómetros
Rpm	Revoluciones por minuto
Psi	Pounds per Square Inch (libra/pulgada cuadrada)
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
Ng	Nanogramo
pM	Picómolar
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
Min	Minutos
Kb	Kilobase
H	Horas
D.O.	Densidad óptica
D	Día

Lara Mayorga Itzel Montserrat (2007). Aislamiento e identificación de bacterias consumidoras de acetato de vinilo. Tesis de Especialización. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. México D.F.

RESUMEN

El acetato de vinilo es un líquido transparente, incoloro, con aroma dulce a frutas, utilizado en grandes cantidades en la industria química y con muchas aplicaciones comerciales, se encuentra como contaminante de las aguas residuales de industrias que lo utilizan. Este compuesto representa riesgos para la vida acuática y la salud humana, por lo tanto se han establecido límites internacionales de seguridad para su manejo y disposición. Es mortal para los animales acuáticos en bajas concentraciones (200 mg/L). Últimas investigaciones han demostrado que en dosis altas el acetato de vinilo es carcinogénico y causa aberraciones cromosómicas. Es poca la información que se tiene hasta el momento acerca de la degradación biológica del acetato de vinilo, por esto durante este trabajo, se aislaron en lodos de reactores UASB que trataban aguas residuales de resinas poliméricas, que contenían entre otros compuestos acetato de vinilo, las bacterias que eran capaces de consumir este compuesto, se caracterizaron por estudios de microbiología e identificaron por técnicas de biología molecular. El inóculo utilizado para hacer el aislamiento de las bacterias se obtuvo de reactores UASB que operaban bajo condiciones anaerobias y con limitación de oxígeno. Se realizaron enriquecimientos sucesivos con acetato de vinilo respetando las condiciones de oxígeno (aerobio y anaerobio). Después de la siembra en agar, en caja petri y tubo rodado, se obtuvieron tres morfologías coloniales diferentes, a las cuales se les probó el consumo de acetato de vinilo, seleccionando finalmente las dos que consumían y crecían con mayor velocidad. Se realizó la tinción de Gram. Con cada cepa se realizaron pruebas de crecimiento en diferentes concentraciones de factores de crecimiento (extracto de levadura y peptona de caseína), para determinar los requerimientos nutricionales. Se obtuvieron constantes cinéticas (V_{max} y K_S) a partir de una cinética de consumo de diferentes concentraciones de acetato de vinilo. El crecimiento de una de las cepas fue probado en los intermediarios de la degradación del acetato de vinilo (etanol, acetaldehído, acetato). Detalles de morfología y tamaño fueron observados por microscopía electrónica. Utilizando métodos de biología molecular, se extrajo el ADN, se amplificó el gen 16s rADN, y con la secuencia de cada gen amplificado se identificaron las cepas aisladas. La primera Cepa, aislada del reactor con limitación de oxígeno (1mg/L), colonialmente blanca, ramificada y plana, microscópicamente bacillos con terminación redonda, Gram negativos, móviles por flagelos periféricos, con presencia de cápsula, magnitudes de 0.75 μm de diámetro y 2.0 μm de largo, respiración aerobia, requerimientos nutricionales simples, con velocidad de crecimiento de 0.045 d^{-1} , velocidad de consumo de acetato de vinilo de 1.43 mg/Lh, V_{max} de 14.29 mg/Lh y K_S de 421.9 mg/L, fue identificada con un 99.3% de similitud con *Brevibacillus agri*. De la segunda Cepa, aislada del reactor anaerobio, colonialmente pequeña, blanca y plana con bordes enteros, microscópicamente bacilos largos y cortos con terminaciones redondas, formando cadenas en ocasiones, con magnitudes de 0.477 μm de diámetro y 1.73 μm de largo aproximadamente, Gram negativo, móviles por flagelo, respiración aerobia, requerimientos nutricionales simples, velocidad de crecimiento y consumo de acetato de vinilo de 0.064 d^{-1} y 2.13 mg/Lh respectivamente, con V_{max} de 14.91 mg/Lh y K_S de 241.36 mg/L, no se obtuvieron secuencias de buena calidad, sin embargo, con la información disponible hasta el momento se puede decir que posiblemente se trata de una cepa perteneciente al género *Brevibacillus*.



CAPITULO I

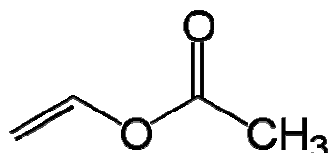
INTRODUCCION



1.1 MARCO TEORICO

1.1.1. Uso e Importancia del Acetato de Vinilo

El acetato de vinilo es un compuesto químico versátil y económicamente importante, usado en grandes cantidades en la industria química y en aplicaciones comerciales; (éster de vinilo del ácido acético, $C_4H_6O_2/CH_3COOCH=CH_2$).



Es utilizado en la elaboración de una gran variedad de polímeros incluyendo: acetato de polivinilo, alcohol polivinílico, acetales polivinílicos, copolímeros de acetato de vinilo y alcohol vinílico etilénico. Estos polímeros son comúnmente usados en la producción de:

- Plásticos
- Películas
- Lacas
- Adhesivos
- Elastómeros
- Tintas
- Pinturas con base de agua
- Terminado e impregnación de materiales para empaque
- Papel
- Vidrio
- Materiales para construcción
- Fibras acrílicas
- Pegamento

1.1.2 Propiedades del Acetato de Vinilo

El acetato de vinilo es un líquido transparente incoloro con un aroma dulce a frutas; sumamente inflamable y puede encenderse por alta temperatura, chispas o llamas al aire libre. El vapor del acetato de vinilo es más denso que el aire y puede extenderse a ras del suelo. También puede polimerizar fácilmente debido al calentamiento suave o bajo la influencia de luz o de peróxidos, con peligro de incendio o explosión y reacciona violentamente con oxidantes fuertes. Es reactivo consigo mismo y con otros químicos, sin embargo es estable e inhibido cuando se almacena correctamente.

En la Tabla 1.1.2.1 . se muestran las características físicas y químicas del compuesto.

Tabla 1.1.2.1 Características físicas y químicas del acetato de vinilo.

Peso molecular	86.09 g/mol
Punto de ebullición	72.7°C
Punto de fusión	-93°C
Densidad relativa (agua = 1)	0.934
Viscosidad	0.43 cps
Solubilidad en agua, g/100 ml a 20°C	2.5
Presión crítica	39 atm
Presión de vapor, kPa a 20°C	11.7
Densidad relativa de vapor (aire = 1)	3.0
Punto de inflamación	-8°C(c.c)
Calor de combustión a 25°C	-495 Kcal/mol
Temperatura crítica	246°C
Temperatura de autoignición	402°C
Temperatura de congelación	-92.8°C
Calor de vaporización (1 atm)	87.6 cal/g
Calor de vaporización	21.3 Kcal/mol
Calor específico a 20°C	0.46 cal/g °C
Límites de explosividad, % en volumen en el aire	2.6-13.4
Coeficiente de reparto octanol/agua como log Pow	0.73
Solubilidad en agua - Acetato de vinilo en agua a 20°C - Agua en Acetato de vinilo a 20°C	2.3% por peso 1% por peso
Conductividad eléctrica a 23°C	2.6 x 10 ⁴ pS/m (1 S = 1 mho)
Tensión superficial a 20°C	23.6 dinas/cm
Límite superior de flamabilidad	13.4 vol% en aire
Límite inferior de flamabilidad	2.6 % en aire

1.1.3 Toxicidad del Acetato de Vinilo

Los vapores del acetato de vinilo causan irritación en los ojos, enrojecimiento, dolor y quemaduras leves en la piel si se entra en contacto directo con la sustancia, además forma ampollas e irrita el tracto respiratorio. El umbral de detección del olor está reportado alrededor de 0.5 ppm, y por evaporación a 20°C puede alcanzar muy rápidamente la concentración nociva en el aire (21 ppm) al ser inhalado provoca tos, jadeo y dolor de garganta; puede causar efectos en pulmón, dando lugar a lesiones del tejido; en caso de ingesta se presentan síntomas como somnolencia y dolor de cabeza.

En ratas, la dosis letal (LD₅₀) por vía oral es de 2,920 mg/kg y por inhalación la concentración letal es de 4,000 ppm durante cuatro horas. En conejos se obtuvo una LD₅₀ de 2,335 mg/kg.

1.1.4 Legislación Acerca del Acetato de Vinilo

La presencia de Acetato de vinilo se ha encontrado en cuerpos de agua de países como Gran Bretaña, Estados Unidos, México, etc. Por ejemplo, se detectó y cuantificó en el efluente de aguas residuales descargadas en el Lago Tahoe, California en octubre de 1974, en una concentración de 50 mg/L, proveniente de una planta de acetato de polivinilo. En aguas residuales de una industria de resinas poliméricas de Querétaro, México en 2005 se encontró una concentración de 77 ± 23 mg/L de acetato de vinilo.

Debido a esto y a los riesgos que representa para la salud humana y vida acuática, se han establecido límites de seguridad para este compuesto:

El acetato de vinilo se ha encontrado en por lo menos 48 de los 1,416 sitios de la Lista de Prioridades Nacionales identificados por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) y ha establecido, que cuando ocurren descargas o derrames accidentales al ambiente de 5000 libras o mas, es necesario reportarlo.

La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), ha determinado que el acetato de vinilo puede ser usado de manera segura como recubrimiento o parte de éste en plásticos utilizados en envases de alimentos.

La Confederación Americana de Sanitarios Industriales de Gobierno (ACGIH) ha establecido un límite de exposición de 10 partes de acetato de vinilo por millón de partes de aire trabajado (10 ppm) durante una jornada de 8 horas diarias, 40 horas semanales.

El Instituto Nacional de Salud y Seguridad Ocupacional (NIOSH) recomienda que la exposición al acetato de vinilo en el aire del trabajo no exceda 4 ppm durante un periodo de 15 minutos.

1.2 ANTECEDENTES

1.2.1 Estudios Sobre los Efectos Nocivos del Acetato de Vinilo

Owen en 1988, encontró trabajando con ratas, que dosis inhaladas de 600 ppm de acetato de vinilo al 99.9%, durante seis horas/día, cinco días/semana por 104 semanas, producían lesiones en el tracto respiratorio. Al hacer análisis, del aparato respiratorio, observó lesiones en el epitelio olfativo, metaplasma, atrofia y formación de tumores en la cavidad nasal, hubo exfoliación del epitelio bronquial y fibrosis intraluminal en los bronquios. En todos los miembros del grupo de estudio hubo disminución en peso corporal y en órganos como el cerebro, hígado, corazón, riñones, tiroides, pulmones y bazo.

Minardi y colaboradores 2002, en un bioensayo de larga duración en el que se mantuvieron ratas de diecisiete días de nacidas y embriones de doce semanas de gestación bajo condiciones controladas hasta su muerte espontánea, encontraron que después de un periodo de ciento cuatro días en los que las ratas consumieron agua con concentraciones de acetato de vinilo de 0, 1000 y 5000 ppm (v/v), hubo un incremento en el total de tumores malignos y carcinomas y/o precursores de lesiones en la cavidad oral, labios, lengua, esófago y estómago. En base a estos datos, se considero el acetato de vinilo como carcinogénico potencial.

Nakamoto T. y colaboradores en 2005, encontraron que la formación de tumores cancerígenos en la parte superior del tracto gastrointestinal en ratas y ratones, expuestos a acetato de vinilo en el agua que bebían, era debido a la acidificación del ambiente intracelular causado por el metabolismo del acetato de vinilo en ácido acético. Pruebas realizadas con células del epitelio bucal de ratas a las cuales se les expuso durante cuatro minutos o más a concentraciones que iban de 10 a 1000 μ M, demostraron que la respuesta dependía de la dosis utilizada.

Últimas investigaciones han demostrado que en altas dosis el acetato de vinilo es carcinogénico y causa aberraciones cromosómicas. En los tejidos el acetato de vinilo se convierte en ácido acético y acetaldehído. Cuando los niveles umbrales son sobrepasados, los pasos críticos en el mecanismo que produce cáncer se activan, la reducción del pH en células expuestas en más de 0.15 unidades causa toxicidad, daño del ADN y proliferación regenerativa (University of Warwick, 2006).

1.2.2 Biodegradación del Acetato de Vinilo

La vida abiótica de este compuesto a 25°C y un pH de 7 se ha estimado en 7.3 días, después de este periodo sucede una hidrólisis en presencia de oxígeno. En base a estos resultados se ha estudiado la biodegradación de este compuesto bajo diferentes condiciones ambientales, ya sea en anaerobiosis o vía aerobia.

Hasta la fecha es muy poca la información que existe sobre la degradación de este compuesto.

Stuckey y colaboradores (1980), demostraron que es posible la biotransformación del acetato de vinilo, con o sin oxígeno con cultivos puros en diferentes medios acuosos. Sin embargo, requerían de diversos cosustratos para llevar a cabo la mineralización del compuesto y a medida que aumentaba la concentración de acetato de vinilo provocaba problemas de inhibición en las rutas de eliminación de éste.

Durán y colaboradores (2005), realizaron el tratamiento anaerobio de aguas residuales de una industria de resinas poliméricas, que contenían además de otros compuestos acetato de vinilo en concentración de 77 ± 23 mg/L.

La eliminación de estos compuestos se llevó a cabo en dos reactores UASB en continuo, uno de los reactores se utilizó como control anaerobio y el otro fue alimentado con dos concentraciones de oxígeno (0.6 y 1 mg/L) para evaluar la velocidad de consumo de los compuestos tóxicos.

Los resultados mostraron que la adición de O₂ y el incremento en la concentración de los compuestos químicos tratados, no afectó la tasa de eficiencia de remoción de DQO, pero la tasa de consumo de acetato de vinilo y metil acrilato fueron favorecidas. Se encontró una relación directa entre la concentración de O₂ disuelto y el incremento del rendimiento de CO₂, pero con una disminución en el rendimiento de CH₄. Bajo condiciones anaerobias con una alimentación de 40 mg/L de acetato de vinilo, se tuvo una velocidad de consumo de 0.19 mg/L-d y al adicionar 0.6 mg/L de oxígeno la velocidad aumentó a 0.84 mg/L-d. Sin embargo, al aumentar la concentración de oxígeno a 1 mg/L con una carga de acetato de vinilo de 100 mg/L, se obtuvo una velocidad de consumo mucho mayor (3.48 mg/L-d.).

Durán y colaboradores (2007). Estudiaron la degradación del acetato de vinilo y glucosa en un reactor UASB de 1.5 L en continuo a 30 °C. El reactor fue alimentado con dos fuentes de carbono, acetato de vinilo y glucosa, a dos diferentes velocidades de carga: 1) 60 mg/L-d de acetato de vinilo y 850 mg/L-d de glucosa y 2) 150 mg/L-d de acetato de vinilo y 707 mg/L-d de glucosa, hasta llegar al estado estacionario.

Los resultados mostraron que la eficiencia de eliminación de la DQO disminuyó de $65\pm 3\%$ a $39\pm 8\%$ al aumentar la velocidad de carga de acetato de vinilo de 60 a 150 mg/L·d. Con 60 mg/L·d de acetato de vinilo, el 42% del compuesto alimentado fue eliminado como CH_4 y CO_2 , con una mayor formación de CH_4 a partir del consumo de acetato, pero al aumentar la velocidad de carga a 150 mg/L·d se acumuló acetato y no se logró la mineralización completa de la glucosa, dando como productos finales CH_4 , CO_2 y acetato.

Quedando demostrado que el acetato de vinilo no es el inhibitorio de la metanogénesis, sino uno de sus intermediarios que es el acetato.

1.2.3 Aislamiento de Microorganismos que Degradan el Acetato de Vinilo.

Nieder y colaboradores (1990), estudiaron la biodegradación de este compuesto en suelo, sedimentos y lodos, bajo condiciones anaerobias y aerobias. Encontrando que en presencia de oxígeno hay una mayor hidrólisis del acetato de vinilo, comparado con la vía anaerobia. Los microorganismos responsables de esta degradación fueron aislados bajo las dos condiciones.

El crecimiento bajo condiciones aerobias se realizó disolviendo el medio mineral (Schlegel) con acetato de vinilo, acetato y acetaldehído como fuente de carbono y energía. El medio anaerobio fue preparado por medio del sistema GasPak anaerobio y conservado en desecadores.

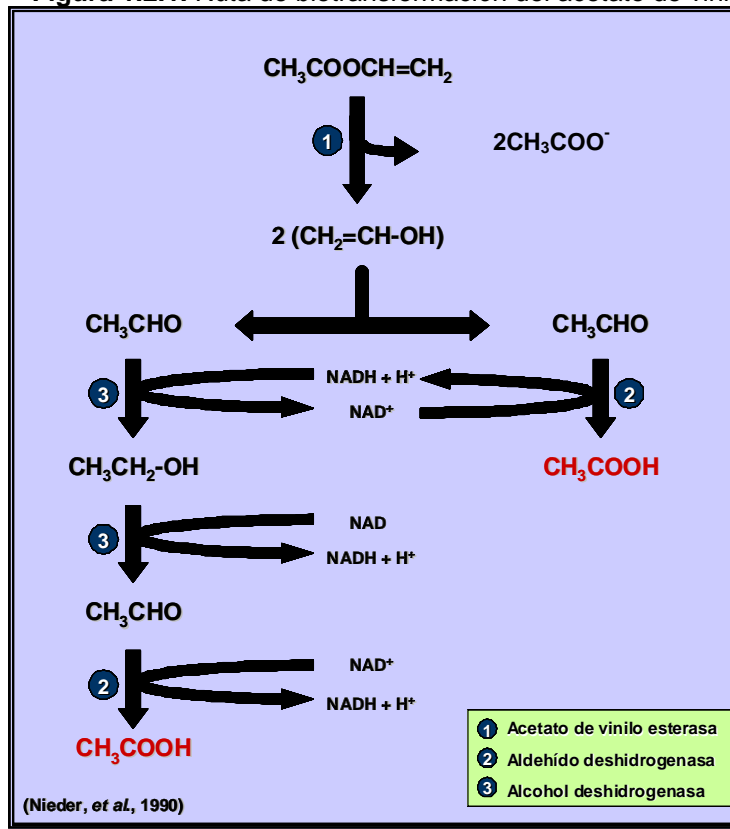
Los microorganismos fueron aislados de cultivos enriquecidos inoculados con varias muestras de suelo y agua residual. Se obtuvieron cuatro levaduras y trece bacterias, con diferentes morfologías y Gram. La Bacteria que nombraron V2 fue seleccionada para posteriores estudios y pruebas debido a que era la más homogénea.

