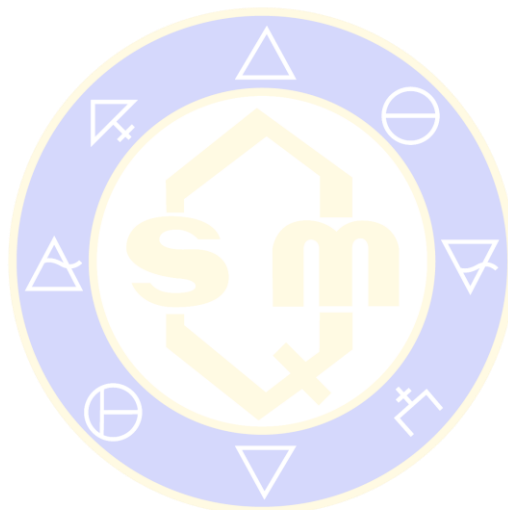


## CONTENIDO

Obtención de polihidroxicanoatos a partir de <i>Pseudomona aeruginosa</i> empleando aceite de <i>Persea americana</i> y <i>Prunus dulcis</i> .....	106
Obtención de etanol por medio de la fermentación de jugos naturales de frutas .....	108
Producción de Biogás a partir del diseño de un Biorreactor Anaerobio de Laboratorio, para el Tratamiento de desechos Orgánicos de Servicio de Comedor .....	110
Caracterización molecular de la cianobacteria <i>Fischerella</i> sp. en consorcio bacteriano que biodegrada fenantreno por metasecuenciación del gen 16S rARN .....	113



SOCIEDAD QUÍMICA  
DE MÉXICO, A.C.  
“La química nos une”

## Obtención de polihidroxicanoatos a partir de *Pseudomona aeruginosa* empleando aceite de *Persea americana* y *Prunus dulcis*

Mariana Ortega-Juárez<sup>1</sup>, Jesús B. García-Martínez<sup>1</sup>, Jesús I. Gutiérrez-Naranjo<sup>1</sup>, José G. Cortés-Escamilla<sup>1</sup>, Juan C. Leyva-Contreras<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Universidad del Valle de México, Campus Toluca. Químico farmacéutico Biotecnólogo (QFBT)

<sup>2</sup>Universidad Autónoma México, Iztapalapa, Biotecnología/ Ciencias Biológicas

mariana.ortega13@yahoo.com

**Resumen.** El objetivo fue la producción de polihidroxicanoatos (plástico biodegradable) a partir de la fermentación de la bacteria *P. aeruginosa* donde se utilizó como sustrato y fuente de carbono los aceites de aguacate (*P. americana*) y de almendras (*P. dulcis*), la extracción de polihidroxicanoatos fue proporcional en los dos aceites, obteniendo 2.066 µg/mL de polihidroxicanoato en *P. americana* y 2.266 µg/mL en *P. dulcis*.

**Introducción.** Los plásticos biodegradables naturales se obtienen principalmente a partir de recursos renovables, tales como el almidón, y pueden ser producidos de forma natural o sintética (Castrillón, 2017). Deben comportarse como los materiales plásticos tradicionales procedentes de fuentes fósiles (Anderson, 1990). La biodegradabilidad de los plásticos depende de la estructura química del material y de la composición del producto final, no sólo de la materia prima empleada para su fabricación (Castrillón, 2017). Uno de estos tipos de plástico biodegradable son los polihidroxicanoatos (PHA's). Los PHA son polímeros de ácidos hidroxicanoicos que algunas bacterias acumulan intracelularmente como material de reserva, para usarlo posteriormente como fuente de carbono y energía (Gonzales et al, 2013). El objetivo del trabajo fue obtener polihidroxicanoatos a partir de la fermentación de la bacteria *P. aeruginosa* utilizando aceite de *P. americana* y aceite de *P. dulcis* como sustratos.

**Exposición.** Utilizar plásticos por su importancia económica, durabilidad y su utilidad han generado una sobreexplotación, obteniendo toneladas de desechos plásticos dañando la flora y fauna de los ecosistemas. Por este motivo, se propone un plástico biodegradable fabricado con la materia prima polihidroxicanoato pues en la actualidad es importante que no se utilicen recursos no renovables como el petróleo.

**Materiales y Métodos.** La bacteria *Pseudomona aeruginosa* se activó en caldo LB (Luria Bertani) enriquecido con caseína de leche a una incubación de 45°C por 48 horas. Posteriormente se tomó una alícuota para crecer en un medio mineral con macro y micronutrientes enriquecido con aceite de aguacate (*P. americana*) y aceite de almendras (*P. dulcis*) para su fermentación, los dos aceites se evaluaron por separado. Se incubó en las mismas condiciones que cuando se activó a *P. aeruginosa*, realizándose por triplicado en matraces Erlen Meyer. En su extracción se le adicionó 5 mL de hipoclorito de sodio por cada 3 mL y se realizaron lavados clorofórmicos agregando cloruro de metileno y agua. Se centrifugó a 13,023 xg por 20 minutos. Se identificó el polihidroxicanoato por medio de punto de fusión y elución con cloroformo.

**Resultados y Discusión.** De acuerdo con el cuadro 1 del total de polihidroxicanoato obtenido, el sustrato de *P. dulcis* es el más adecuado para la obtención de una mayor cantidad de polihidroxicanoatos, siendo de 2.26 µg, 0.2 µg mayor a *P. americana*, lo cual indica que contiene mayor cantidad de átomos de carbono. Según ECI (2017), la ruta bioquímica interceptó a los ácidos grasos (de los aceites) en beta oxidación, generando polihidroxicanoatos como reserva de energía.

Cuadro 1: Total de polihidroxicanoatos obtenidos utilizando aceite de aguacate (*P. americana*) y aceite de almendras (*P. dulcis*) como sustratos

Sustrato	Polihidroxicanoato obtenido
<i>P. americana</i>	2.06 µg
<i>P. dulcis</i>	2.26 µg

Después de 3 días del crecimiento de *P. aeruginosa* en medio mineral, se observó la bacteria en microscopio

100x, mostrado en la figura 2, comprobando un cultivo puro, ya que no se identificó otro organismo. Seguido

del paso anterior se le realizó una tinción Gram, definida como tinción diferencial (López et al, 2004), donde

se identificaron bacilos Gram negativos, siendo características de esta bacteria (DATABIO, 2016). Se identificó que el producto obtenido fue polihidroxicanoato por pruebas físicas como la determinación del punto de fusión, siendo este de 28°C reportado por González et al (2013) como poli-3-hidroxi-butirato (P3HB). El P3HB es un tipo de PHA que se acumula en esta bacteria como metabolito secundario por medio de beta oxidación (Venkateswar et al, 2016).