Las células de esta bacteria eran bacilos rectos con diámetro de 1.2 a 1.6 μm y largo de 1.6 a 5.2 μm . No flageladas, no móviles y no formaban endoesporas. Oxidasa y catalasa negativas y tenían metabolismo respiratorio aerobio. Además de acetato de vinilo presentaba crecimiento en compuestos como acetato, etanol, acetaldehído, piruvato y sustratos complejos.

Sin embargo en este estudio no se realizó la identificación por biología molecular, para conocer los géneros y especies de las cepas aisladas.

En la Figura 1.2.1. se muestran las rutas de biotransformación propuesta por estos autores, tanto en presencia como ausencia de oxígeno, con las enzimas participantes.

Figura 1.2.1. Ruta de biotransformación del acetato de vinilo



El metabolismo del acetato de vinilo fue examinado bajo condiciones en las que no se permitía la oxidación completa del compuesto, pero que llevaba hacia la excreción de los intermediarios hacia el medio de cultivo. Para esto se incubó la bacteria aislada V2 con acetato de vinilo o acetaldehído con N_2 . Encontrando que a bajas concentraciones el acetato de vinilo era estequiometricamente convertido a etanol y acetato. En altas concentraciones además del etanol y acetato, aparecía acetaldehído. Resultados similares se obtuvieron con presencia de aire. Los experimentos con acetato de vinilo y acetaldehído demostraron que esta bacteria no podía metabolizar etanol y acetato. La degradación del acetato de vinilo se observó bajo condiciones aerobias y anaerobias y se llevó a cabo la formación de acetato y acetaldehído. No se formó etanol bajo ninguna de las condiciones utilizadas y la acumulación de intermediarios fue probablemente resultado de las limitaciones nutrimentales.

El crecimiento de esta bacteria en etanol y acetato era mayor que con acetato de vinilo y con acetaldehído el crecimiento era bifásico. Durante la primera fase del crecimiento, alrededor del 60% del acetaldehído fue utilizado para el crecimiento, el 40% restante fue convertido a etanol y excretado al medio; la segunda fase del crecimiento fue caracterizada por la utilización del etanol que es mejor sustrato que el acetaldehído, debido a que es menos tóxico.

1.3 JUSTIFICACIÓN

El acetato de vinilo es utilizado en grandes cantidades en la mayoría de los países para la elaboración de muchos productos, generando residuos sólidos y aguas residuales con este compuesto que requieren ser tratados.

La información sobre la eliminación biológica del acetato de vinilo es muy escasa, y no se conoce cuales son los microorganismos que la llevan a cabo ni la ruta por medio de la cual es biotransformado, ya sea vía aerobia o anaerobia. Por técnicas de microbiología y con apoyo de la biología molecular, es posible identificar y monitorear cuales son los microorganismos involucrados en la eliminación del acetato de vinilo.

1. 4 OBJETIVOS

Objetivo general

Aislar e identificar las bacterias que participan en el consumo de acetato de vinilo en lodos de un reactor UASB.

Objetivos específicos

- 1.- Aislar de lodos de un reactor UASB bacterias que consumen el acetato de vinilo en condiciones aerobias y anaerobias.
- 2.- Evaluar la biotransformación del acetato de vinilo en los cultivos axénicos.
- 3.- Identificar por técnicas de biología molecular (análisis del gen 16S rADN) las bacterias que participan en el consumo del acetato de vinilo.



CAPITULO II

MATERIALES
Y
METODOS



2.1 Estandarización de Técnicas Analíticas

Para calcular las concentraciones de acetato de vinilo en cada prueba, se realizaron curvas estándar de éste y sus derivados de biotransformación como acetato, acetaldehído y etanol.

Se prepararon soluciones patrón de los compuestos de 100 y 2000 mg/L; disolviendo las cantidades que se muestran en la Tabla 2.1.1, en matraces aforados de 100 mL.

Tabla 2.1.1 Composición de las soluciones patrón.

Compuesto	100 mg/L	2000 mg/L
Etanol	12.7 μ L	254 μ L
Acetato de Vinilo	10.7 μ L	214 μ L
Acetaldehído	12.8 μ L	256 μ L
Acetato	10 mg	200 mg

A partir de las soluciones patrón se realizaron diluciones con agua destilada para tener intervalos de concentración de 10 a 100 mg/L y de 200 a 2000 mg/L respectivamente, como se muestra en la Tabla 2.1.2.

Tabla 2.1.2 Preparación de las diferentes concentraciones de las curvas patrón

Volumen Total (μ L)	Volumen Solución patrón (μ L)	Volumen H ₂ O (μ L)	Concentración (mg/L)	Volumen H ₂ O (μ L)	Concentración (mg/L)	Volumen Solución patrón (μ L)
	100 mg/L					2000 mg/L
900	900	0	100	0	2000	900
900	810	90	90	90	1800	810
900	720	180	80	180	1600	720
900	630	270	70	270	1400	630
900	540	360	60	360	1200	540
900	450	450	50	450	1000	450
900	360	540	40	540	800	360
900	270	630	30	630	600	270
900	180	720	20	720	400	180
900	90	810	10	810	200	90

Las muestras se prepararon por triplicado, en un volumen total de muestra de 900 μ L con 50 μ L de HCl para acidificar y poder realizar la cuantificación de acetato de vinilo y sus intermediarios por cromatografía de gases; en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo HP 5890 con un detector de ionización de flama (FID), y columna AT 1000 (0.53 mm x 1.2 mm x 10 m).

El equipo se utilizó con las siguientes condiciones de operación:

Inyector 130°C

Detector 150°C

Gas acarreador: Nitrógeno

Flujo: 6.6 mL/min

El método de determinación de los compuestos se eligió en base a la mejor separación de los compuestos:

Rampa de Temperatura:

- Temperatura inicial: 50 °C.
- Temperatura final: 120 °C.
- Incremento de Temperatura: 10 °C / minuto.

Tiempo de análisis:

- Tiempo total de corrida: 6.10 minutos.

A partir de los tiempos de retención durante la corrida se identificaron los compuestos en su orden de elusión. Los tiempos de retención de cada compuesto se muestran en la Tabla 2.1.3.

Tabla 2.1.3. Tiempos de retención de los compuestos identificados

Compuesto	Tiempo de retención (minutos)
Etanol	0.587
Acetato de Vinilo	1.065
Acetaldehído	1.320
Acetato	3.913

De cada muestra se obtuvo un cromatograma y a partir de éstos se calculó el área de cada pico, las cuales se muestran en la Tabla 2.1.4 para la curva estándar de 100 mg/L y para la concentración de 2000 mg/L en la Tabla 2.1.5.

Tabla 2.1.4. Área de pico de cada compuesto en la curva estándar de 100 mg/L

Concentración (mg/L)	Etanol	Acetato de Vinilo	Acetaldehído	Acetato
10	5496	8275	12977	3557
20	16517	23260	38639	8527
30	24592	33160	56392	12060
40	32,624	44,363	74,604	15,530
50	39369	58,848	93,819	17,892
60	46024	68703	109503	20618
70	53,989	81,556	128,726	23989
80	58732	93997	144663	25625
90	68644	106,066	167,555	29,033
100	71077	115973	176479	30357

Tabla 2.1.5. Área de pico de cada compuesto en la curva estándar de 2000 mg/L

Concentración (mg/L)	Etanol	Acetato de Vinilo	Acetaldehído	Acetato
200	47,579	104,743	143,048	49,805
400	136,541	217,028	387,100	143,721
600	224,751	322,828	550,896	235,333
800	300,055	420,287	727,455	316,965
1000	385,430	522,973	912,493	414,429
1200	480,299	638,786	1,111,220	513,252
1400	556,704	745,440	1,266,020	594,051
1600	661,551	879,573	1,446,906	700,211
1800	765,536	981,965	1,685,643	821,696
2000	850,136	1,102,765	1,846,790	910,389

La variación de las áreas obtenidas, en las curvas estándar de 100 y 2000 mg/L, fue menor al 10% entre los triplicados, por lo tanto se obtuvieron promedios.

Se graficó cada una de las áreas contra su respectiva concentración (Figura 2.1.1 y 2.1.2) y se obtuvo la ecuación y el coeficiente R^2 de las rectas. Estas ecuaciones (Tabla 2.1.6 y 2.1.7) se utilizaron durante todo este trabajo para calcular las concentraciones de los compuestos en las diferentes pruebas realizadas.

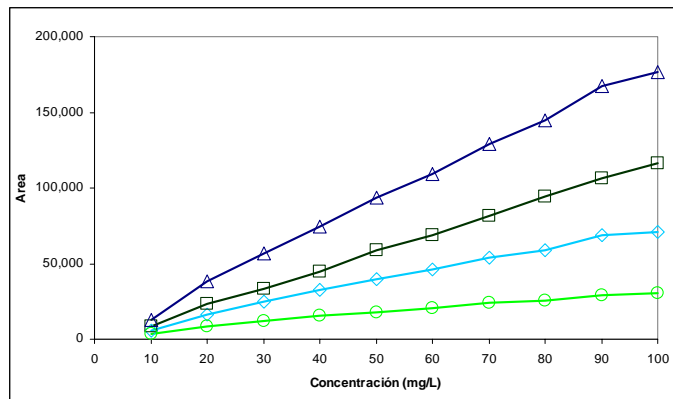


Figura 2.1.1. Rectas obtenidas al graficar las áreas de los picos y las concentraciones de la curva estándar 100 mg/L. ◆ etanol, ◻ acetato de vinilo, ▲ acetaldehído, ○ acetato.

Tabla 2.1.6. Ecuaciones y coeficientes R^2 para cada recta en la curva estándar 100 mg/L.

	Ecuación	R^2
Acetaldehído	$Y = 1814.1 X + 557.87$	0.9966
Acetato de Vinilo	$Y = 1196.7 X - 2398$	0.9991
Etanol	$Y = 725.19 X + 1820.8$	0.9919
Acetato	$Y = 291.32 X + 2696.5$	0.9863

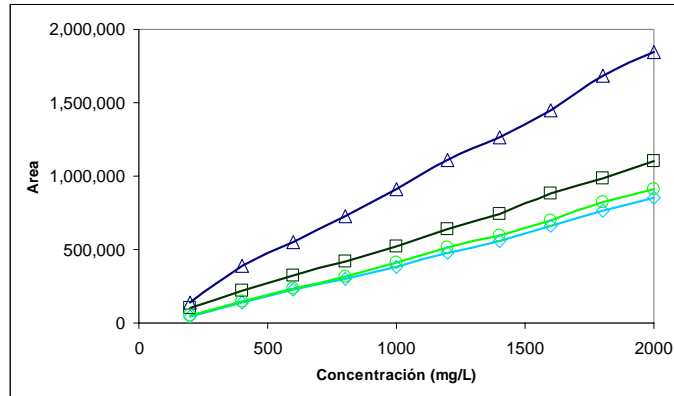


Figura 2.1.2. Rectas obtenidas al graficar las áreas de los picos y las concentraciones de la curva estándar 2000 mg/L. \blacktriangle etanol, \square acetato de vinilo, \triangle acetaldehído, \circ acetato.

Tabla 2.1.7. Ecuaciones y coeficientes R^2 para cada recta en la curva estándar 2000 mg/L.

Compuesto	Ecuación	R^2
Acetaldehído	$Y = 930.85 X - 16175$	0.9987
Acetato de Vinilo	$Y = 551.87 X - 13420$	0.9990
Etanol	$Y = 444.69 X - 48302$	0.9986
Acetato	$Y = 477.14 X - 54867$	0.9984

2.2 Inóculo

El inóculo utilizado para este trabajo fue obtenido de dos reactores UASB en los que se trataban aguas residuales de una industria de resinas poliméricas.

Ambos reactores operaban en continuo, uno de ellos trabajaba bajo condiciones anaerobias y el otro con limitación de oxígeno (1mg/L).

Los reactores fueron acoplados con acetato de vinilo con cargas de 100 mg/L durante tres meses.

2.3 Medio de Cultivo

El medio de cultivo utilizado durante este trabajo fue el medio mineral Visser (1995) modificado.

En la Tabla 2.3.1 se muestran los componentes del medio y la concentración utilizada de cada uno de ellos en gramos por litro; la composición de la solución de elementos traza que se le agregó se presenta en la Tabla 2.3.2.

Tabla 2.3.1. Composición del medio mineral Visser C/N 1.07

Compuesto	g/L
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.703
K_2HPO_4	0.6
NH_4Cl	0.5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.111
CaCl_2	0.02
Elementos traza (mL)	1

Tabla 2.3.2. Composición de la solución de elementos traza

Compuesto	g/L
$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.786
Na_2SeO_3	0.1
H_3BO_3	0.05
ZnCl_2	0.05
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	0.05
AlCl_3	0.05
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.05
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.07
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05
HCl 36% (Concentrado)	0.5 ml

Los componentes del medio, previamente pesados dependiendo del volumen que se preparaba se disolvían en agua destilada en matraces erlenmeyer de diferentes capacidades.

El medio anaerobio era reducido en oxígeno y se preparaba agregando el doble de volumen de agua con respecto al volumen de medio y calentando en una parrilla hasta ebullición del agua agregada, durante este proceso y para el vaciado de este medio en las botellas serológicas o tubos se utilizó una corriente de nitrógeno para mantener la condición de anaerobiosis.

El pH del medio de cultivo era ajustado a 7 con una solución estéril de bicarbonato de sodio al 10%.

2.4 Enriquecimientos

El inóculo del reactor anaerobio se trabajó bajo condiciones anaerobias en botellas serológicas selladas, y el del reactor que operaba con limitaciones de oxígeno se colocó en matraces erlenmeyer en condiciones aerobias. En estos cultivos, se realizaron cuatro enriquecimientos sucesivos con 100 mg/L de acetato de vinilo.

Las botellas serológicas y los matraces tenían una capacidad de 50 mL y se les agregaba 25 mL de medio de cultivo, 0.3 mL de una solución de acetato de vinilo 0.1 M, 0.1 mL de extracto de levadura al 5% y 5 mL de inóculo. Se incubaron a 30°C durante una semana. Después de este tiempo se tomó un inóculo de 5 mL de cada botella y matraz y se colocó en nuevo medio de cultivo respetando las condiciones de oxígeno, este procedimiento se repitió cuatro veces.

Diariamente se tomaba 1 mL de muestra de cada botella y matraz y se verificaba por cromatografía de gases el consumo de acetato de vinilo.

2.5 Aislamiento

A partir del cuarto enriquecimiento, en los cultivos donde hubo consumo de acetato de vinilo, se procedió a aislar en medio sólido. Para la preparación del este medio, se agregaron 15 g/L de agar bacteriológico al medio mineral Visser.

Para los cultivos aerobios se realizaron diluciones en solución salina con una concentración de 9 g/L que iban de 10^{-1} a 10^{-6} . Se prepararon tubos con 9 mL de solución salina para realizar las diluciones por duplicado, al primer tubo se le agregó 1 mL del medio de cultivo del último enriquecimiento, se homogenizó y se obtuvo así la dilución 10^{-1} de aquí se tomó 1 mL para colocarlo en un segundo tubo que también se homogeneizó para tener la dilución 10^{-2} , este procedimiento se repitió seis veces hasta llegar a la dilución 10^{-6} .

Las cajas de petri contenían 13 mL de medio de cultivo con agar bacteriológico, este volumen estaba contenido en tubos de ensaye, los tubos se colocaron en un baño de agua para fundir el medio solidificado por el agar, al estar líquido se le agregaron 0.2 mL de una solución de Acetato de Vinilo 0.25 M y 0.1 mL de una solución al 5% de extracto de levadura, después este volumen se vació en cajas petri y se esperó hasta su solidificación. Se sembró en las cajas por la técnica de inoculación en superficie. De cada dilución se tomó 1 mL el cual se vertió sobre el medio de cultivo y se extendió con varillas de vidrio sobre todo el agar, tratando de que fuera lo más homogéneo posible, las cajas fueron incubadas invertidas a 30°C.

Después de tres días, se observó crecimiento en los cultivos aerobios y se llevó a cabo la selección de las diferentes morfologías coloniales presentes en cada caja petri. Con cada morfología diferente se realizaron diluciones en solución salina hasta 10^{-6} y cada dilución se sembró nuevamente en caja petri y se incubaron a 30°C .

Tres días después, se seleccionó una morfología colonial de las cajas petri y se colocó en tubos de ensaye con medio líquido aerobio y anaerobio. Diariamente, durante una semana, se monitoreó crecimiento por medio de espectrofotometría en un espectrofotómetro modelo Spectronic 20 D+ (Spectronic Instruments) a una longitud de onda de 560 nm. También se montó una cinética de consumo en botellas serológicas con una concentración de 130 mg/L de acetato de vinilo, y se verificó el consumo del compuesto y la formación de intermediarios por medio de cromatografía de gases.

La siembra en medio sólido de los cultivos anaerobios se realizó por medio de la técnica de tubo rodado (Hungate, 1969), con diluciones que iba de 10^{-1} a 10^{-6} . Cada tubo contenía 4.5 ml de medio de cultivo con agar bacteriológico, los tubos se colocaron en un baño de agua para mantener el agar semilíquido y se le agregaron 0.1 mL de Acetato de Vinilo 0.25 M y 0.05 mL de extracto de levadura 5%. Se tomó un inóculo de 0.5 mL de la muestra seleccionada y se inyectó al primer tubo el cuál se sacó del baño de agua y se homogeneizó ligeramente para evitar la formación de burbujas. De este primer tubo se tomaron 0.5 mL y se inyectaron al segundo y así sucesivamente hasta completar una serie de 6 diluciones por duplicado. Al finalizar la transferencia, el tubo de la última dilución se sacó del baño de agua y se colocó en un motor rotatorio (Bellco Glas), donde se solidificó con ayuda de un trozo de hielo. Se repitió este procedimiento con todos los tubos y se incubaron a 30°C .

Siete días después se observó crecimiento en los tubos y fueron seleccionadas dos morfologías diferentes, una proveniente del inóculo del reactor anaerobio y otra del reactor con limitación de oxígeno, las cuales se colocaron en tubos de ensaye con medio de cultivo líquido aerobio y anaerobio, se monitoreó crecimiento diario, durante una semana, por espectrofotometría a 560 nm y se siguió una cinética de consumo de 130 mg/L de acetato de vinilo y la formación de intermediarios en botellas serológicas por medio de cromatografía de gases.

2.6 Tinción de Gram

Se realizó la tinción de Gram, de las diferentes cepas seleccionadas en cada una de las pruebas de crecimiento bajo condiciones aerobias y anaerobias.

Para la preparación del frotis de cada prueba se tomó una gota de cultivo y se colocó en un porta objetos de vidrio, la muestra fue fijada pasando el portaobjetos varias veces sobre la flama del mechero.

El frotis se cubrió con dos gotas de solución de cristal violeta y se esperó 30 segundos, después de este tiempo el exceso de colorante fue lavado con agua destilada. Posteriormente se colocaron dos gotas de solución de lugol y se esperó nuevamente 30 segundos para lavar con agua destilada y con decolorante hasta que no fluyó mas tintura. Después se le agregó al frotis una solución de safranina y transcurridos 30 segundos, se lavó con agua destilada. Se dejó secar la preparación al aire. Las muestras fueron observadas en un microscopio electrónico con aceite y el objetivo de inmersión (100x).

2.7 Pruebas de Crecimiento con Factores de Crecimiento

A partir de las pruebas con diferentes factores de crecimiento se modificó la concentración de los componentes del medio, para tener un medio de cultivo con una C/N de 10.7 y favorecer de esta manera el crecimiento de las bacterias. En la Tabla 2.7.1 se muestra la composición modificada del medio de cultivo.

Tabla 2.7.1. Composición del medio mineral Visser C/N 10.7

Compuesto	g/L
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.703
K_2HPO_4	0.6
NH_4Cl	0.05
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.111
CaCl_2	0.02
Elementos traza (mL)	1

Se realizaron pruebas de crecimiento con extracto de levadura (como factor de crecimiento) y peptona de caseína (como fuente de nitrógeno orgánico), para determinar los requerimientos nutricionales de cada cepa.

Para determinar la influencia de las diferentes concentraciones de extracto de levadura y peptona de caseína sobre el crecimiento de las cepas aisladas, se realizaron pruebas estadísticas de varianza en Excell, tomando en cuenta las diferentes concentraciones probadas de los factores de crecimiento y el máximo valor de crecimiento obtenido al final de la prueba. Según esta prueba estadística si el valor de F calculada es mayor que F crítica, la hipótesis se acepta.

- Extracto de Levadura

Con cada cepa seleccionada se realizaron pruebas de crecimiento con diferentes concentraciones de extracto de levadura.

Se prepararon y esterilizaron soluciones con diferentes concentraciones de extracto de levadura: 10, 25, 50 y 100 g/L.

En tubos de ensaye se colocaron 4.5 mL de medio de cultivo estéril y 0.5 mL de cada cepa. Se utilizaron las soluciones de extracto de levadura preparadas para ajustar los 5 mL de medio e inóculo a las concentraciones de 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 y 1.0 g/L, como se muestra en la Tabla 2.7.2, cada concentración se preparó por duplicado.

Tabla 2.7.2. Preparación de las diferentes concentraciones de extracto de levadura probadas

Concentración (g/L)	Solución de Extracto de Levadura (g/L)	ml agregados
0.1	10	0.05
0.2	25	0.04
0.4	50	0.04
0.8	100	0.04
1.0	100	0.05

El crecimiento se monitoreó cada veinticuatro horas durante una semana por espectrofotometría con una longitud de onda de 560 nm.

Con la concentración de extracto de levadura mayor y menor (0.1 y 1.0 g/L) se verificó el consumo de acetato de vinilo para cada cepa aislada.

Se realizó una cinética de consumo en botellas serológicas con 22.5 mL de medio de cultivo, 2.5 mL de inóculo de las cepas, 0.30 mL de una solución 0.25 M de acetato de vinilo para tener una concentración de 250 mg/L y 0.25 mL de soluciones de extracto de levadura 10 y 100 g/L para tener concentraciones de 0.1 y 1.0 g/L respectivamente.

El consumo de acetato de vinilo se monitoreó diariamente por cromatografía de gases hasta su totalidad.

- Peptona de caseína

Con cada cepa seleccionada se realizaron pruebas de crecimiento con diferentes concentraciones de peptona de caseína.

Se prepararon soluciones con diferentes concentraciones de peptona de caseína: 10, 25, 50 y 100 g/L.

En tubos de ensaye se colocaron 4.5 mL de medio de cultivo estéril y sin cloruro de amonio y 0.5 mL de cada cepa. Se utilizaron las soluciones de peptona de caseína preparadas para ajustar los 5 mL de medio e inóculo a las concentraciones de 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 y 1.0 g/L, como se muestra en la Tabla 2.7.3 cada concentración se preparó por duplicado.

Tabla 2.7.3. Preparación de las diferentes concentraciones de peptona de caseína probadas

Concentración (g/L)	Solución de Peptona de Caseína (g/L)	ml agregados
0.1	10	0.05
0.2	25	0.04
0.4	50	0.04
0.8	100	0.04
1.0	100	0.05

El crecimiento se monitoreó cada veinticuatro horas durante una semana por espectrofotometría con una longitud de onda de 560 nm.

2.8 Pruebas de Crecimiento con Intermediarios: etanol, acetaldehído y acetato.

En cuatro tubos de ensaye se prepararon controles por duplicado que contenían únicamente 0.1 g/L de extracto de levadura y 0.1 g/L de peptona de caseína respectivamente. En dos tubos con 5 mL de medio de cultivo se colocaron 0.05 mL de una solución 10 g/L de extracto de levadura y en los otros dos tubos se colocó 0.05 mL de una solución 10 g/L de peptona de caseína.

Se prepararon soluciones 0.1 M de etanol, acetaldehído y acetato; y una solución 0.25 M de acetato de vinilo.

Para cada intermediario se prepararon dos tubos de ensaye con 4.5 mL de medio de cultivo, 0.5 mL de una de las cepas aisladas, los volúmenes que se muestran en la Tabla 2.8.1 de cada solución 0.1 M de intermediarios y 0.25 M de acetato de vinilo para obtener una concentración 100 mg/L y 250 mg/L respectivamente y de las soluciones con concentración 10 g/L de los factores de crecimiento para tener una concentración 0.1 g/L de extracto de levadura y de peptona de caseína.

Tabla 2.8.1. Volúmenes agregados de las soluciones de intermediarios y factores de crecimiento.

	Etanol [0.1 M] (mL)	Acetato [0.1 M] (mL)	Acetaldehído [0.1 M] (mL)	Acetato de Vinilo [0.25 M] (mL)	Extracto de levadura [10 g/L] (mL)	Peptona de caseína [10 g/L] (mL)
Prueba con Etanol	0.108				0.05	0.05
Prueba con Acetato		0.083			0.05	0.05
Prueba con Acetaldehído			0.05		0.05	0.05
Prueba con Acetato de Vinilo				0.06	0.05	0.05

Los tubos se incubaron a 30°C y el crecimiento se determinó por lectura de densidad óptica a 560 nm, en el espectrofotómetro, hasta observar que éste se estabilizara. En este momento se tomaron 0.5 mL de inóculo de cada uno de los tubos para repetir la prueba exactamente bajo las mismas condiciones y con las mismas concentraciones de cada uno de los intermediarios probados.

Al final de esta segunda prueba se midió por cromatografía de gases la concentración de estos compuestos en cada uno de los tubos.

2.9 Cinéticas de Consumo de Acetato de Vinilo

Con las dos cepas seleccionadas, se hicieron cinéticas de consumo de acetato de vinilo con diferentes concentraciones: 250, 500, 750, 1000, 1500 y 2000 mg/L en tubos de ensaye cerrados con 4.5 ml de medio de cultivo mineral Visser, 0.5 ml de inóculo de las cepas y 0.05 mL de una solución 100 g/L de extracto de levadura para tener una concentración de 1 g/L en cada tubo.

Para la preparación de los tubos con las diferentes concentraciones utilizadas durante esta prueba, se prepararon soluciones de acetato de vinilo 0.25 y 0.5 M, colocando los mililitros que se indican en la Tabla 2.9.1.

Tabla 2.9.1. Preparación de las diferentes concentraciones a partir de las soluciones 0.25 y 0.5 M de acetato de vinilo.

Concentración acetato de vinilo (mg/L)	mL de la solución de acetato de vinilo 0.25 M	mL de la solución de acetato de vinilo 0.5 M
250	0.06	
500	0.12	
750	0.18	
1000		0.12
1500		0.17
2000		0.23

Se prepararon tubos por duplicado para seguir la cinética de las concentraciones: 750, 1000, 1500 y 2000 mg/L, durante una semana y para hacer cinco mediciones en las concentraciones: 250 y 500 mg/L. Se tomaron muestras tres veces al día para las concentraciones de 250 y 500 mg/L, y cada 24 horas para el resto de las concentraciones.

En una de las cepas se probaron concentraciones de 2500 mg/L para alcanzar el comportamiento de Monod. Agregando los mililitros mostrados en la Tabla 2.9.2 de la solución 0.5 M de acetato de vinilo. El consumo se monitoreó con siete muestras por duplicado de cada concentración de lunes a martes de la siguiente semana.

Tabla 2.9.2. Preparación de las diferentes concentraciones a partir de la solución 0.5 M de acetato de vinilo.

Concentración acetato de vinilo (mg/L)	mL de la solución de acetato de vinilo 0.5 M
2500	0.29

La concentración de acetato de vinilo e intermediarios, se determinaron por cromatografía de gases y el crecimiento bacteriano por espectrofotometría.

2.10 Determinación de Constantes Cinéticas V_{max} y K_S

A partir de los datos de consumo obtenidos en la cinética con las diferentes concentraciones de acetato de vinilo, se calcularon las velocidades de consumo para cada concentración y tomando los datos exponenciales según el comportamiento de Monod, se calculó la V_{max} y K_S por los métodos de Eadie-Hofstee y Lineweaver-Burk.

Para la linearización por el método de Lineweaver-Burk, se calculó el inverso de las concentraciones de acetato de vinilo utilizadas y de las velocidades correspondientes en cada caso, al graficarlas se obtuvo una línea recta. El cálculo de V_{max} se realizó sustituyendo el valor de $Y = 0$ en la ecuación de la recta obtenida para cada Cepa. Este valor de V_{max} , se utilizó para obtener K_S despejando y sustituyendo de la pendiente de la recta que es igual a K_S entre V_{max} .

En el método de linearización de Eadie-Hofstee, se calculó el cociente de la velocidad entre la concentración y se graficó contra las velocidades. El valor de K_S se obtuvo despejándolo de la pendiente obtenida en la recta de cada Cepa y V_{max} se calculó sustituyendo el valor $X = 0$ en las ecuaciones de las rectas.

2.11 Microscopia Electrónica

Se tomaron cultivos líquidos en fase exponencial de las dos cepas y se centrifugaron en tubos eppendorf durante 7 minutos a 7000 rpm, este paso se repitió dos veces para tener un pellet de bacterias.

Se agregaron diez gotas de glutaraldehído 5% y se centrifugó durante 6 minutos a 7000 rpm, se desechó el sobrenadante y se hicieron cuatro lavados con amortiguador de fosfatos 0.1M, hasta eliminar el olor a glutaraldehído.

Nuevamente se desechó el sobrenadante y se le agregaron diez gotas de tetraóxido de osmio al 1%, se mantuvieron las muestras en refrigeración a 4°C durante dos horas. Transcurrido este tiempo se retiró el tetraóxido de osmio y se realizaron dos lavados con soluciones de acetona al 30, 40, 50, 70, 80, 90 y 100%, centrifugando durante 10 minutos a 7000 rpm.

Los pellets se colocaron en microcápsulas porosas recubiertas por dentro con papel de filtrado lento, todo esto dentro de una solución de acetona absoluta. Las cápsulas conteniendo las muestras se colocaron en un desecador, donde se llevó a cabo el proceso de desecado con CO_2 a punto crítico (-120°C y 1800 psi).

Las muestras secas se colocaron en un porta muestras de aluminio especial para microscopio electrónico, con una base de carbón adhesivo y para llevar a cabo el recubrimiento de las muestras con oro, se colocaron en un equipo Denton Vacuum. Finalmente se observaron en un microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM5900LV a potenciales de 13 y 15 kV. (Sepúlveda 2007, comunicación personal).

2.12 Extracción de ADN

La extracción del ADN bacteriano se hizo por la técnica descrita por Kamalendu (1990) modificada. Se inició la extracción con cultivos en medio líquido en fase exponencial de crecimiento, se tomaron dos mililitros de cultivo y se colocaron en tubos eppendorf estériles, los cuales se centrifugaron a 12,000 rpm. Este paso se realizó cuatro veces hasta obtener un pellet de bacterias.

En el tubo eppendorf donde estaba el pellet de las células bacterianas se agregaron 300 μ L de buffer de lisis, la composición del cual era:

Glucosa 50 mM
Tris 100 mM
EDTA 10 mM
Ajustado a pH 8

Con ayuda de una pipeta con punta estéril, se resuspendió el pellet, tomando varias veces aproximadamente 150 μ L del buffer de lisis y regresándolo al tubo hasta que el pellet se deshizo totalmente y el buffer quedó turbio.

En un tubo especial para Mini Bead-beatter se pesaron 50 mg de perlas de vidrio y se agregaron los 300 μ L de buffer de lisis con las células resuspendidas. La ruptura celular se realizó colocando el tubo en el Mini Bead-beatter durante 30 y 60 segundos.

Después de la ruptura se adicionaron 300 μ L de una solución SDS 4% y EDTA 10 mM, pH 8 y se incubaron las muestras en un baño de agua a 37°C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se adicionó al tubo un mililitro de una mezcla fenol, cloroformo e isoamílico en proporciones 25:24:1, se agitó por inversión durante un minuto y posteriormente se centrifugó durante diez minutos a 12,000 rpm.

El sobrenadante se obtuvo en otro tubo eppendorf limpio y se le adicionó un mililitro de una solución cloroformo, isoamílico (24:1), se agitó por inversión manualmente por un minuto y se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos.

Se obtuvo el sobrenadante en un tubo eppendorf estéril y el ADN fue precipitado con 0.1 vol de NaAc 3 M, pH 5.2 y 1 vol. de Etanol absoluto previamente enfriado a -20°C, se centrifugó durante 10 minutos a 12,000 rpm. El pellet obtenido de ADN después de esta centrifugación se lavó con 500 μ L de etanol 70% y se centrifugó a 12,000 rpm, durante 10 minutos. Se desechó todo el líquido y se dejaron los tubos abiertos para que se evaporara el etanol y se secara el ADN, cuando estuvo completamente seco se resuspendieron las muestras en 20 μ L de agua estéril.

La concentración del ADN y su pureza se estimaron por espectrofotometría a dos longitudes de onda 260 nm (A_{260}) y 280 nm (A_{280}), para calcular la proporción A_{260}/A_{280} . Considerando que una unidad de absorbancia o una D.O. de 260 nm corresponde a 50 ng de ADN/mL; un ratio A_{260}/A_{280} de 1.8 a 2.1 fue apropiado para llevar a cabo los procedimientos basados en la PCR.

2.13 Amplificación de los Génes 16S rADN bacterianos.

Fragmentos de los genes 16S rARN de cada una de las muestras fueron amplificadas por PCR usando los oligonucleótidos universales para bacterias sentido 8FPL (5'-GCG GAT CCG CGG CCG CTG CAG AGT TTG-3') y antisentido 1492RPL (5'-GGC TCG AGC GGC CGC CCG GGT TAC CTT-3') (Relman, 1993).

La mezcla de reacción contenía:

- ▶ 100 ng de ADN genómico
- ▶ 0.8 pM de cada uno de los iniciadores
- ▶ 800 µM de cada uno de los dNTPsP
- ▶ 2.5 mM de MgCl₂
- ▶ *Taq* ADN polimerasa (0.1 U) en el regulador para la PCR proporcionado por el fabricante (1X) (Invitrogen Life Technologies)

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Gene Am PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City) y bajo las condiciones que se muestran en la Tabla 2.13.1.

Tabla 2.13.1. Condiciones de Temperatura, tiempo y ciclos del termociclador.

	Numero de ciclos	Temperatura °C	Tiempo (min)
Desnaturalización	1	92	5
Desnaturalización	35	92	1
Anillamiento		53	1
Extensión		72	2.5
Extensión Final	1	72	10

Una muestra de 5 a 10 µl de cada producto se analizó por electroforesis en geles de agarosa con regulador TAE 1X a 80 V durante 40 min. Los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y visualizados en un transiluminador bajo luz ultravioleta. El marcador de talla molecular empleado fue de 1 kb

2.14 Secuenciación de ADN.

La Secuenciación de los productos de la PCR purificados se realizó de manera directa usando los oligonucleótidos 8FPL y 1492RPL. Las secuencias fueron determinadas con el ABI PRISM 310 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Calif.).

2.15 Identificación Molecular

En todas las secuencias obtenidas se indagó que no fuesen el producto de quimeras con el programa en línea CHIMERA-CHECK de la bases de datos RDP-II.

Las secuencias parciales fueron sujetas a una búsqueda con el programa en línea BLAST version 2.2.3 (Altschul y col., 1990) y con ayuda de los programas de la base de datos RDP Analysis Tools of Ribosomal Database Project-II Release 9 para buscar la jerarquía taxonómica.


Los alineamientos múltiples fueron llevados a cabo con CLUSTAL X (Thompson y col., 1997) seleccionando secuencias emparentadas depositadas en GeneBank del National Center for Biotechnology Information-Taxonomy Homepage (TaxBrowser) y la base de datos ribosomales de la base de datos de Ribosomal Database Project-II.

Los porcentajes de similitud nucleotídica se calcularon con ayuda del programa MEGA v. 2.1 (Kumar y col., 2001). La secuencia más cercana fue utilizada para asignar el nivel taxonómico de las secuencias problema.



CAPITULO III

RESULTADOS



3.1 Aislamiento

Después de los cuatro enriquecimientos sucesivos que se realizaron con acetato de vinilo y la siembra en cajas petri y tubos de cultivo respetando las condiciones del inóculo utilizado (lodo de reactor anaerobio y con limitación de oxígeno); se seleccionaron tres cepas en base a las diferencias morfológicas que presentaban.

Del lodo del reactor con limitación de oxígeno se aisló una cepa (Cepa 1):

Colonialmente blanca filamentosa plana (Figura 3.1.1).