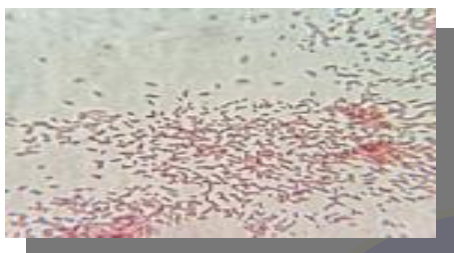


Figura 1. Tinción de Gram de *P. aeruginosa* aislada de medio de cultivo enriquecido con aceite de aguacate al último día

Figura 2. Observación directa de *P. aeruginosa* aislada de medio de cultivo enriquecido con aceite de almendras al segundo día.

Este trabajo coincide con Rojas et al (2007) el cual utilizó *P. aeruginosa* y glucosa como sustrato, donde la composición monomérica del PHA obtenido consistió únicamente en ácidos grasos 3 hidroxi saturados (ácidos octanoico, decanoico y dodecanoico). Por tanto, este estudio se realizó como la primera parte de una investigación, la cual se enfocará en más datos.

**Conclusión.** Del resultado de una fermentación de una cepa de *P. aeruginosa* empleando como sustratos al aceite de *P. dulcis* y aceite de *P. americana* se obtuvieron polihidroxicanoatos demostrando diferencia entre cada sustrato de 0.20 µg/mL.

## Referencias

- Anderson, A. J. (1990). Microbiological Reviews. In Occurrence, Metabolism, Metabolic Role and Industrial Uses of Bacterial Polihidroxicanoates (pp. 450-472). Unit States.
- Castrillón, T. (2017). Biopolímeros. Retrieved from <https://www.ainia.es/html/envios/envase/boletines/art.pdf>. Accesado el 2017-08-13
- DATABIO (2016). Pseudomona aeruginosa, instituto nacional de seguridad e higiene en el trabajo. Descargado en <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Pseudomonas%20aeruginosa%202017.pdf>, accesado el 28/05/2018
- ECI (2017). Plásticos: protocolo, curso de procesos manufactura. Obtenido de <http://www.escuelaing.edu.co/uploads/laboratorios/2734/plimeros.pdf>, accesado el 10-08-2017.
- González G.Y, Meza C.Y., González J.R., Córdova L. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. Revista internacional de contaminación ambiental, 29(1), 77-115.
- López JE, Hernández DM, Colín AC, Ortega PS, Cerón GG, Franco CR (2014) Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Vol. 3, Núm. 1 Enero-Marzo 2014 pp 10-18
- Venkateswar M., Yasuteru M., Yajimaa Y., Satoh S., Mohand V., Changa C. (2016) Production of poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) P(3HB-co-3HV) from synthetic wastewater using *Hydrogenophaga palleronii*, Bioresource Technology (215):155-162
- Rojas Rosas, Villafaña-Rojas J, López-Dellamary FA, Nungaray-Arellano J, González-Reynoso O (2007) Production and characterization of polyhydroxicanoates in *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 from glucose, an unrelated carbon source. Can J Microbiol;53(7):840-51.

## Obtención de etanol por medio de la fermentación de jugos naturales de frutas

Mariana Sánchez-Quiterio<sup>1</sup>, Sara D. Chávez-Reyes<sup>1</sup>, Mariana Islas-Rodríguez<sup>1</sup>, José C. Valencia-Esquivel<sup>1</sup>, Juan C. Leyva.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Universidad del valle de México, Campus Toluca. Químico Farmacéutico Biotecnólogo (QFBT). Laboratorio de biotecnología.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma México, Iztapalapa, Biotecnología/ Ciencias Biológicas

marianasq09@hotmail.com

**Resumen.** Este proyecto consistió en la obtención de etanol mediante la fermentación alcohólica del jugo de frutas naturales (piña, pera y mango) con la finalidad de encontrar la materia prima que provea tanto el mejor rendimiento en producción de etanol como el mayor costo-beneficio. Se realizó una prueba de Fehling para determinar la presencia de azúcares reductores, posteriormente los jugos se colocaron a fermentación con ayuda de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, para después someterlos a destilación simple y medir su rendimiento de etanol. La mayor producción de etanol fue para mango y con el mejor costo-beneficio en el momento.

**Introducción.** *Saccharomyces cerevisiae*, mejor conocida como levadura de cerveza es un hongo unicelular que se utiliza desde hace más de 250 años para la producción de cerveza, vino y pan.<sup>1</sup> Esta levadura es capaz de sobrevivir siguiendo dos rutas metabólicas: una de ellas es la fermentación en la que la levadura está fuera de contacto con el oxígeno. Esta levadura, requiere que la glucosa sea catabolizada mediante la glucólisis o ruta de Embden-Meyerhof, para obtener el piruvato el cual posteriormente por la acción de enzimas específicas, se convierte anaeróticamente en etanol y CO<sub>2</sub>.<sup>2</sup> La temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 30 °C.<sup>3</sup> El bioetanol es un biocombustible de origen vegetal que se produce a partir de la fermentación de materia orgánica rica en azúcar<sup>4</sup>, así como de la transformación en azúcar del almidón presente en los cereales. Las ventajas que presenta el bioetanol comprenden desde la producción a partir de cultivos agrícolas propios de una región, permitiendo la producción local del biocombustibles aprovechando las fuentes renovables de energía, así mismo se reducen emisiones nocivas para el medio ambiente. La producción podría realizarse a partir de desechos agrícolas, forestales, industriales o municipales. En la fermentación alcohólica, que llevan a cabo las levaduras, el producto final resultante es el etanol y, en menor proporción otro alcohol, butanodiol. Condiciones requeridas para la fermentación alcohólica: Concentración de azúcares del 10 al 18 %, pH entre 4 y 4.5, Microorganismo: *Saccharomyces cerevisiae*, Ausencia de O<sub>2</sub>, presencia de fosfatos y temperatura de fermentación entre 15 a 25°C, por encima de 30°C se evapora el alcohol<sup>5</sup>. La fermentación alcohólica es un proceso exotérmico, es decir, se desprende energía en forma de calor. Es necesario controlar este aumento de temperatura ya que si ésta ascendiese demasiado (25 - 30°) las levaduras comenzarían a morir deteniéndose el proceso fermentativo<sup>6</sup>. Las bebidas alcohólicas se producen a partir de diferentes sustratos, dependiendo de la región geográfica. Las materias primas de partida pueden ser azúcares simples, como los presentes en el jugo de uva o distintas frutas variadas o de alto peso molecular, como el almidón de los granos de cebada o papa así mismo pueden utilizarse semillas de enebro, a, arroz o maíz. Por lo tanto, el objetivo del estudio fue determinar el rendimiento de etanol producido a través de fermentación alcohólica del jugo de tres frutas diferentes (piña, pera y mango) y evaluar de manera cualitativa su costo beneficio.