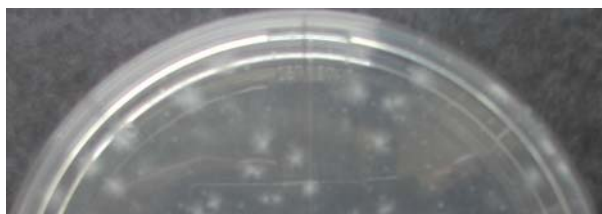


Figura 3.1.1. Cepa 1, aislada de lodo del reactor con limitación de oxígeno.

Del lodo del reactor anaerobio se aislaron dos cepas:

Las dos morfologías seleccionadas en los cultivos anaerobios tenían a simple vista la misma morfología colonial, blanca circular plana con borde entero.

Sin embargo al observarlas al microscopio, la Cepa 2 se veía como una colonia circular grande, (Figura 3.1.2).



Figura 3.1.2. Cepa 2, aislada de lodo del reactor anaerobio

La segunda morfología seleccionada (Figura 3.1.3) microscópicamente era diferente a la Cepa 2, la Cepa 3 era una colonia más oscura y presentaba ramificaciones.



Figura 3.1.3. Cepa 3, aislada de lodo del reactor anaerobio

Cada una de estas tres cepas se probaron en condiciones aerobias y anaerobias, en medio mineral Visser líquido aerobio y anaerobio, de esta manera se obtuvieron seis pruebas diferentes. Los valores de crecimiento y consumo de acetato de vinilo, para cada prueba a los siete días, se muestran en la Tabla 3.1.1.

Tablas 3.1.1. Descripción de las pruebas realizadas con las tres Cepas morfológicamente diferentes seleccionadas

Cepa	Prueba	Origen del inóculo	Condiciones del cultivo líquido	Crecimiento (Absorbancia)	Consumo de Acetato de vinilo
1	1	Lodo Reactor con Oxígeno	Aerobio	0.125	94%
1	2	Lodo Reactor con Oxígeno	Anaerobio	0.039	48.8%
2	3	Lodo Reactor Anaerobio	Aerobio	0.144	72.3%
2	4	Lodo Reactor Anaerobio	Anaerobio	0.039	32.2%
3	5	Lodo Reactor Anaerobio	Anaerobio	0.051	32.3%
3	6	Lodo Reactor Anaerobio	Aerobio	0.013	25.9%

3.2 Tinción de Gram

Según la tinción realizada a todas las pruebas, se encontró que eran bacterias Gram negativas (Figura 3.2.1).

Microscópicamente se encontraron básicamente dos morfologías diferentes (Figura 3.2.1):

- Bacilos largos móviles con terminación plana, en ocasiones formando cadenas
- Coco – bacilos móviles con terminación redonda, y en ocasiones formando cadenas

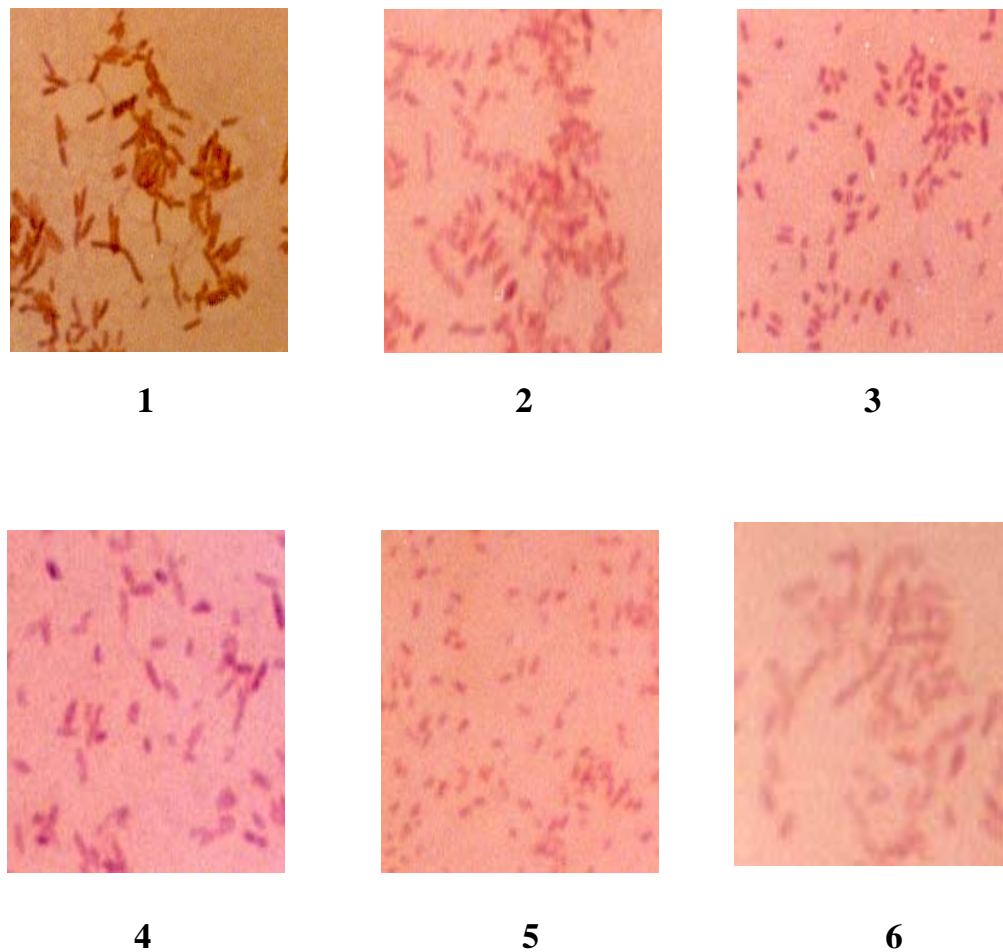


Figura 3.2.1. Morfología microscópica y Gram de las pruebas realizadas

La selección final de las colonias se realizó en base al mayor crecimiento y consumo de acetato de vinilo. Seleccionando la Cepa 1 y 2 bajo condiciones de cultivo aerobias (Celdas sombreadas Tabla 3.1.1).

La Cepa 1 en condiciones aerobias tuvo un crecimiento medido en densidad óptica máximo de 0.125 y un 94% de consumo del acetato de vinilo.

La Cepa 2 bajo condiciones aerobias consumió 72.3% del acetato de vinilo y un crecimiento máximo de 0.144.

3.3 Consumo de Acetato de Vinilo

La degradación del acetato de vinilo por la Cepa 1 se llevó a cabo en dos días, tiempo característico de las bacterias aerobias, la formación de productos (etanol y acetato) se observa al primer día y posteriormente el consumo de ambos. La velocidad de consumo del acetato de vinilo fue de 61.23 mg/L d y la velocidad de crecimiento de la bacteria de 0.045 d⁻¹ (Figura 3.3.1).

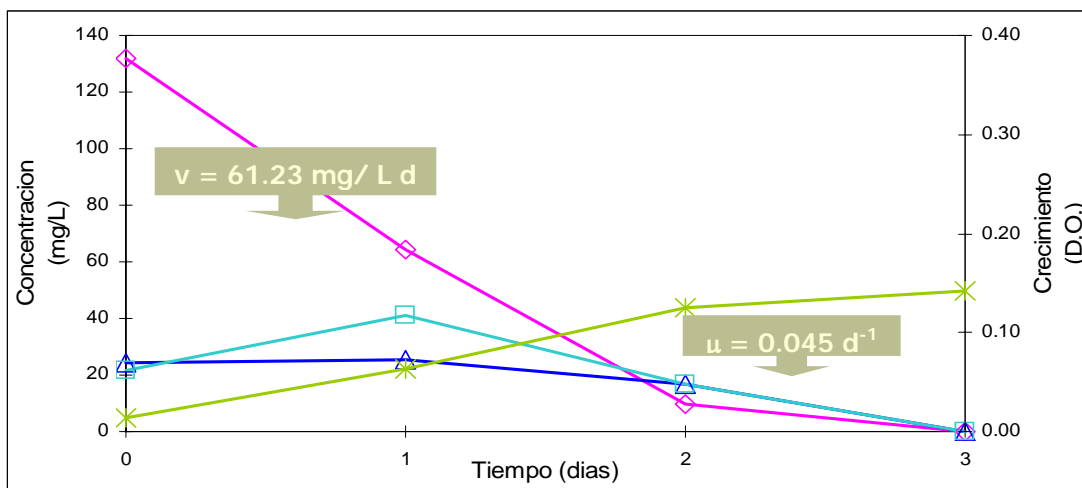


Figura 3.3.1. Biodegradación del acetato de vinilo y crecimiento de la Cepa 1. \blacklozenge acetato de vinilo, \blacktriangle etanol, \blacksquare acetato, \blackstar crecimiento.

La Cepa 2, degradó el acetato de vinilo (Figura 3.3.2) en 4 días, con la formación de productos (etanol y acetato) en el primer día y el consumo de éstos en los siguientes. La velocidad de consumo del acetato de vinilo de esta cepa fue de 29.82 mg/L d y la velocidad de crecimiento de 0.064d⁻¹.

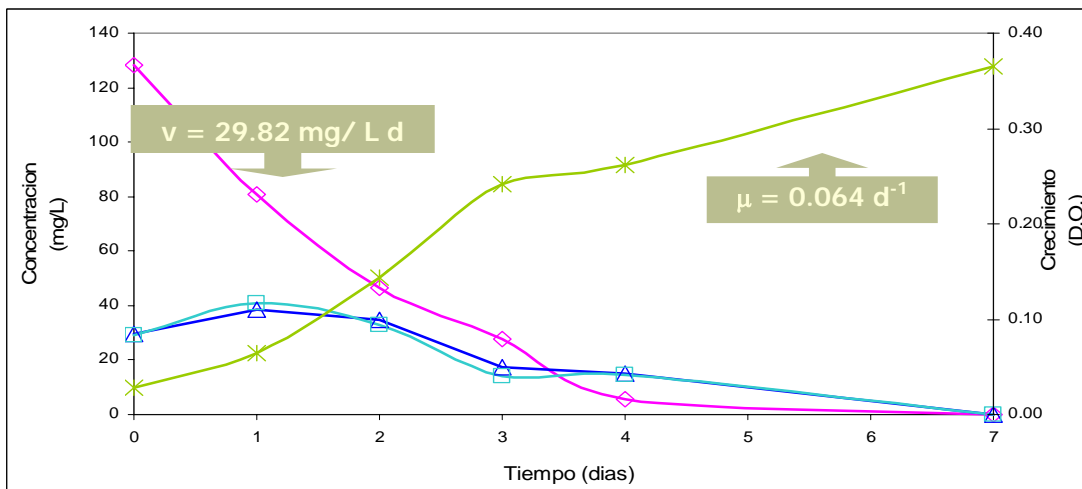


Figura 3.3.2. Biodegradación del acetato de vinilo y crecimiento de la Cepa 2. \blacklozenge acetato de vinilo, \blacktriangle etanol, \blacksquare acetato, \blackstar crecimiento.

3.4 Morfología Colonial y Microscópica

La Cepa 1 es una colonia blanca ramificada y plana, microscópicamente bacilos largos móviles, en ocasiones en cadena, Gram negativos (Figura 3.4.1).

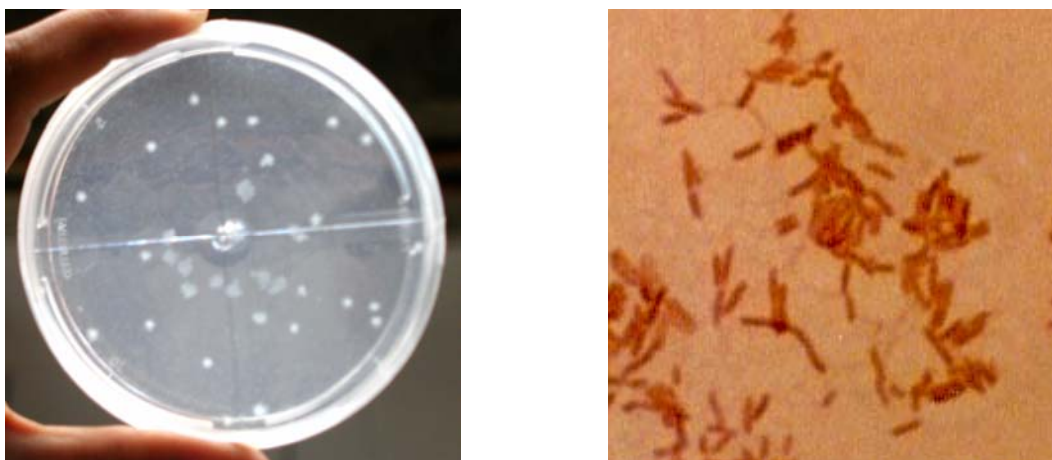


Figura 3.4.1. Morfología colonial y microscópica de la Cepa 1

La morfología de la Cepa 2 (Figura 3.4.2) son colonias pequeñas blancas planas con bordes enteros y microscópicamente se observan bacilos cortos móviles en ocasiones formando cadenas, Gram negativos.

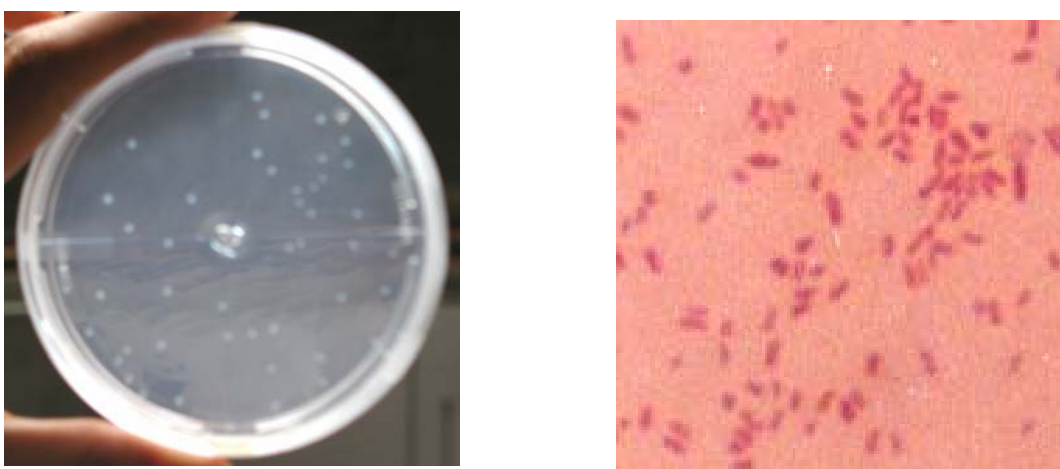


Figura 3.4.2. Morfología colonial y microscópica de la Cepa 2.

3.5 Pruebas de Crecimiento con Factores de Crecimiento

- Extracto de levadura

Para la Cepa 1, se encontró que la mayor velocidad de crecimiento (0.024 h^{-1}) se obtenía a partir de la concentración de 0.4 g/L y era constante hasta la mayor concentración probada que fue de 1.0 g/L (Figura 3.5.1).

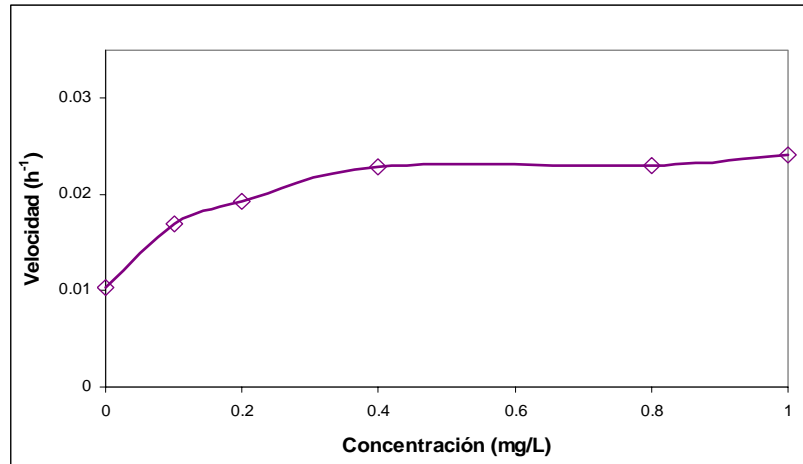


Figura 3.5.1. Velocidad de crecimiento con diferentes concentraciones de extracto de levadura de la Cepa 1.

Con las diferentes concentraciones de extracto de levadura, la mayor velocidad de crecimiento para la Cepa 2, fue de 0.030 h^{-1} cuando la concentración de extracto de levadura era de 1 g/L (Figura 3.5.2).

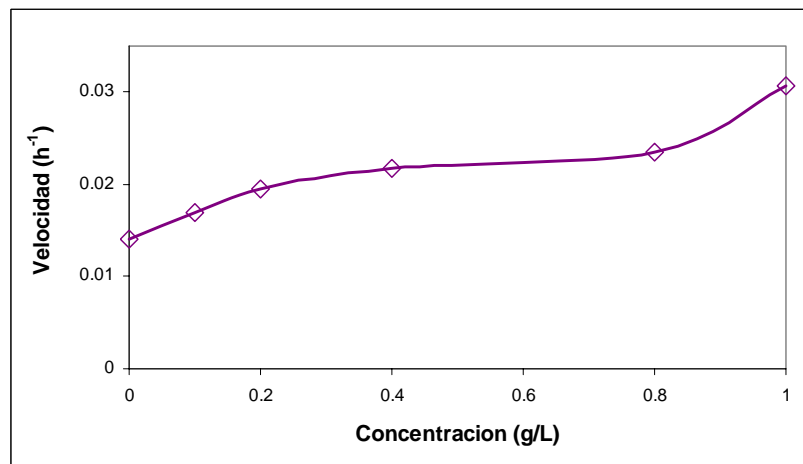


Figura 3.5.2. Velocidad de crecimiento con diferentes concentraciones de extracto de levadura de la Cepa 2.

Con los datos obtenidos de la prueba para determinar el efecto del extracto de levadura sobre el crecimiento, se realizó un análisis estadístico de varianza y se calcularon los valores de F crítica y F calculada para ambas Cepas (Tabla 3.5.1).

Hipótesis: El aumento en la concentración de extracto de levadura, tendrá influencia, favoreciendo el crecimiento.

Tabla 3.5.1. Valores estadísticos calculados para la prueba de las diferentes concentraciones de extracto de levadura para la Cepa 1 y 2.

	F crítica	F calculada
Cepa 1	6.608	1.885
Cepa 2	6.608	4.386

Como F calculada es menor que F crítica, la hipótesis se rechaza por lo tanto la concentración de extracto de levadura no tiene influencia sobre el crecimiento de ninguna de las dos Cepas. Y esto a pesar de que en la Cepa 2, la velocidad de crecimiento aumentaba conforme aumentaba la concentración de extracto de levadura y se obtuvo la mayor velocidad con la mayor concentración probada.

Para la Cepa 1, en el consumo de Acetato de Vinilo se encontró que independientemente de la concentración de extracto de levadura de la que se tratara, a las 48 horas se había consumido el compuesto totalmente. Sin embargo la velocidad de consumo era diferente en cada concentración, con 0.1 g/L de extracto de levadura la velocidad de consumo era de 0.054 mg/L-h y con 1.0 g/L era de 1.43 mg/L-h (Figura 3.5.3)

Con esto se verificó que el microorganismo sigue tomando el acetato de vinilo como fuente de carbono y no es reemplazado por el extracto de levadura, sin embargo si tiene influencia en la velocidad de consumo.

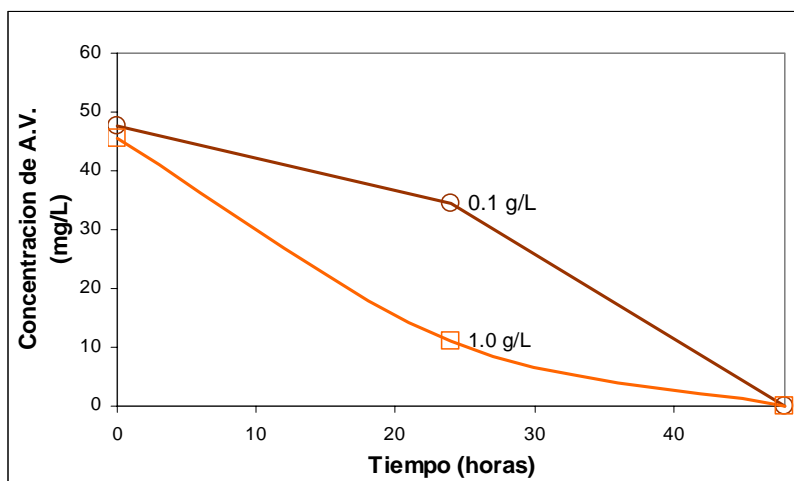


Figura 3.5.3. Consumo de acetato de vinilo con 0.1 y 1.0 g/L de extracto de levadura de la Cepa 1.

Con la concentración de 1.0 g/L de extracto de levadura se observó, para la Cepa 2, que el acetato de vinilo había sido degradado en su totalidad en 48 horas con una velocidad de consumo de 3.12 mg/L-h, mientras que para la concentración de 0.1 g/L la velocidad de consumo fue menor 2.13 mg/L-h (Figura 3.5.4).

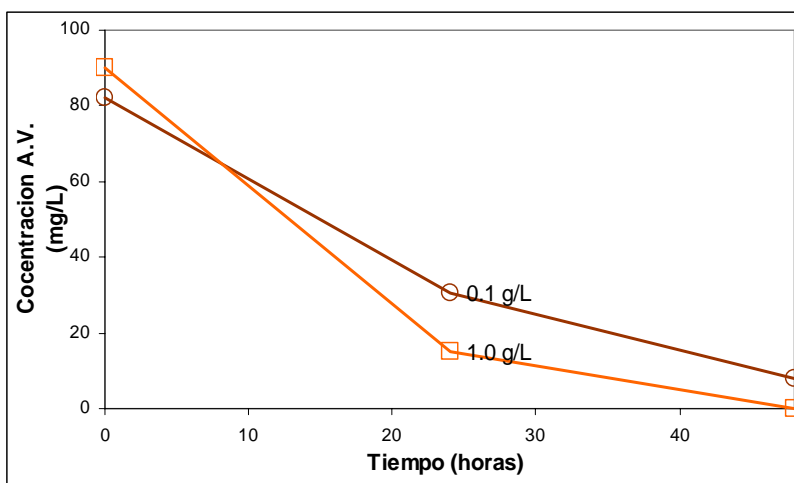


Figura 3.5.4. Consumo de acetato de vinilo con 0.1 y 1.0 g/L de extracto de levadura de la Cepa 2.

Por lo tanto el microorganismo no toma el extracto de levadura como fuente de carbono sino solo como un factor de crecimiento, por lo tanto al agregarle este compuesto tenemos más crecimiento y mayor consumo debido a que sigue tomando el acetato de vinilo como fuente de carbono.

- Peptona de caseína

La velocidad de crecimiento de la Cepa 1 se vió afectada por la concentración de peptona de caseína. La velocidad de crecimiento era mayor conforme aumentaba la concentración de peptona, obteniéndose la máxima de 0.027 h^{-1} con 1.0 g/L. Figura 3.5.5.

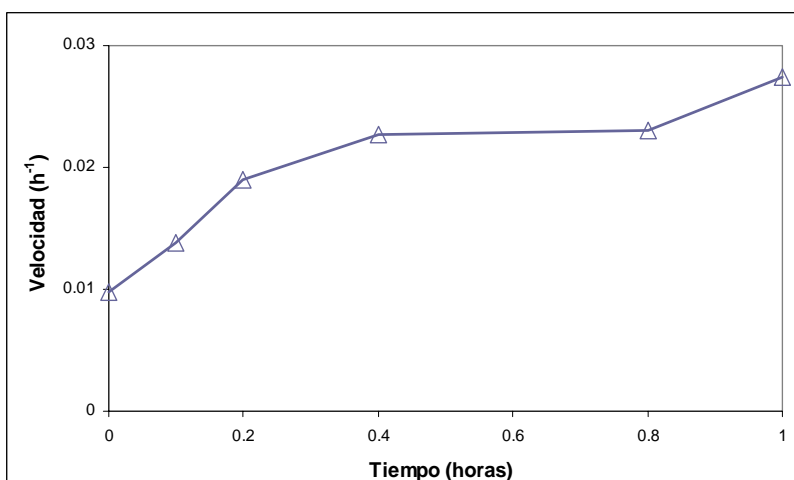


Figura 3.5.5. Velocidades de crecimiento con diferentes concentraciones de peptona de caseína para la Cepa 1.

Para la Cepa 2, los valores de crecimiento obtenidos durante el periodo de monitoreo de esta prueba, no presentaron consistencia para ser graficados, así que se realizó un análisis estadístico de varianza de los datos, tomando en cuenta las diferentes concentraciones y la máxima absorbancia registrada a las 46 horas (Tabla 3.5.2).

Tabla 3.5.2. Análisis estadístico de varianza con las diferentes concentraciones de peptona de caseína para la Cepa 2.

Peptona de Caseína (g/L)	0	0.1	0.2	0.4	0.8	1.0
Crecimiento máximo (D.O)	0.075	0.054	0.103	0.106	0.183	0.202

La hipótesis para la prueba estadística de varianza fue: El aumento en la concentración de peptona de caseína, tendrá influencia, favoreciendo el crecimiento. Se obtuvieron valores de F calculada y la F crítica para ambas Cepas. (Tabla 3.5.3).

Tabla 3.5.3. Valores estadísticos calculados para la prueba de las diferentes concentraciones de peptona de caseína para la Cepa 1 y 2.

	F critica	F calculada
Cepa 1	6.608	4.373
Cepa 2	6.608	4.416

Un valor de F calculada menor que F critica (Tabla 3.5.3), nos indica que todas las medias son iguales, por lo tanto se rechaza la hipótesis planteada, de esta manera las diferentes concentraciones de peptona de caseína no tienen influencia en el crecimiento de la Cepa 1 ni de la Cepa 2. A pesar de que se observa que la máxima velocidad de crecimiento de la Cepa 1, se encontraba con la mayor concentración de peptona de caseína (Figura 3.5.5).

La no influencia significativa del extracto de levadura y la peptona de caseína en el crecimiento de estas Cepas nos indica que son microorganismos con requerimientos nutricionales simples, aunque estos componentes si influyen en la velocidad de consumo.

3.6 Pruebas de Crecimiento con Intermediarios: etanol, acetaldehído y acetato.

Al probar la Cepa 1 con los diferentes intermediarios de la degradación del acetato de vinilo, se obtuvo el mayor crecimiento en las dos pruebas sucesivas realizadas en etanol, debido a que es un compuesto menos tóxico que el acetato de vinilo y esto concuerda con lo observado por Nieder y colaboradores en 1990, y el comportamiento de la bacteria aislada V2, que tenía mayor crecimiento en etanol y acetato.

En las dos pruebas se observó un comportamiento similar con respecto al consumo de los intermediarios y los controles (Figura 3.6.1).

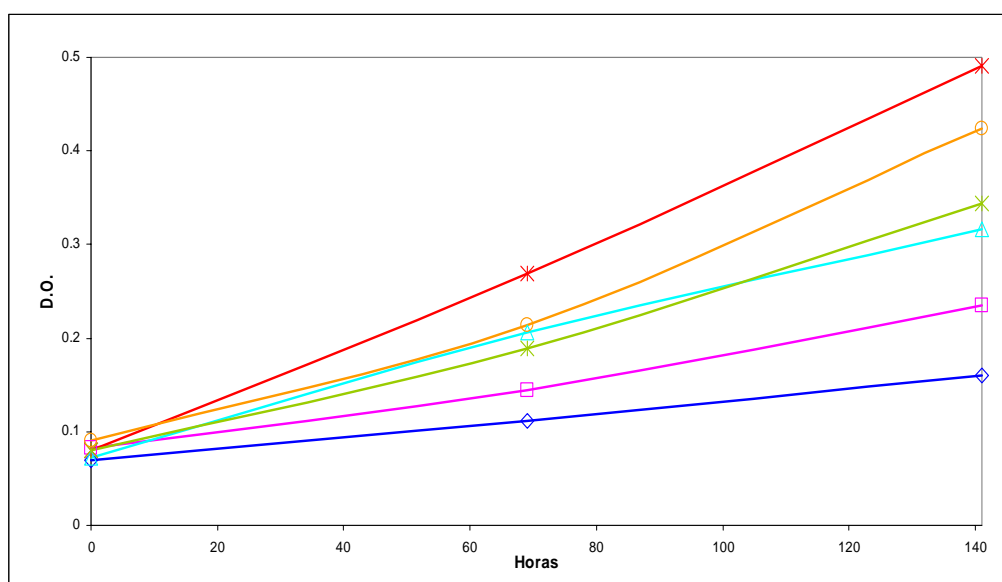


Figura 3.6.1. Prueba de crecimiento medida por D. O. con los intermediarios de la degradación del acetato de vinilo de la Cepa 1. \circ acetato de vinilo, \ast acetaldehído, \triangle acetato, \ast etanol, \square control peptona, \diamond control levadura.

Comparando las curvas de crecimiento en los controles y cada uno de los intermediarios, se observa que están por debajo de las curvas de crecimiento con los intermediarios, por lo tanto, las bacterias no están creciendo únicamente por los factores de crecimiento o la fuente orgánica de nitrógeno, proporcionados por el extracto de levadura y la peptona de caseína sino también por el consumo de los compuesto de interés. Esto se probó al momento en que se estabilizó el crecimiento de la Cepa 1 en la segunda prueba, porque se midió la concentración de cada compuesto y se encontró que el consumo había sido completo para todos los intermediarios y el acetato de vinilo.

3.7 Cinéticas de Consumo de Acetato de Vinilo

Los datos obtenidos durante las cinéticas de consumo de la Cepa 1 con las diferentes concentraciones de acetato de vinilo se presentan en la Figura 3.7.1.

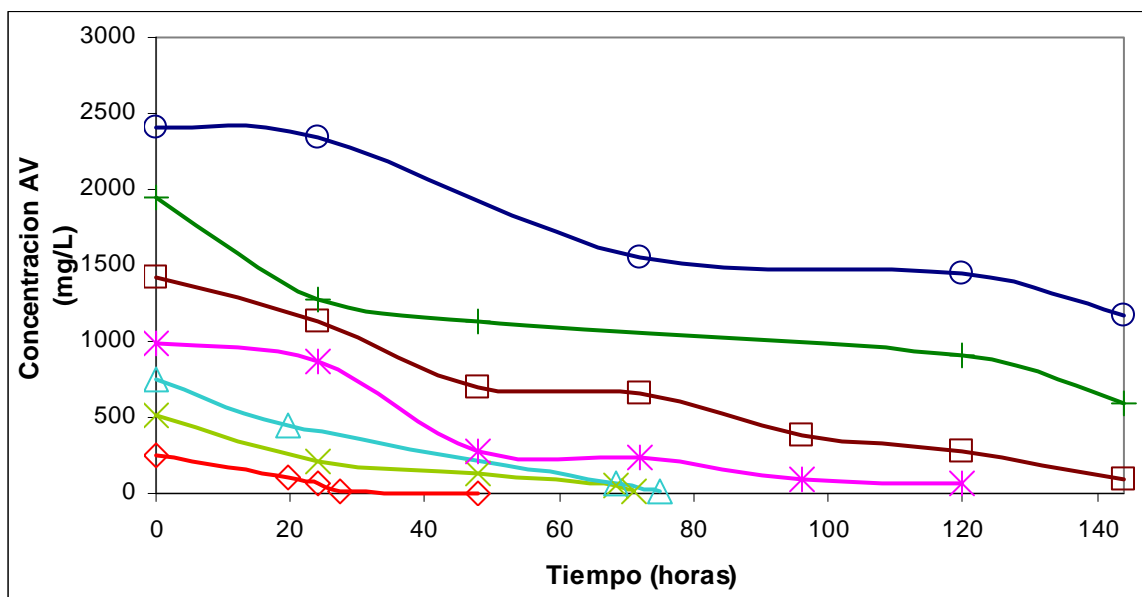


Figura 3.7.1. Consumo de acetato de vinilo de la Cepa 1 a diferentes concentraciones.

Las velocidades de consumo se obtuvieron al calcular las pendientes de cada línea de concentración (Tabla 3.7.1 y Figura 3.7.2).

Tabla 3.7.1. Concentraciones reales de acetato de vinilo y velocidades de consumo para la Cepa 1.

Concentración (mg/L)	Velocidad (mg/L-h)
254	5.43
509	6.24
743	9.26
992	10.08
1427	9.02
1954	8.32
2410	8.85

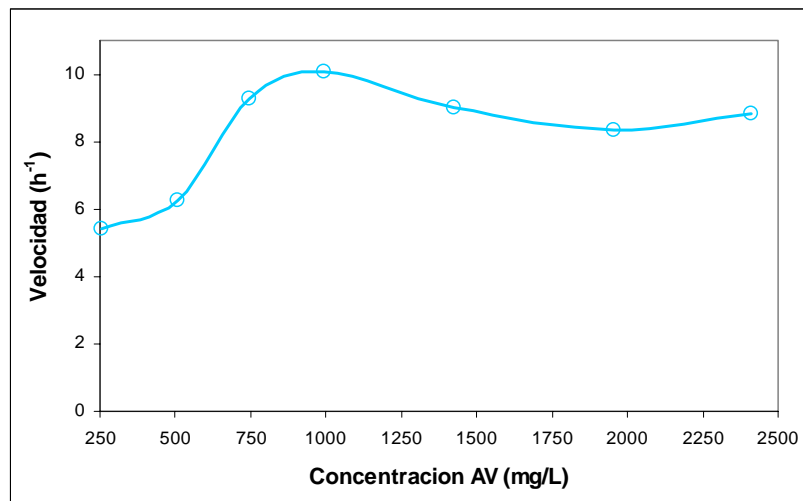


Figura 3.7.2. Gráfica de Monod para el consumo de la Cepa 1.

Al graficar las concentraciones contra la velocidad de consumo, se observó que la velocidad aumentaba en las primeras cuatro concentraciones (250, 500, 750 y 1000 mg/L) y después se estabilizaba, comportamiento bacteriano común (curva de Monod).

Los datos de consumo de acetato de vinilo de la Cepa 2 se presentan en la Figura 3.7.3.

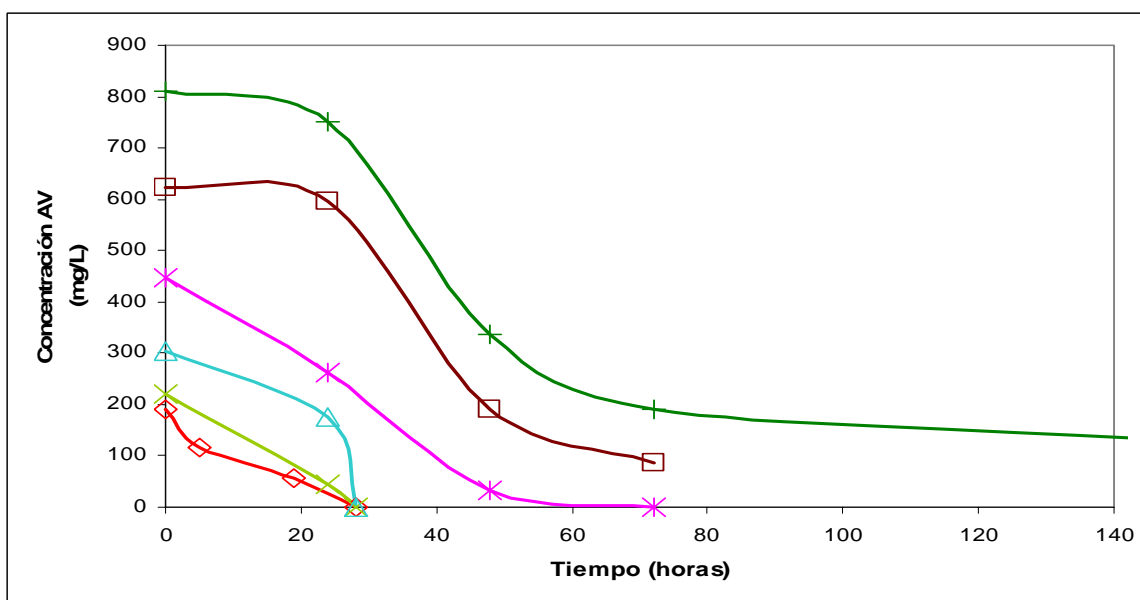


Figura 3.7.3. Consumo de acetato de vinilo de la Cepa 2 a diferentes concentraciones.

A partir de la concentración de 621 mg/L se observó una fase de retardo de 20 horas, comparada con las concentraciones pequeñas; sin embargo las velocidades de consumo son mayores (Tabla 3.7.2)

Tabla 3.7.2. Concentraciones reales de acetato de vinilo y velocidades de consumo para la Cepa 2.