**Materiales y Métodos.** Se eligieron como materias primas mango, pera y piña debido a su disponibilidad por temporada y por su alto contenido de azúcares reductores, se preparó el jugo de las frutas moliendo la pulpa de las mismas con agua hasta llegar a un volumen de un litro para después realizar una prueba de Fehling que permite la detección de azúcares reductores posteriormente se colocaron los jugos a fermentación añadiendo la levadura activa (*Saccharomyces cerevisiae*) al 1% en cada envase, se sellaron los recipientes a condiciones anaerobias e incubados durante 24 horas a 28°C. Una vez finalizada la fermentación, se filtraron 100mL de cada envase para su destilación y obtención de etanol que permito medir su rendimiento (todo se realizó por triplicado). El costo-beneficio se evaluó de manera cualitativa.

**Resultados y Discusiones.** A continuación, se presentan los resultados de producción de etanol para tres frutas en el Gráfico 1. La tendencia de los datos muestra una mayor producción de etanol en mango y en

relación al costo beneficio mostro ser mejor para esta fruta tropical.

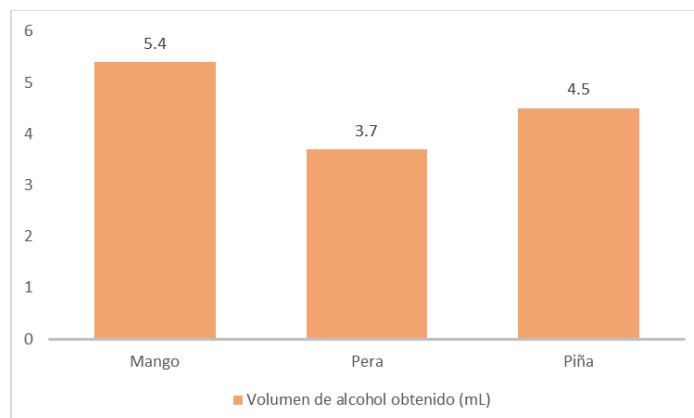


Gráfico 1. Volumen promedio obtenido de diferentes sustratos tras realizar una destilación simple con alicuotas de 100mL.

Algunos autores han reportado un rendimiento de 5.41% en jugo de mango en 65 días de fermentación, los datos coinciden con este estudio solamente que la diferencia fue en tiempo de fermentación y volumen empleado<sup>7</sup>. Así mismo, han reportado resultados que indican que la piña posee ventaja ya que presenta mayor volumen de alcohol obtenido siendo éste 3.1 veces superior al de la pera, entonces estos reportes concuerdan con los datos obtenidos en este estudio de un rendimiento de etanol de 4.5% en piña y del 3.7% en pera<sup>8,9</sup>. Las variaciones encontradas se puede deber a la diferencia en cantidad de azúcares como carbohidratos que presentan las tres frutas y que pudieran estar muy relacionado con el estado de madurez de la misma.

Con base al costo-beneficio se puede decir que el mango fue la mejor en el momento, comparado con pera y piña pero al mismo tiempo también saldrá muy caro producir etanol con mango, ya que es una fruta de temporada y los costos se elevarían cuando se este fuera de producción de la fruta.

**Conclusión.** La mayor producción de de etanol de los frutos analizados fue el mango, debido a su alta cantidad de azúcares reductores, sin embargo, el uso de esta fruta no es viable económicamente tomando en cuenta la evaluación cualitativa del costo-beneficio, ya que es una fruta de temporal y sería mejor usar otras materias primas que otorgan una mejor producción y son más sostenibles económicamente.

## Referencias

1. Alberto, G. R. R. 2013. *Tesis Instituto Politecnico Nacional*. [En línea] Available at: <http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/17053/25-1-16616.pdf?sequence=1>[Último acceso: 14 Junio 2017].
2. Alicia G. & Lourdes, V. 2002. *Saccharomyces cerevisiae*. [En línea] Available at: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap16/>[Último acceso: 14 Junio 2017].
3. Casado, F. C., 2006. *Universidad Politecnica de Catalunya*. [En línea] Available at: [http://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/4867/03\\_Memoria.pdf?sequence=4](http://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/4867/03_Memoria.pdf?sequence=4) [Último acceso: 14 Junio 2017]
4. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología, 2007. *Las levaduras y el etanol: bebidas, combustibles y un poco de historia*. [En línea] Available at: <http://www.argenbio.org/index.php?action=novedades&note=181>[Último acceso: 14 Junio 2017].
5. Ecoagricultor, 2012. *Ecoagricultor*. [En línea] Available at: <http://www.ecoagricultor.com/propiedades-nutricionales-y-medicinales-de-la-pina/>[Último acceso: 14 Junio 2017].
6. Gracia, C. A., 2011. Biocombustibles: Energía o alimento. *Omniscellula*, Issue Omniscellula, pp. 21-27.
7. Sangen OLF, Vargas MFJ. 2009. Obtención de etanol por medio de la fermentación alcohólica de mango. Disponible en: <http://200.35.84.131/portal/bases/marc/texto/2101-09-02983.pdf> (Obtenido el 15/04/17)
8. Guzmán RAR. 2013. Obtención de licor mediante la destilación de fermentado de piña y pera. Disponible en: <http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/17053/25-1-16616.pdf?sequence=1> (Obtenido el 02/04/17)
9. Guadalupe, M., 2013. *Portal academico CCH*. [En línea] Available at: <http://portalacademico.cch.unam.mx/alumno/biologia1/unidad2/fermentacion/alcoholica/>[Último acceso: 14 Junio 2017]