Concentración (mg/L)	Velocidad (mg/L-h)
117.23	5.02
221.66	7.72
304.33	8.96
447.08	8.64
621.51	10.59
811.54	9.49

La Figura 3.7.4, representa la gráfica de Monod para las velocidades de consumo calculadas. Este comportamiento se obtuvo con concentraciones menores de 1000 mg/L.

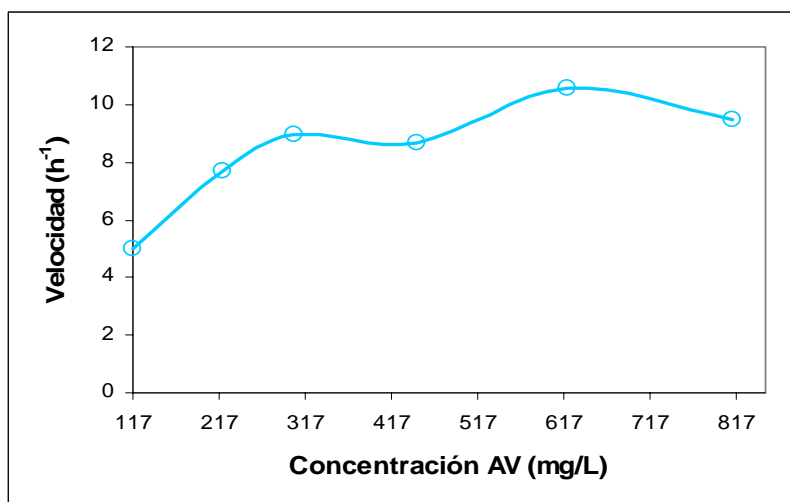


Figura 3.7.4. Gráfica de Monod para el consumo de la Cepa 2.

El aumento en las velocidades de consumo de acetato de vinilo se observó en las primeras cuatro concentraciones probadas (Tabla 3.7.2) y una estabilización en las últimas dos.

3.8 Determinación de Constantes Cinéticas V_{max} y K_s

Para la Cepa 1, a partir de los puntos de consumo exponencial se calculó V_{max} y K_s , por los métodos de Lineweaver-Burk (Figura 3.8.1) y Eddie-Hofstee (Figura 3.8.2).

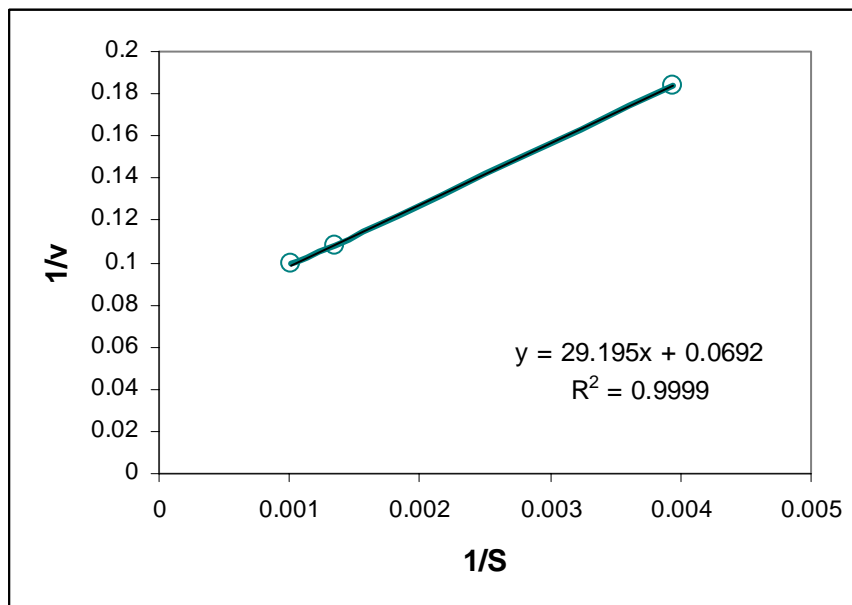


Figura 3.8.1. Grafica del método Lineweaver.Burk para la Cepa 1.

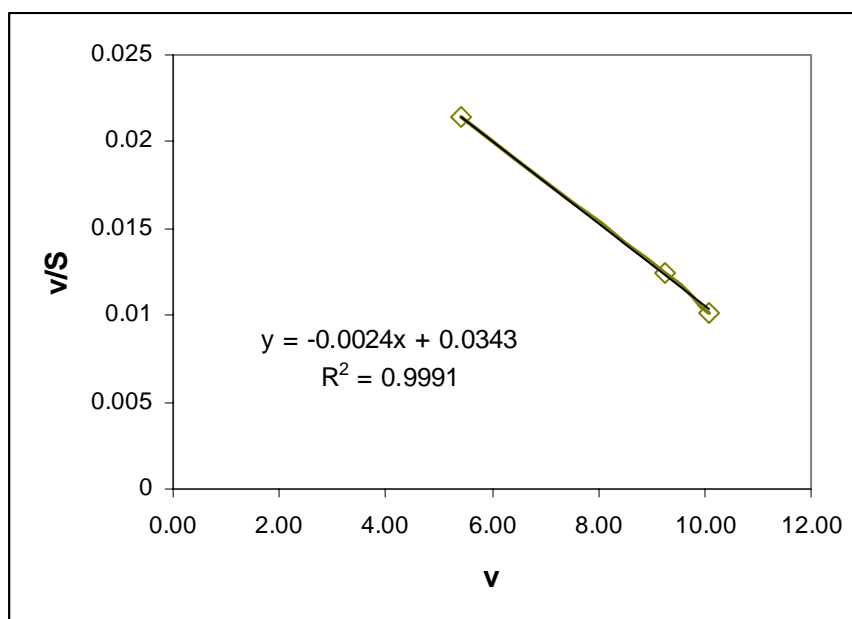


Figura 3.8.2. Grafica del método Eddie-Hofstee para la Cepa 1.

Para el cálculo de V_{max} y K_s de la Cepa 2, se obtuvieron rectas según el método Lineweaver-Burk (Figura 3.8.3) y según el método Eddie-Hofstee (Figura 3.8.4).

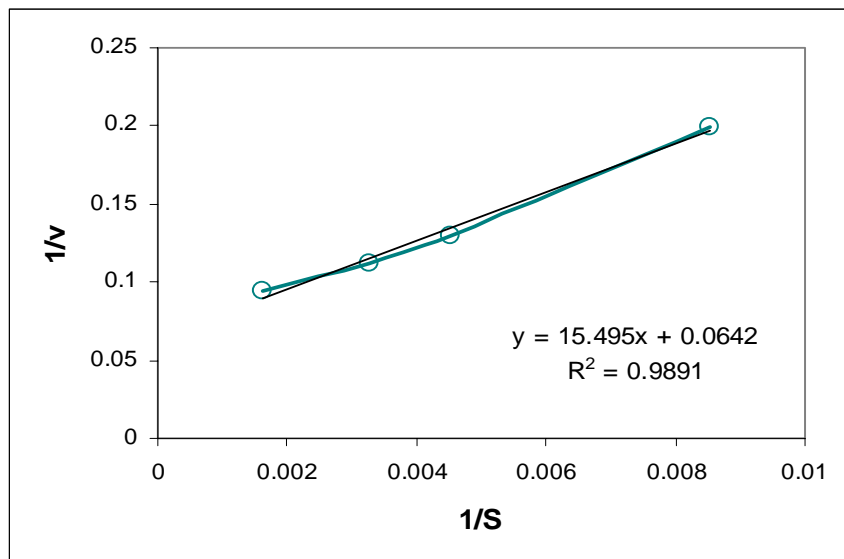


Figura 3.8.3. Gráfica del método Lineweaver.Burk para la Ceba 2.

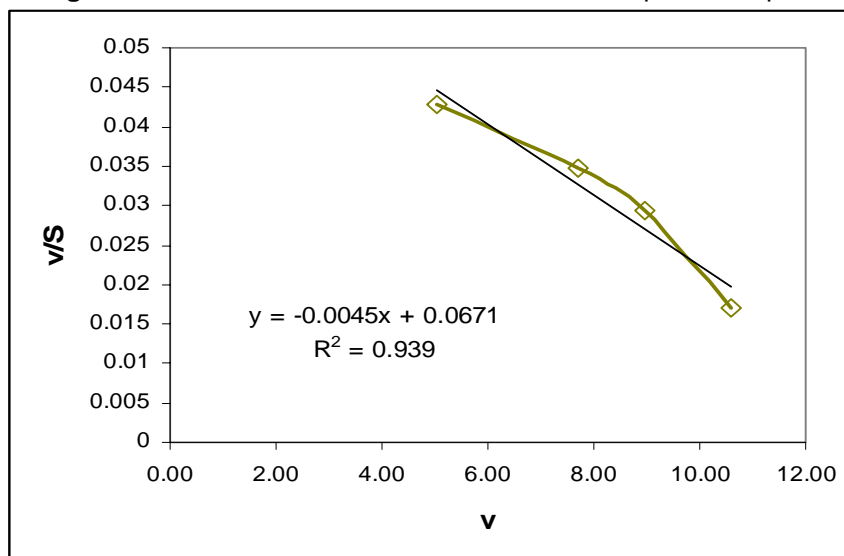


Figura 3.8.4. Gráfica del método Eddie-Hofstee para la Ceba 2.

De estas graficas y según el método se calcularon valores de Vmax y K_S para acetato de vinilo, los valores de las constantes cinéticas obtenidos por ambos métodos fueron muy similares. (Tabla 3.8.1).

Tabla 3.8.1. Valores de Vmax y K_S de la Ceba 1 y 2.

	Lineweaver-Burk		Eddie-Hofstee	
	K _S (mg/L)	V _{MAX} (mg/L-h)	K _S (mg/L)	V _{MAX} (mg/L-h)
CEPA 1	421.9	14.45	416.7	14.29
CEPA 2	241.36	15.49	222.22	14.91

Los valores de K_S altos, indica poca afinidad por el acetato de vinilo en ambas Cepas, bajo las condiciones de cultivo evaluadas.

3.9 Microscopia Electrónica

En las imágenes obtenidas por microscopia electrónica se observa que la Cepa 1, son bacilos cortos con terminaciones redondas (Figura 3.9.2, 3.9.3) y en algunos hay presencia de una cápsula (Figura 3.9.1, 3.9.4) la cual se observa como una cubierta con pliegues, también se evidencia que son bacterias con flagelos periféricos (Figura 3.9.4) los cuales le proporciona movilidad.

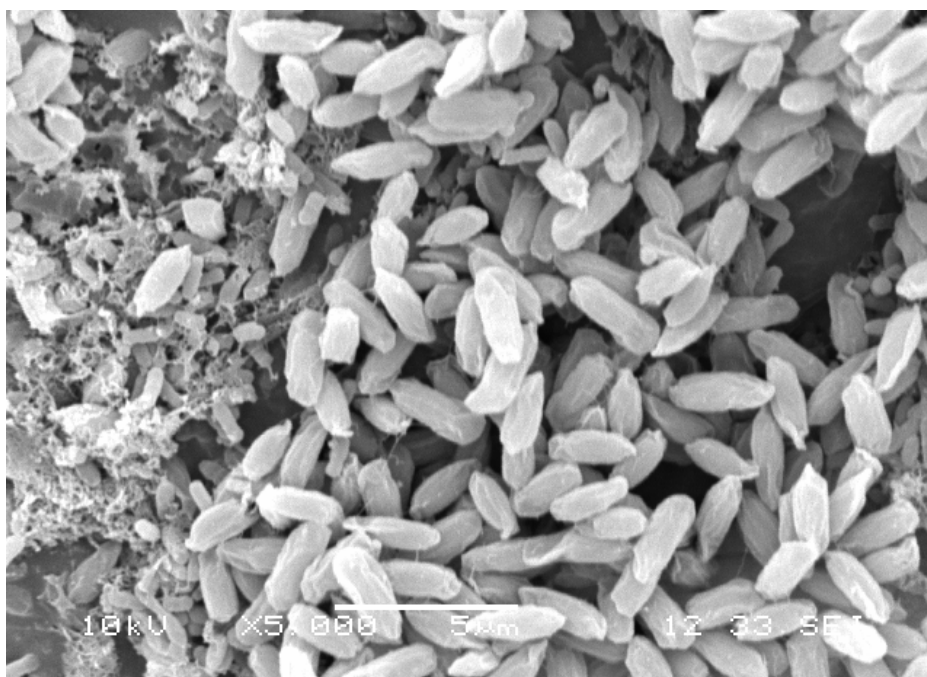


Figura 3.9.1. Microscopia electrónica de la Cepa 1 a 5,000 de aumento y 10kV

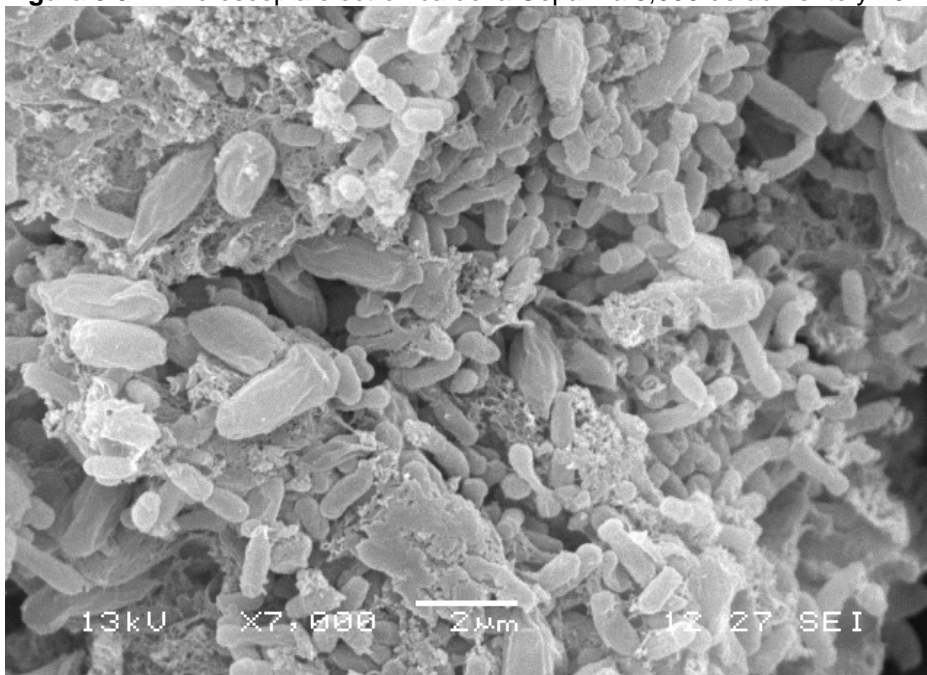


Figura 3.9.2. Microscopia electrónica de la Cepa 1 a 7,000 de aumento y 13kV



Figura 3.9.3. Microscopia electrónica de la Cepa 1 a 13,000 de aumento y 13kV

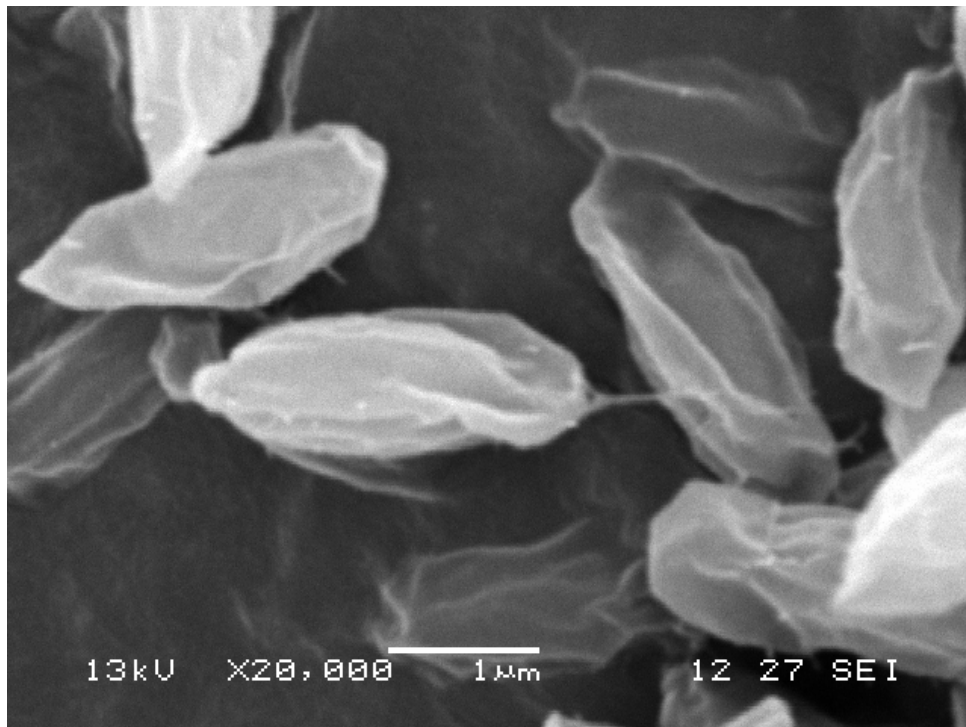


Figura 3.9.4. Microscopia electrónica de la Cepa 1 a 20,000 de aumento y 13kV

A partir de estas imágenes se pudo tener una aproximación del tamaño (largo y diámetro) de las bacterias (algunos valores incluyen la cápsula), estos datos se muestran en la Tabla 3.9.1.

Tabla 3.9.1. Medidas de largo y diámetro de la Cepa 1

Largo μm		Diámetro μm	
Cápsula	Sin capsula	Cápsula	Sin cápsula
3.27		0.980	
1.83		0.783	
	0.914		0.457
	1.18		0.412

La microscopía electrónica de la Cepa 2 reveló la presencia de dos tipos de bacilos largos (Figura 3.9.7) y cortos (Figura 3.9.5, 3.9.6 y 3.9.7) ambos con terminación redonda y flagelados. Los cortos en ocasiones unidos, formando cadenas (Figura 3.9.5, 3.9.6, y 3.9.8).

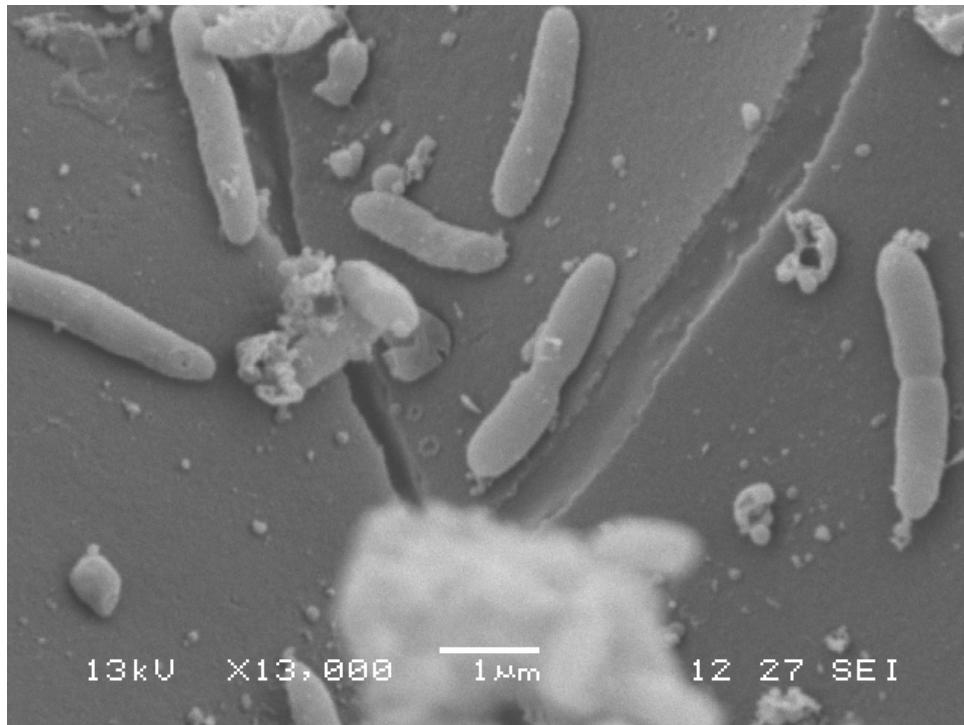


Figura 3.9.5. Microscopía electrónica de la Cepa 2 a 13,000 de aumento y 13kV

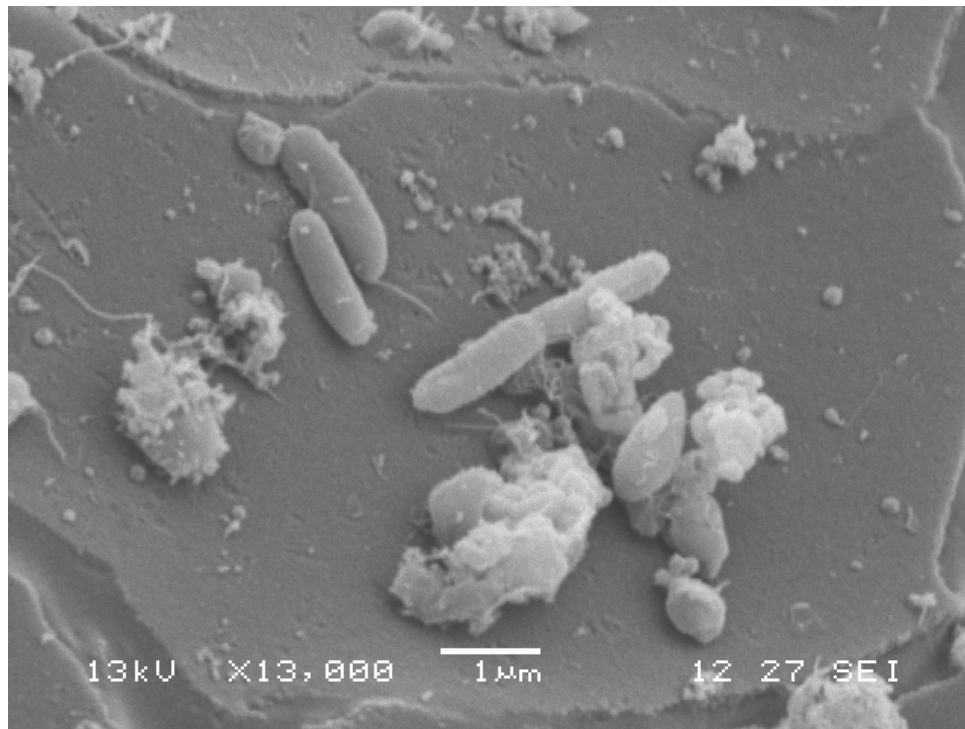


Figura 3.9.6. Microscopia electrónica de la Ceba 2 a 13,000 de aumento y 13kV

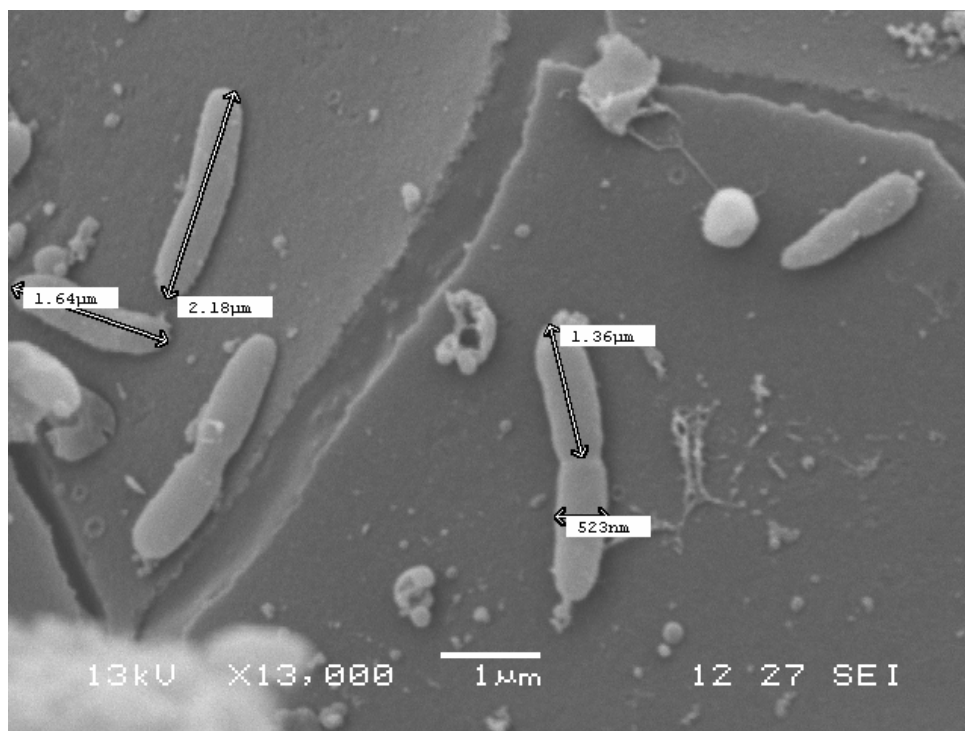


Figura 3.9.7. Microscopia electrónica de la Ceba 2 a 13,000 de aumento y 13kV

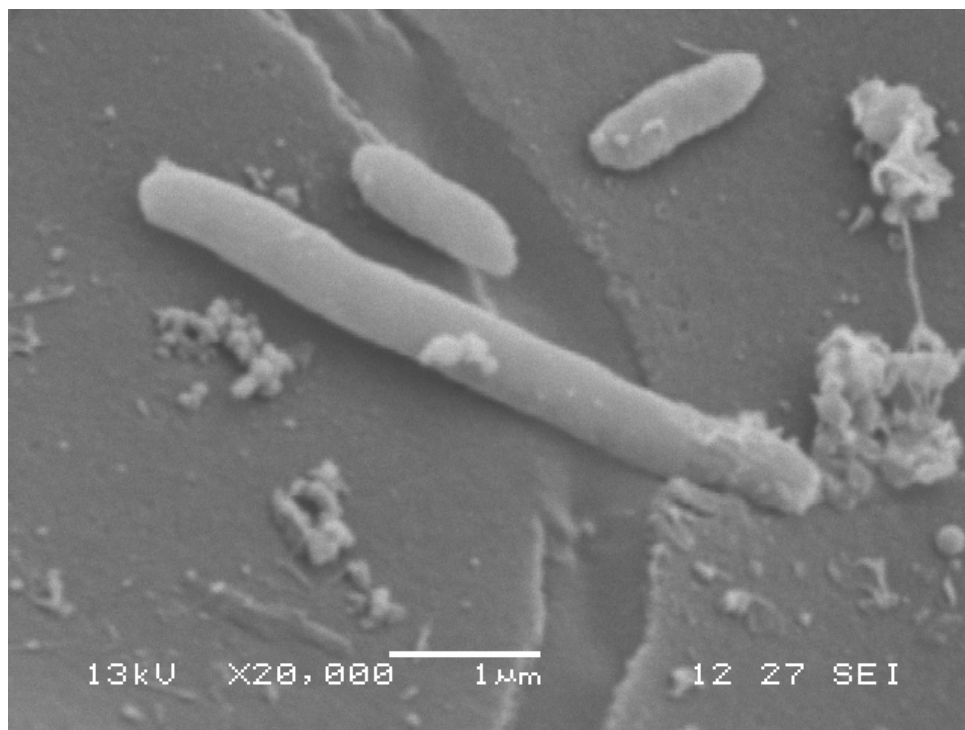


Figura 3.9.8. Microscopia electrónica de la Cepa 2 a 20,000 de aumento y 13kV

A partir de estas imágenes se obtuvo las dimensiones de estas bacterias (Tabla 3.9.2).

Tabla 3.9.2. Medidas de largo y diámetro de la Cepa 2

Largo μm		Diámetro μm
Bacilos largos	Bacilos cortos	
4.92	2.18	0.523
3.33	1.64	0.477
	1.36	0.431

Biología Molecular

3.10 Extracción de ADN

El ADN obtenido de cada Cepa se corrió en un gel de agarosa. En el primer carril se colocó el marcador de peso molecular (1kb), del carril dos al cinco el ADN de la Cepa 1 y en los últimos dos carriles el ADN de la Cepa 2. (Figura 3.10.1)

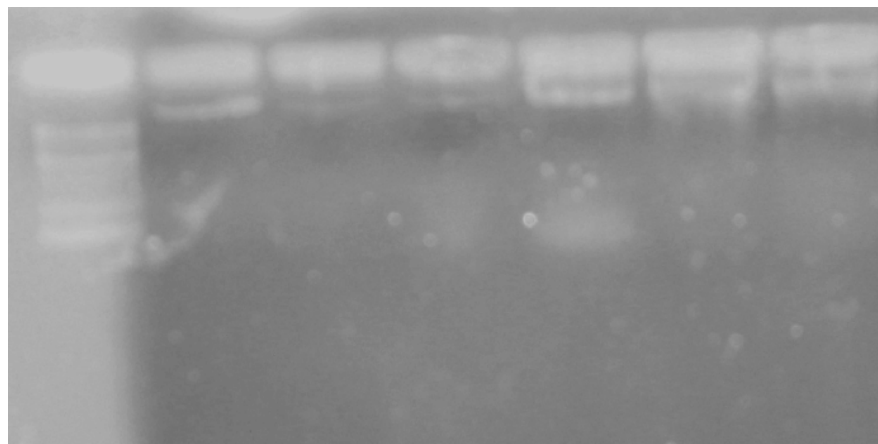


Figura 3.10.1. Foto del gel donde se corrió el ADN obtenido de la Cepa 1 y 2.

3.11 Secuenciación

A partir del gen amplificado 16S rADN cuyo tamaño esperado era de 1500 pb aproximadamente. Se obtuvo la secuencia y cromatograma para la reacción de secuenciación derecha (Figura 3.11.1) e izquierda (Figura 3.11.2) para la Cepa 1.

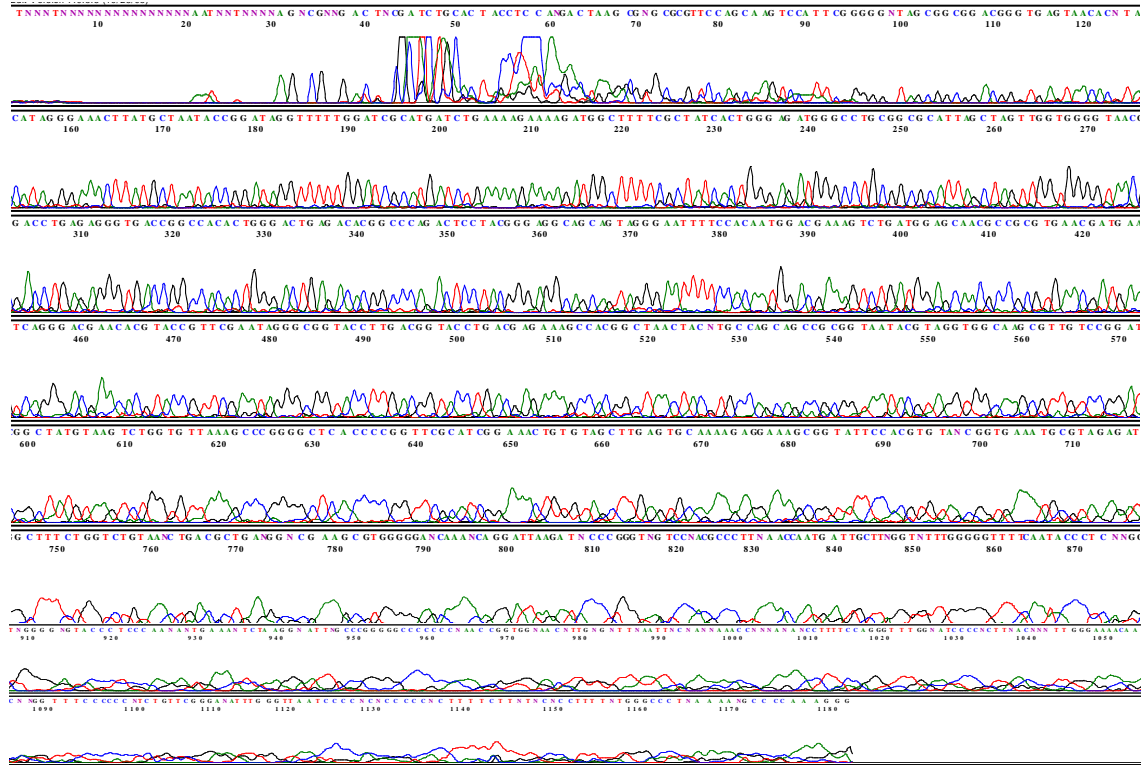


Figura 3.11.1. Secuencia y cromatograma obtenidos para la reacción de secuenciación derecha de la Cepa 1.

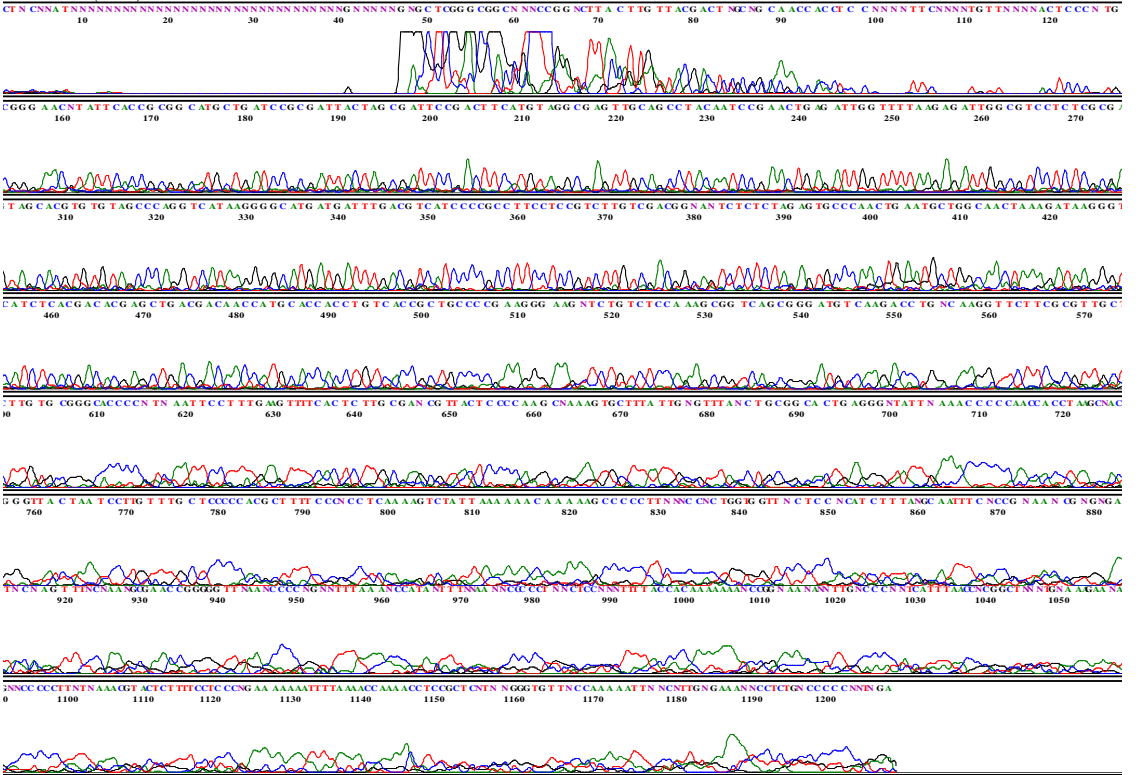


Figura 3.11.2. Secuencia y cromatograma obtenidos para la reacción de secuenciación izquierda de la Cepa 1.

3.12 Identificación Molecular

Se realizaron blasts con las secuencias obtenidas para la Cepa 1 y según las secuencias más cercanas se asignó el nivel taxonómico. Así los porcentajes de similitud entre la secuencia problema y la secuencia más próxima para definir a nivel de género y especie fueron 95% y 97.5% respectivamente (Rossello-Mora y Amman, 2001). Las secuencias con porcentajes de similitud menores a 95% fueron asignados a nivel de la familia más cercana (Tabla 3.12.1).

Tabla 3.12.1. Similitudes de la Cepa 1 con sus parientes más cercanos

Parientes más próximos dentro del género	Número de bases diferentes	Porcentaje de similitud en las 1346 pb
<i>Brevibacillus agri</i> (D78454)	9	99.33
<i>B. formosus</i> (D78460)	11	99.18
<i>B. brevis</i> (D78457)	13	99.03
<i>B. parabrevis</i> (D78463)	13	99.03
<i>B. choshinensis</i> (D78459)	14	98.95
<i>B. limnophilus</i> (AB112717)	17	98.73
<i>B. reuszeri</i> (D78464)	19	98.58
<i>B. centrosporus</i> (D78458)	26	98.06
<i>B. invocatus</i> (AF378231)	35	97.39
<i>B. ginsengisoli</i> (AB245376)	47	96.50
<i>B. borstelensis</i> (D78456)	48	96.43
<i>B. levickiigi</i> (AJ715378)	57	95.76
<i>B. laterosporus</i> (D16271)	63	95.31
<i>B. thermoruber</i> (Z26921)	68	94.94
<i>Paenibacillus alvei</i> (AJ320491)	155	88.48

En la Figura 3.12.1, se muestra el dendograma filogenético de la Cepa 1.