## Producción de Biogás a partir del diseño de un Biorreactor Anaerobio de Laboratorio, para el Tratamiento de desechos Orgánicos de Servicio de Comedor

Marco A. Ramírez-Murrieta<sup>1</sup>, Brian Acosta-Muñoz<sup>1</sup>, Giovanni Alva Antonio<sup>1</sup>, Vicente Cortes-Fabela<sup>1</sup>, Julio Ortiz-Murillo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad del Valle de México, Campus Toluca. Químico Farmacéutico Biotecnólogo (QFBT). Laboratorio de biotecnología.

[marco\\_ramm@hotmail.com](mailto:marco_ramm@hotmail.com)

**Resumen.** El objetivo de estudio es elaborar un prototipo de biodigestor para obtener mayor producción de gas metano para ser empleado como una alternativa del gas LP en comparación de un biodigestor comercial a partir de materia orgánica (no residuos ácidos como cáscara de naranja), lodos residuales (industriales) y la bacteria *Methanosarcinas* sp. Por medio de pruebas de Demanda Química de Oxígeno (DQO), monitoreo de parámetros como el pH y temperatura se determinó que el biodigestor elaborado presentó un mayor rendimiento en comparación de un biodigestor comercial produciendo metano a partir de los primeros 7 días, en contraste con los 20 días que tarda uno comercial. Concluyendo que es una alternativa para el aprovechamiento de desperdicios alimenticios por lo cual tiene una importancia en la producción de combustibles.

**Introducción.** El metano liberado en la atmósfera es un gas con capacidad de provocar un efecto invernadero 21 veces superior al del CO<sub>2</sub>, en el tratamiento anaerobio, alrededor de 70% de la materia orgánica es transformada en biogás (gas metano y CO<sub>2</sub>).<sup>1</sup> En México, la India, China, Brasil, Colombia y otros países de clima moderado, se está encontrando que las plantas de tratamiento anaerobio cuestan menos para construir, operar y mantener; además, generan menos lodo y representan una fuente de energía sustentable generan energéticos; y producen menos lodos.<sup>2</sup> Un biodigestor es un sistema natural y ecológico que aprovecha la digestión anaeróbica o ausencia de oxígeno de las bacterias para convertir cualquier residuo orgánico en gas y fertilizante; un digestor de desechos orgánico es un contenedor cerrado, hermético e impermeable, dentro del cual se deposita el material orgánico a fermentar, este puede ser excrementos de animales y humanos, desechos vegetales, etc. en determinada dilución de agua para que a través de la fermentación anaerobia se produzca gas metano y fertilizantes orgánicos ricos en nitrógeno, fósforo y potasio, y además, se disminuya el potencial contaminante de los excrementos.<sup>1</sup> Los materiales que ingresan y abonan el Biodigestor se denominan afluente y efluente respectivamente. El proceso de digestión que ocurre en el interior del biodigestor libera la energía química contenida en la materia orgánica, la cual se convierte en biogás.<sup>2</sup> Es el proceso en el cual microorganismos descomponen material biodegradable en ausencia de oxígeno. Este proceso genera diversos gases, entre los cuales el dióxido de carbono y el metano son los más abundantes (dependiendo del material degradado). En biodigestores se aprovecha esta liberación de gases para luego ser usados como combustible. La intensidad y duración del proceso anaeróbico varían dependiendo de diversos factores, entre los que se destacan la temperatura y el pH del material biodegradado.<sup>3</sup>

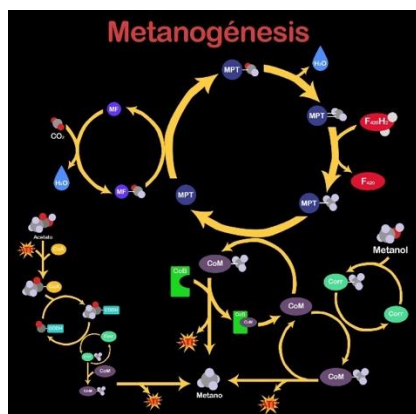


Figura 1. Ruta de metabólica de la metanogénesis.

Fuente (<http://biol4368grupo9.blogspot.mx>, 2017)

En la digestión anaeróbica, los microorganismos metanogénicos desempeñan la función de enzimas respiratorios y, junto con las bacterias no metanogénicas, constituyen una cadena alimentaria que guarda relación con las cadenas enzimáticas de células aeróbicas. De esta forma, los residuos orgánicos se transforman completamente en biogás que abandona el sistema (ver figura 1). Sin embargo, el biogás generado suele estar contaminado con diferentes componentes, que pueden complicar el manejo y aprovechamiento del mismo.<sup>4</sup> Por tanto, el el objetivo de estudio es elaborar un prototipo de biodigestor con el objetivo de obtener mayor producción de gas metano para ser empleado como una alternativa del gas LP en comparación de un biodigestor comercial a partir de materia orgánica (no residuos ácidos como cáscara de naranja), lodos residuales (industriales) y bacterias (*Methanosarcinas* sp.).

**Metodología.** La colecta de la materia orgánica fueron desechos de la cafetería y de las carreras de gastronomía y hospitalidad de la institución de UVM campus Toluca, los lodos utilizados fueron donados por la industria alimenticia la cual contenían la bacteria *Methanosarcina* sp, el modelo de biorreactor se diseñó con base a métodos de reciclaje de materiales, se utilizó un garrafón de 20L con llaves de efluente e influente incrustados en el garrafón, la medición de la temperatura se realizó con un termostato y termómetro común y globos para medir la producción de gas en el medio (Figura 2).



Figura 2. Presentación del modelo de biorreactor con todos sus componentes

Se evaluó la DQO (Demanda Química de Oxígeno) como prueba bioquímica para determinar las fermentación y generación de gas por medio del oxígeno y se realizaron pruebas de pH para la evaluación del medio adecuado para la generación de metano mediante la bacteria (*Methanosarcina* sp).

**Resultados y Discusión.** Para el prototipo de 20 L. se obtuvieron los siguientes resultados, plasmados en el cuadro 1. Mediante las pruebas físicas y químicas, el pH obtenido en comparación con los resultados teóricos fue de 6.5, un medio excelente para la bacteria *Methanosarcina sp.*, como también la temperatura adecuada a 35°C, la DQO presentó una demanda de oxígeno considerable ya que es óptimo para la generación de biogás, la comparación de influente y efluente nos dio una comparativa de menos materia orgánica desechada y mejor rendimiento en el aprovechamiento de ella y así optimizar los días de producción de biogás.

**Cuadro 1. Resultados teóricos y prácticos del biorreactor.**

CONDICIONES	RESULTADOS TEÓRICOS	RESULTADOS PRÁCTICOS
pH	6.5 - 7.5	6.5
Temperatura	30°C – 35°C	35°C
DQO*	1500 – 2000 mg/L	7650 mg/L
INFLUENTE	N/A	25,180 mg/L
EFLUENTE	1500 – 2000 mg/L	7650 mg/L
TIEMPO	7 – 30 Días.	5 – 7 Días.

\*DQO=Demanda química de oxígeno

La producción de gas metano se vio incrementada debido a la combinación de lodos residuales con la bacteria *Methanosarcina sp.* lo cual, en comparación con la literatura<sup>3</sup>, se comprueba que la sinergia de estos dos componentes aumenta la producción.

**Conclusiones.** Se logró el diseño de un prototipo de biodigestor capaz de convertir basura orgánica de comedor en gas metano con el fin de disminuir en gran medida con la contaminación que se vive en la actualidad.

#### Referencias.

1. Universidad Nacional Autónoma de México. (2014). Biodigestor: alternativa energética. Recuperado el 06/05/2017 de: [http://www.feriadelasciencias.unam.mx/antiores/feria20/feria254\\_01\\_biodigestor\\_alternativa\\_energetica.pdf](http://www.feriadelasciencias.unam.mx/antiores/feria20/feria254_01_biodigestor_alternativa_energetica.pdf)
2. Coss y León M., Hugo J.; del Campo M., Cástulo I. Martín; Loza Ll., Juana A.; Durand M., Luis C.; Monteros C., Espicio; Lopez A., Eduardo; (2015). Tratamiento de sustrato de bovino y producción de biogás en un biodigestor continuo con lombricultura. E-GNOSIS, 1-16.
3. Sahn H. (1984) Anaerobic wastewater treatment. In: Immobilized Biocatalysts Saccharomyces Yeasts Wastewater Treatment. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, vol 29. Springer, Berlin, Heidelberg.
4. Santamaría, R. S., Ferrera, C. R., Almaraz, S. J. J., Galvis, S. A., Barois B. I. (2001). Dynamics and relationships among microorganisms, c-organic and n-total during composting and vermicomposting, Artículo en Agrociencia 35: 377-384. México, D.F.
5. M. en C. Sergio A. Martínez González.. (2011). Reactores Anaerobios de Flujo Ascendente (RAFA's o UASB). 17/05/2017, de UNAM Sitio web: <http://chita.aragon.unam.mx/papime100310/documentos/RAFA.pdf>
6. Mecalff & Eddy, Inc.(2003) Wastewater Engineering. Treatment and reuse. (4ta edition). Ed. Mc Graw Hill.
7. Monroy. O., Famá, G., Meraz, M., Montoya, L. y Macarie, H. 2000. Anaerobic Digestion for wastewater treatment in Mexico: state of the technology. Water Research. Vol. 34. No. 6. 1803 1816.



## Caracterización molecular de la cianobacteria *Fischerella* sp. en consorcio bacteriano que biodegrada fenantreno por metasecuenciación del gen 16S rARN

José Martín Márquez-Villa<sup>1</sup>, Juan Carlos Rodríguez-Sierra<sup>1</sup>, Santiago Cadena-Rodríguez<sup>2</sup>, Daniel Cerquera-García<sup>2</sup>, Nayem Amanuel Chequer<sup>3</sup>, Emanuel Hernández-Núñez<sup>4</sup>, José Quinantzin García-Maldonado<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Departamento de formación Integral e Institucional, UPIIG, Instituto Politécnico Nacional. Avenida Mineral de Valenciana No. 200, Fraccionamiento Industrial Puerto Interior, Silao de la Victoria, Guanajuato, C.P. 36275. [jmmv.ipn@gmail.com](mailto:jmmv.ipn@gmail.com), [jurodriguez@ipn.mx](mailto:jurodriguez@ipn.mx); <sup>2</sup>CONACYT, Recursos del Mar, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN-Unidad Mérida, Mérida, Yuc., 97310. [santiago.cadena@cinvestav.mx](mailto:santiago.cadena@cinvestav.mx); <sup>3</sup>Recursos del Mar, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN-Unidad Mérida, Mérida, Yuc., 97310. [nayem.chequer@cinvestav.mx](mailto:nayem.chequer@cinvestav.mx); <sup>4</sup>Cátedra de CONACYT, Recursos del Mar, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN-Unidad Mérida, Mérida, Yuc., 97310. [emanuel.hernandez@cinvestav.mx](mailto:emanuel.hernandez@cinvestav.mx), [ehernandeznu@conacyt.mx](mailto:ehernandeznu@conacyt.mx), [jose.garcia@cinvestav.mx](mailto:jose.garcia@cinvestav.mx).

### Resumen

Las cianobacterias son los microorganismos fotoautótrofos más antiguos. Son capaces de transformar energía solar y CO<sub>2</sub> atmosférico en compuestos orgánicos, además de biodegradar hidrocarburos. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), como el fenantreno, son compuestos que denotan propiedades físico-químicas particulares que los hacen de difícil remoción. En el presente trabajo, fue probada la capacidad de *Fischerella* sp. en consorcio holoaxénico con bacterias heterótrofas aerobias de biodegradar fenantreno. Se reporta 10% de aumento de densidad celular ( $p < 0.0001$ ), 92% de remoción de fenantreno ( $p < 0.0001$ ) y la caracterización del consorcio bacteriano capaz de biodegradar fenantreno a través de la metasecuenciación del gen 16S rARN.