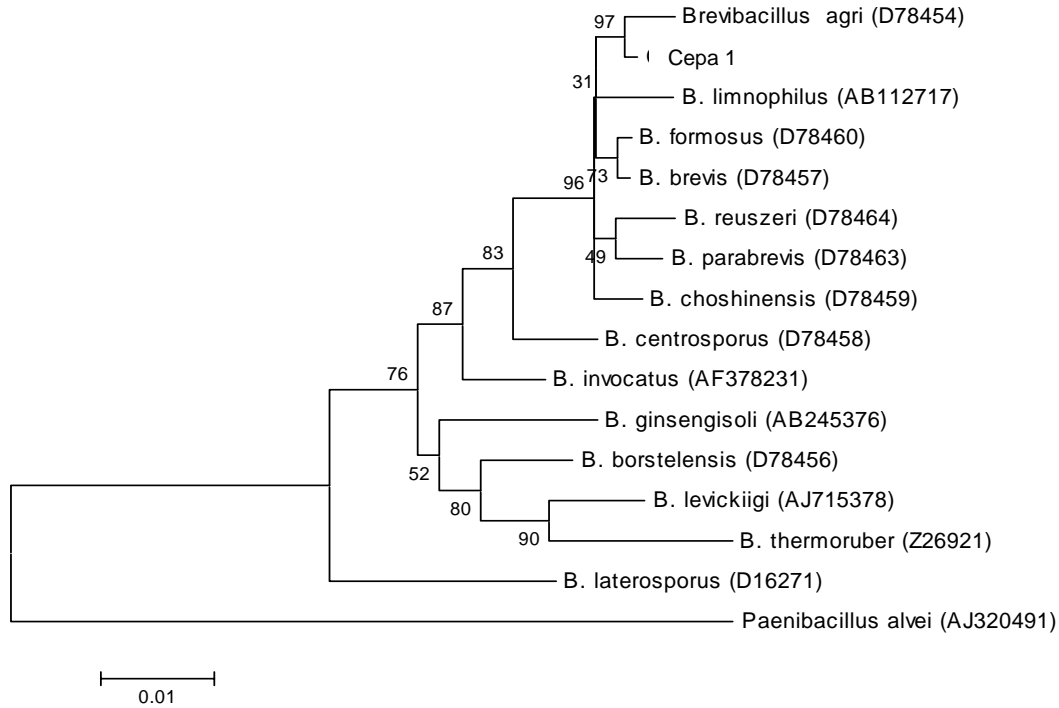



Figura 3.12.1. Dendograma filogenético de la Cepa 1

Según el porcentaje de similitud del 99.3% de la Cepa 1 con *Brevibacillus agri* (Nakamura 1993), podemos decir que se trata de esta especie.

Las secuencias obtenidas para la Cepa 2 no fueron de buena calidad, las razones pueden ser variadas: la cepa vive en una asociación estricta, posee varios genes ribosomales diferentes, etc. Sin embargo con las secuencias disponibles y la información obtenida durante el estudio de esta bacteria podemos decir que posiblemente se trate de una cepa de *Brevibacillus*.



CAPITULO IV

DISCUSSION



Descripción del Género Brevibacillus

Shida y colaboradores en 1996, propusieron dos nuevos géneros *Brevibacillus* y *Aneurinibacillus*, describiendo el género *Brevibacillus* como:

Brevibacillus (Bre.-vi.ba.cil'lus. L. adj. *brevis*, corto; L. dim. n. *bacillus*, pequeñas barras; M. L. masc. n. *Brevibacillus*, cortos, pequeñas barras.)

Este género se divide en nueve especies: *Brevibacillus brevis*, *B. agri*, *B. centrosporus*, *B. choshinensis*, *B. parabrevis*, *B. reuszeri*, *B. formosus*, *B. borstelensis*, *B. migulanus* y *B. aneurinolyticus*.

Estas células tienen forma de barra (0.7 a 0.9 μm de diámetro y de 3.0 a 5.0 μm de largo). Gram positivos o Gram variable. Móviles por si mismos o con flagelos periféricos. Esporas elipsoidales. Las colonias son planas, suaves y con coloración amarillo-grisácea, no producen pigmentos solubles en agar nutritivo. Casi todas las especies son aerobias estrictas, *Brevibacillus laterosporus* es anaerobia facultativo.

El crecimiento a pH de 5.6 o 5.7 y a 50°C es variable. El crecimiento óptimo ocurre a pH de 7.0. La temperatura optima de nueve especies (excepto *Brevibacillus thermoruber*) es 30°C (Claus, D. & Berkeley).

El nombre de *Bacillus brevis* fue asignado por Migula en 1900 a una bacteria que había sido nombrada antes como *Bacillus lactic I*. En 1916 Ford aisló una bacteria que aparentemente era muy similar a la descripción de ésta y con base en ésto se clasificó el género. El interés de *Bacillus brevis* surgió en los años 40s con el descubrimiento de que producían un antibiótico llamado gramicidina.

Nakamura en 1991, con base en el contenido de G+C, segregó en cuatro grupos 87 bacterias identificadas como *Bacillus brevis*. El error en la clasificación de estas cepas está en que frecuentemente se utilizan únicamente algunas características: requerimientos de oxígeno, morfología, hidrólisis de almidón, producción de acetilmetilcarbonil, temperatura de crecimiento, producción de ácido a partir de glucosa con una fuente inorgánica de nitrógeno y pH de crecimiento en el medio propuesto por Voges-Proskauer.

Shida y colaboradores en 1996, determinó la secuencia de los genes 16S rARN de once especies que pertenecían a *Bacillus brevis* y *Bacillus aneurinolyticus*. Con base a los resultados del análisis de la secuencia de estos genes, se hizo la separación en dos grupos. Al grupo *Brevibacillus brevis* pertenecían diez especies llamadas: *Bacillus brevis*, *Bacillus agri*, *Bacillus centrosporus*, *Bacillus choshinensis*, *Bacillus parabrevis*, *Bacillus reuszeri*, *Bacillus formosus*, *Bacillus borstelensis*, *Bacillus laterosporus*, y *Bacillus thermoruber*. *Bacillus aneurinolyticus* y *Bacillus migulanus* perteneciente al grupo *Bacillus aneurinolyticus*. Estos dos grupos eran filogenéticamente diferentes de las especies: *Bacillus*, *Amphibacillus*, *Sporolactobacillus*, *Paenibacillus* y *Alicyclobacillus*. Propusieron la reclasificación de *Bacillus brevis* como un nuevo género y el grupo *Bacillus aneurinolyticus* como el género *Aneurinibacillus*. Utilizando la secuencia del gen 16S rARN, se diseñaron dos primers para diferenciar los dos géneros entre ellos y de otros organismos aerobios, formadores de endoesporas.

Brevibacillus agri

Nakamura en 1993, observó que la especie *Bacillus brevis* era una especie fenotípicamente heterogénea y utilizando reasociación del ADN midió las relaciones en el nivel taxonómico de las cepas clasificadas como *Bacillus brevis*. Este estudio reveló que por lo menos siete especies estaban genéticamente mal clasificadas y propuso dos nuevos géneros *Bacillus agri* y *Bacillus centrosporus*.

Describió a *Bacillus agri* como bacilos que tienen de 0.5 a 1.0 μm de diámetro y de 2.0 a 5.0 μm de largo. Gram positivos, móviles, con esporas elipsoidales. Las colonias en agar son translúcidas, delgadas, suaves, circulares, enteras y con 2 mm aproximadamente de diámetro. Catalasa positiva. Sin producción de oxidasa. Estrictamente aerobia. No producen acetilmetilcarbonil e indol. El pH en caldo de Voges-Proskauer (prueba para la producción de carbonilo) es mayor de 7.0. No reduce el nitrato a nitrito. No hidroliza almidón, urea ni la lecitina de la yema de huevo, pero hidroliza caseína. No utiliza citrato ni propianato. El crecimiento ocurre a pH de 5.6 o 5.7 y es inhibido por NaCl al 3%, lisozima al 0.001% y a 50°C. El crecimiento óptimo ocurre a 28°C, siendo el máximo a 40°C y el mínimo a 10°C. Se produce ácido pero no gas a partir de fructuosa, glucosa, maltosa, ribosa, sucrosa y trealosa. Hay producción variable de ácido con celobiosa. Arabinosa, galactosa, lactosa, manosa, melibiosa, ramnosa, salicina, sorbitol y xilosa no son fermentadas. El contenido de G+C esta entre 52 y 55%.

Cepa 1

Comparando algunas características de *Brevibacillus agri* con la Cepa 1 aislada tenemos, las dimensiones reportadas para *Brevibacillus agri* son de diámetro 0.5 a 1.0 μm y largo de 2.0 a 5.0 μm (Nakamura, 1993), lo cual concuerda con el promedio obtenido para la Cepa 1 de 0.75 μm de diámetro y 2.0 μm de largo. Ambas bacterias son bacilos móviles por flagelos (Shida y col., 1996). *Brevibacillus* ha sido reportado como Gram positivo o Gram variable (Nakamura, 1993); la Cepa 1 es Gram negativo.

Las colonias en agar, no pigmentadas, translucidas, suaves, circulares (Nakamura 1993), corresponde a la morfología de la Cepa 1 y por lo cual fue seleccionada en primera instancia.

Brevibacillus agri forma endoesporas y este género tiene la característica de producir proteínas especiales para la formación de Capa S (Nakamura 1993), la cual fue observada en la Cepa 1 a través de la microscopia electrónica realizada.

Los requerimientos nutricionales para el género *Brevibacillus* son simples (Claus, D. & Berkeley, 1986) y para la Cepa 1 fueron encontrados requerimientos similares.

La Cepa 1 fue aislada de lodos de un reactor UASB que trataba aguas residuales de resinas poliméricas en donde se encontraba acetato de vinilo. Este reactor fue operado bajo condiciones de oxígeno limitadas (1mg/L), obteniéndose un mejor consumo de acetato de vinilo, siendo por lo tanto, una bacteria aerobia, concordando con el género *Brevibacillus*.


Cepa 2

Se encontró similitud en algunas características y parámetros encontrados a partir de las pruebas que se realizaron en este estudio, entre la Cepa 1, identificada como *Brevibacillus agri* y la Cepa 2, la cual no pudo ser identificada por biología molecular, debido a que las secuencias presentaban muchas bases indefinidas (N). Ambas bacterias son bacilos móviles por flagelos, gram negativo (Shida y col. 1996)., con respiración aerobia y con requerimientos nutricionales simples (Claus, D. & Berkeley). Los valores de V_{max} para el acetato de vinilo, son similares, 14.29 mg/L-h para B. agri y 14.91 mg/L-h para la Cepa 2.

Sin embargo, también se encontraron diferencias significativas entre las dos Cepas. *Brevibacillus agri*, presenta una cápsula (Nakamura 1993) ,que no se encontró en la Cepa 2. Los valores de la velocidad consumo de acetato de vinilo, crecimiento y K_S son muy diferentes. La Cepa 2 consume el acetato de vinilo con una velocidad (2.13 mg/L-h) de casi el doble que *Brevibacullis agri* (1.43 mg/L-h). La velocidad de crecimiento también es mayor en la Cepa 2 (0.064 d-1) con respecto a *B. agri* (0.045 d-1). Los valores altos de K_S , nos indican poca afinidad por el compuesto en ambas Cepas, sin embargo los valores son diferentes, el valor de K_S es mucho mas alto para *B. agri* (421.9 mg/L) en comparación con la Cepa 2 (241.36 mg/L).

La morfología colonial para la Cepa 2, colonias pequeñas, blancas, planas y con bordes enteros, concuerda con lo reportado para el género *Brevibacillus*, las cuales se identifican como colonias blancas, planas y suaves (Shida y col. 1996).

En base a las similitudes y diferencias encontradas entre la Cepa 1 y *Brevibacillus agri*, las secuencias obtenidas y las imágenes de microcopia electrónica es probable que la Cepa 1 sea una combinación de dos especies del género *Brevibacillus*.



CAPITULO V

CONCLUSIONES



De lodos de reactores UASB que trataban aguas residuales de resinas poliméricas se lograron aislar dos cepas capaces de degradar el acetato de vinilo:

La Cepa denominada 1, fue aislada en lodo del reactor UASB con bajas concentraciones de oxígeno (1 mg/L) y fue identificada por biología molecular como *Brevibacillus agri*:

Esta cepa presentó las siguientes características:

- Colonia blanca ramificada y plana
- Bacilos cortos con terminaciones redondas y magnitud de 0.75 μm de diámetro y 2.0 μm de largo
- Gram negativo
- Respiración aerobia
- Móviles, por flagelos periféricos
- Presencia de cápsula
- Requerimientos nutricionales simple
- Velocidad de consumo de acetato de vinilo de 1.43 mg/L-h
- Velocidad de crecimiento de 0.045 d^{-1}
- V_{max} 14.29 mg/L-h
- K_S 421.9 mg/L

La Cepa denominada 2, aislada en lodo del reactor UASB que operaba bajo condiciones anaerobias, fue identificada por biología molecular con un nivel muy cercano a *Brevibacillus*:

Esta cepa presentó las siguientes características:

- Colonia pequeña blanca plana con bordes enteros
- Bacilos largos y bacilos cortos con terminación redonda. Los cortos en ocasiones unidos formando cadenas. Con magnitud de 0.477 μm de diámetro y 1.73 μm de largo.
- Gram negativo
- Respiración aerobia
- Móviles por flagelo
- Requerimientos nutricionales simples
- Velocidad de consumo de acetato de vinilo de 2.13 mg/L-h
- Velocidad de crecimiento de 0.064 d^{-1}
- V_{max} 14.91 mg/L-h
- K_S 241.36 mg/L



BIBLIOGRAFIA



-
- 📖 Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- 📖 Claus, D. & Berkeley, R. C. W. (1986). Genus *Bacillus* Cohn (1872). In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, pp. 1105±1139. Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
- 📖 Durán U. (2005). Tesis de maestria. "Tratamiento de Aguas Residuales Procedentes de la Industria de Resinas Poliméricas con Aceptores de Electrones Simultáneos". UAMI. México, D.F.
- 📖 Durán U., Monroy, O., Gómez J. & Ramírez F., (2007). Biological wastewater treatment for removal polymeric resins in UASB reactor: Influence of O₂. Biotechnology Dept., UAMI. México D.F.
- 📖 Hungate, R.E. (1969). A roll tube method for cultivation of strict anaerobes, p. 117-132. In J.R. Norris and D.W. Ribbons (de.), *Methods in microbiology*, vol. 3B. Academic Press Inc., New York.
- 📖 Kamalendu N.,(1990). A rapid DNA isolation procedure from Petri dish grown clinical bacterial isolates. *Nucleic Acids Research.* 18(21):6462
- 📖 Kumar, S., K. Tamura, I. B. Jakobsen, and M. Nei. (2001). MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, USA.
- 📖 Minardi F., Belpoggi F., Soffritti M., Ciliberti A., Lauriola M., Cattin E., y Maltoni C., (2002), Results of Long-Term Carcinogenicity Bioassay on Vinyl Acetate Monomer in Sprague-Dawley Rats, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 982:106-122
- 📖 Nakamura L. K., (1991) *Bacillus brevis* Migula 1900 Taxonomy: Reassociation and Base Composition of DNA. *International Journal of Systematic Bacteriology.*, 41(4):510-515.
- 📖 Nakamura L. K. (1993). DNA Relatedness of *Bacillus brevis* Migula 1900 Strains and Proposal of *Bacillus agri* sp. nov., nom. Rev., and *Bacillus centrosporus* sp. nov., nom. rev., *International Journal of Systematic Bacteriology.* 43(1):20-25

-
- 📖 Nieder M., Sunarko B. y Meyer O. (1990). Degradation of Vinyl Acetate by Soil, Sewage, Sludge, and the Newly Isolated Aerobic Bacterium V2. *Applied and Environmental Microbiology*. 56(10):3023-3028
- 📖 Owen, P.E. (1988). Vinyl acetate: 104 week inhalation combined chronic toxicity and carcinogenicity study in the rat and mouse. Report prepared by Hazleton Laboratories Europe Ltd., Harrogate, England for the Society of the Plastics Industry, Inc., New York. Report No.: 5547-51/15.
- 📖 Relman D., Smith TF, Tenover FC, White TJ (1993). Universal bacterial 16S rDNA amplification and sequencing. *Diagnostic molecular biology*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology Press, 1993:489–95.
- 📖 Rossello-Mora, R., y Amman R., (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 25:39-67.
- 📖 Shida O., Takagi. H., Kadowaki K., Udaka S. and Komagata K., (1994), NOTES, *Bacillus galactophilus* Is a Later Subjective Synonym of *Bacillus agri*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 44(1): 172-173
- 📖 Shida O., Takagi H., Kadowaki K., y Komagata K., (1996). Proposal for Two New Genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *International Journal Of Systematic Bacteriology*. 46(4):939-946.
- 📖 Stuckey, D; Owen, W & McCarty, PL (1980). Anaerobic toxicity evaluation by batch and semi-continuous assays. *J. Water Pollut. Control Fed.* 52(4): 720-729.
- 📖 Nakamoto T., Wagner M., Melvin JE., Bogdanffy MS., (2005), Vinyl acetate induces intracellular acidification in mouse oral buccal epithelial cells, *Toxicology Letters*, 158,2:116-121.
- 📖 Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. (1997). The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24:4876-4882
- 📖 Visser, A. (1995) Tesis doctoral. Wageningen Agricultural University. Holanda.
- 📖 University of Warwick. (2006). Proceedings of the British Toxicology Society & the United Kingdom Environmental Mutagen Society Joint Congress. *Toxicology*. 226(1):19

Referencias Electrónicas

- 🖥️ Vinyl Acetate Council
<http://www.vinylacetate.org>

- 🖥️ Universidad Católica Argentina
<http://www.estrucplan.com.ar>

- 🖥️ International Chemical Safety Cards
<http://www.telecable.es/personales/ea1aha/quimicos/nspn0347.htm>

- 🖥️ Enciclopedia Wikipedia
<http://en.wikipedia.org>

- 🖥️ List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LBSN)
<http://www.bacterio.cict.fr>