### Introducción

Las cianobacterias conforman un grupo muy diverso de organismos ubicuos pertenecientes al dominio *Bacteria*, capaces de realizar la fotosíntesis oxigénica para generar electrones a través de fotólisis del H<sub>2</sub>O en el PSII y fijar nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>) (Whitton, 1992). Las cianobacterias provenientes de ecosistemas naturales mantienen relaciones estrechas con bacterias, éstas relaciones tienden a ser interacciones mutualistas, debido a ello, diversos estudios indican que cultivos holoaxénicos han arrojado mayores y eficientes rendimientos en biodegradación en comparación con cultivos axénicos (Borde *et al.*, 2003). Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son compuestos que se conforman por carbón e hidrógeno, que consisten en 2 o más series de anillos de benceno fusionados en configuración lineal, angular o en arreglo agrupado. El fenantreno es un hidrocarburo aromático tricíclico que se encuentra presente en sedimentos, superficies terrestres y sistemas acuáticos, con altas concentraciones de HAPs (Kanaly y Harayama, 2000). El fenantreno no representa un riesgo a la salud humana debido a que no ha mostrado efectos genotóxicos o carcinógenos, sin embargo, se han demostrado alteraciones en la cromatina e inhibición de la comunicación intracelular en las uniones Gap (Weis *et al.*, 1998) y puede ser tóxico al ingresar a redes tróficas de peces, algas, crustáceos, y mejillones, entre otros. (Amorim *et al.*, 2011; Cerniglia y Heitkamp, 1989). Diversos análisis de consorcios bacterianos han sido ampliamente utilizados sin el requerimiento del cultivar los organismos. Estos análisis involucran caracterización molecular por metasecuenciación del gen 16S rARN a través de secuenciación por síntesis, secuenciación por ligación, y pirosecuenciación, entre otros, que otorgan información relevante sobre la diversidad microbiana presente en el consorcio. Se basan en amplificar una fracción del gen taxonómico 16S rARN a través de PCR y posteriormente introducir los amplicones a un secuenciador de nueva generación, permitiendo así la clasificación de lecturas individuales a taxones específicos (Salipante *et al.*, 2014). En este trabajo, se evaluaron las cinéticas de desarrollo celular y de biodegradación de fenantreno utilizando a la cianobacteria *Fischerella* sp. en consorcio bacteriano, y se caracterizó la comunidad microbiana a través de la metasecuenciación del gen 16S rARN.

### Materiales y métodos

*Microorganismo, condiciones de cultivo y sistemas de fotobiorreacción:* Se cultivó por lote *Fischerella* sp. en consorcio bacteriano en medio líquido BG-11. Los inóculos fueron al 1%  $\frac{v}{v}$  con base en el volumen de operación y en fase exponencial de crecimiento. El proceso de fotobiorreacción se llevó a cabo en frascos de vidrio Duran (Schott) de 250 ml con volumen de operación de 200 ml. Todos los sistemas mantuvieron condiciones de operación controladas con temperatura de los cultivos mantenida a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , flujo de aire constante de 1.5 vvm, con lámparas fluorescentes de  $73 \frac{\mu\text{mol} \cdot \text{fotón}}{\text{m}^2 \cdot \text{s}}$  y un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad (12:12). La experimentación se llevó a cabo por seis días.

*Cuantificación de biomasa por peso seco:* Las mediciones de peso seco se llevaron a cabo a través del secado de una membrana de  $0.22 \mu\text{m}$  (Millipore) con una balanza de humedad PMB (Adam Equipment) a  $140^\circ\text{C}$  por 5 minutos. Posteriormente, se retiró la humedad excedente de los filtros en un desecador (Bel-Art) por 24 horas. Seguido, se realizó el pesado en balanza analítica (RADWAG Wagi Elektroniczne). La biomasa se filtró colocando la membrana en el equipo KG 47 GLASS SUPPORT (Advantec MFS, Inc.) de 300 mL y un matraz Kitasato (KIMAX) de 1000 mL, además de una bomba de vacío (WACO). La membrana con biomasa se secó utilizando la balanza de humedad PMB a  $140^\circ\text{C}$  por 5 minutos y se retiró la humedad excedente de los filtros con el desecador por 24 horas. Después se pesó en la balanza analítica. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

*Curva patrón para cuantificación de fenantreno:* Utilizando un espectrofotómetro Cary 5000 UV-Vis-NIR (Agilent) se construyeron tres curvas de calibración para fenantreno. Se prepararon 200 mL de solución etanol-agua en proporción 1:1 (v/v) para emplearlo como blanco (2 mL) y preparar distintas concentraciones de fenantreno ( $0 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$  -  $60 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$  en intervalos de  $5 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$ ). Se configuró el software para detectar absorbancias en una longitud de onda de 293 nm. Todas las muestras se colocaron en celda de cuarzo UV-Vis (HACH), paso de luz 10 mm, para su medición.

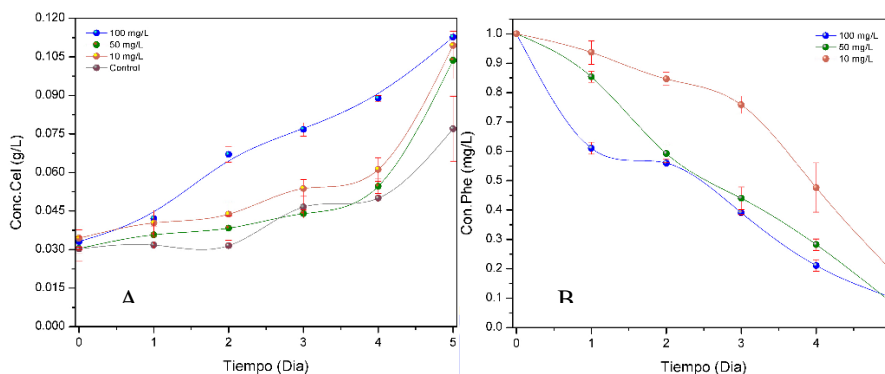
*Cuantificación de biodegradación de fenantreno:* En la toma de muestra, los frascos se mantuvieron homogeneizados por agitación neumática del inyector de aire. Cada 24 horas se tomaron 25  $\mu\text{L}$  de cada fotobiorreactor, la muestra se agregó a 2 mL de solución etanol-agua. Las lecturas se realizaron por triplicado en el espectrofotómetro Cary 5000 UV-Vis-NIR con parámetro de longitud de onda a 293 nm. Nuevamente, todas las muestras se colocaron en celda de cuarzo UV-Vis.

*Análisis molecular de Fischerella sp. y del consorcio de bacterias heterótrofas aerobias por secuenciación masiva de ADN genómico con MiSeq de Illumina:* La lisis celular para extraer ácidos nucleicos se realizó con el equipo TissueLyser LT (Qiagen), por duplicado. El ADN genómico total se obtuvo con el kit DNeasy PowerSoil (Qiagen). La calidad del ADN se revisó en gel de agarosa al 1%. Amplicones del gen 16S rARN se obtuvieron con los cebadores universales de bacteria 16SF (5'-CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC-3') / 16SR (5'-GACTTAACCCAACATCTCACGACAC-3'), enfocando las regiones V3 y V4. Los productos de la PCR se realizaron por duplicado y mezclados en proporciones iguales para la secuenciación. Los amplicones fueron purificados con perlas Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter). Los productos de la PCR fueron indexados empleando el equipo Nextera XT Index, de acuerdo con el protocolo de Illumina. Los amplicones de la PCR identificados con código de barras se cuantificaron en el fluorómetro Qubit 3.0 (Life Technologies). El tamaño de los amplicones fue verificado en el sistema Advanced QIAxcel (Qiagen). Las librerías fueron diluidas en Tris 10 mM (pH 8.5) y mezcladas a concentraciones equimolares (9 pM). La librería final se cargó en una celda del kit MiSeq Reagent (150 ciclos), procediendo a una secuenciación de extremo único en la plataforma Illumina MiSeq (Illumina). Los datos demultiplexados generados se analizaron con la base bioinformática de datos de código abierto QIIME2 (2017.11). Los errores de la secuenciación fueron corregidos para resolver las secuencias variantes de los amplicones y fueron dirigidas con el complemento DADA2, las quimeras fueron retiradas con el método "consensus". La asignación taxonómica de los representantes ASVs se realizó a través del complemento VSEARCH, contra la base de datos del gen SILVA. Se construyó una filogenia con base en los ASV resueltos utilizando el algoritmo FastTree. El análisis de las comunidades microbianas

y los gráficos generados fueron desarrollados en R (Rcore-team 2012) empleando las librerías phyloseq, ggplot2 y vegan.

### Resultados y discusiones

Se estableció una curva de calibración para la cuantificación de fenantreno, en donde, se señala con el 95% de confianza que la recta de ajuste lineal,  $y = 0.00203 * x + 0.0136$  con ajuste de  $R^2=0.9755$ , se encuentra dentro de las bandas de confianza ( $p<0.05$ ).



**Figura 1.** Comportamientos de desarrollo celular (A) de *Fischerella* sp. en consorcio holoaxénico ( $p<0.0001$ ) y comportamientos de biodegradación (B) de fenantreno normalizados ( $p<0.0001$ ).

En la figura 1-A se muestran los cuatro comportamientos monitoreados de desarrollo celular por seis días, en donde, es contrastante el aumento de biomasa con base en el suministro de fenantreno al medio de cultivo BG-11 como fuente de carbono adicional en relación con el cultivo de control sin hidrocarburo. Se observa que a partir del sexto día los comportamientos de desarrollo celular en los cultivos que tuvieron presencia de fenantreno comenzaron a mostrar una tendencia homóloga, esto puede asociarse a la baja concentración de fenantreno detectada por el mecanismo de quimiotaxis que poseen *Fischerella* sp. y las bacterias heterótrofas aerobias (Ashby, 2004). Los resultados obtenidos corresponden con los reportados en diversos estudios (Okerentugba y Ezeronye, 2003; Rahman *et al.*, 2002), los cuales señalan que las cinéticas de desarrollo de biomasa en presencia de hidrocarburos se ajustan a la típica cinética de Monod, en donde, las fases de adaptación son prácticamente inexistentes o reducidas, con fases logarítmicas aceleradas considerablemente. La figura 1-B muestra la cinética biodegradación de fenantreno por *Fischerella* sp. en consorcio holoaxénico con bacterias heterótrofas aerobias después de seis días de operación. Las concentraciones iniciales de fenantreno a  $100 \frac{mg}{L}$ ,  $50 \frac{mg}{L}$  y  $10 \frac{mg}{L}$  se redujeron hasta un 89.76%, 91.39% y 80.43%, respectivamente. La concentración de fenantreno en todos los tratamientos fluctuó a través del periodo monitoreado, en donde, la mayor biodegradación de fenantreno fue obtenida para el tratamiento con  $50 \frac{mg}{L}$ . Los datos del control no se muestran debido a nula variación en la concentración de fenantreno. En consecuencia, se muestran parámetros cinéticos promedio asociados al desarrollo de biomasa, en donde, se denota un aumento de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y disminución del tiempo de duplicación ( $t_d$ ) en los sistemas de fotobiorreacción con concentraciones de fenantreno frente al sistema de control.

**Tabla 1.** Parámetros cinéticos de desarrollo celular de la cinética de biodegradación de fenantreno.

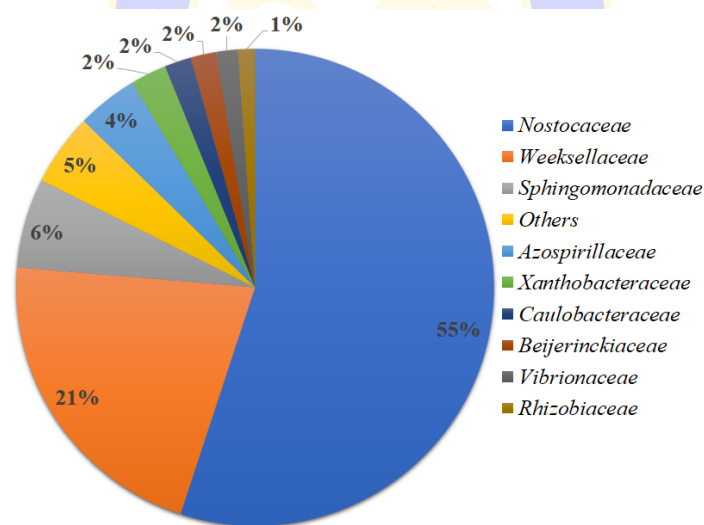
Parámetro	Concentración de Fenantreno			
	$100 \frac{mg}{L}$	$50 \frac{mg}{L}$	$10 \frac{mg}{L}$	$0 \frac{mg}{L}$
$\mu \left(\frac{1}{día}\right)$	0.2255±0.0146	0.4818±0.0386	0.4445±0.1800	0.2220±0.0346
$t_d \text{ (día)}$	3.0818±0.2064	1.4432±0.1156	1.6987±0.6880	3.1607±0.4933

**Tabla 2.** Parámetros cinéticos de desarrollo celular de la cinética de biodegradación de fenantreno.

Parámetro cinético	Concentración de Fenantreno		
	100 $\frac{mg}{L}$	50 $\frac{mg}{L}$	10 $\frac{mg}{L}$
$Y_{xs}$ ( $\frac{g\ Fischerella\ sp.}{mg\ Fenantreno}$ )	0.0013±0.0006	0.0010±0.00007	0.0162±0.0103
$q_s$ ( $\frac{1}{día}$ )	186.6667±13.7043	1133.7±48.0653	59.4386±38.8280

La tabla 1 contrasta que *Fischerella* sp. presentó ligera aceleración en su desarrollo de biomasa a través de los cultivos con presencia de fenantreno, sin embargo, bajo la concentración de 50  $\frac{mg}{L}$  presentó relativamente la mayor velocidad específica de crecimiento en comparación a los demás cultivos con presencia y ausencia de fenantreno. Además, es posible que las bacterias heterótrofas aerobias hayan establecido apoyo mutualista en el desarrollo celular de *Fischerella* sp. al metabolizar los diversos compuestos de carbono sintetizados fotosintéticamente por la cianobacteria (Bateson y Ward, 1988). En la tabla 2 se muestran parámetros cinéticos promedio asociados a la biodegradación de fenantreno, en donde, se muestra la velocidad específica de consumo de sustrato ( $q_s$ ) y el rendimiento aparente biomasa-sustrato ( $Y_{xs}$ ) en los sistemas de fotobiorreacción con concentraciones de fenantreno. Es evidente a través del ajuste de los datos cuantificados que los cultivos suministrados con 50  $\frac{mg}{L}$  lograron una mayor asimilación de fenantreno a su metabolismo.

La identificación taxonómica de la comunidad bacteriana en abundancia relativa a nivel familia se muestra en la figura 2.



**Figura 2.** Clasificación taxonómica de la comunidad microbiana con abundancia  $\geq 1\%$  de las familias dominantes.

El consorcio bacteriano se distribuye entre 8 diferentes tipos de familias que incluyen *Nostocaceae*, *Weeksellaceae*, *Sphingomonadaceae*, otros, *Azospirillaceae*, *Xanthobacteraceae*, *Caulobacteraceae*, *Beijerinckiaceae*, *Vibrionaceae* y *Rhizobiaceae*. Las familias con la mayor abundancia relativa son *Nostocaceae* (55%) y *Weeksellaceae* (21%), en donde, *Fischerella* sp. pertenece a la familia *Nostocaceae* de acuerdo con todas secuencias clasificables del gen 16S rARN. Diversos estudios han reportado a *Nostocaceae*, *Weeksellaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Beijerinckiaceae* y *Vibrionaceae* como familias de microorganismos con la capacidad de metabolizar HAPs (Cerniglia, 1993; Elnaker *et al.*, 2018; Porwal *et al.*, 2014). Por ende, es posible sugerir una relación entre el aumento de la biomasa y la asimilación de fenantreno a la actividad metabólica de *Fischerella* sp. y de las bacterias heterótrofas aerobias, en donde, la biodegradación de HAPs es lograda a través de interacciones mutualistas entre diversas cepas.

## Conclusiones



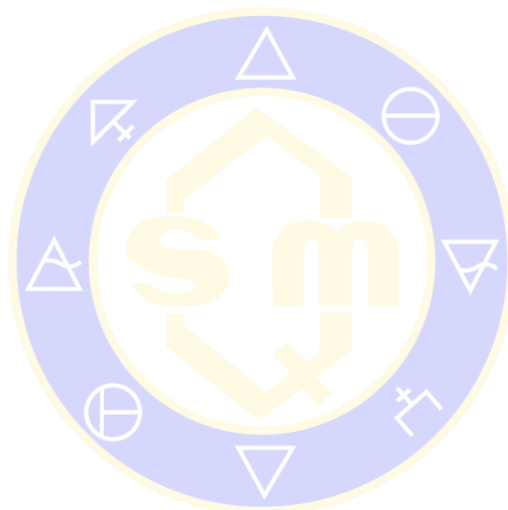
A través de *Fischerella* sp. en consorcio holoaxénico con bacterias heterótrofas aerobias en medio BG-11 se apreciaron comportamientos de degradación de fenantreno durante los seis días de operación monitoreados. Se describe la capacidad de biodegradación indirecta de fenantreno por *Fischerella* sp. y del consorcio bacteriano para potenciar su crecimiento, siendo las responsables de la remoción de fenantreno y transformarlo en fuente de carbono y energía. Se establecieron modelos y parámetros cinéticos para la degradación de fenantreno a través de modelos ya definidos para futuros estudios, empleando al fenantreno como contaminante aromático modelo de HAPs para determinar factores que afectan la capacidad de biodisponibilidad por biodegradación y las tasas de remoción microbiana en condiciones ambientales. A través de la caracterización molecular por metasecuenciación en Illumina MiSeq, se confirma que el consorcio posee familias bacterianas reportadas en estudios como las responsables efectivas de la biodegradación de HAPs. Se corrobora en el presente trabajo y con otros estudios taxonómicos más específicos que la familia *Nostocaceae* con mayor abundancia relativa refiere a la cianobacteria *Fischerella* sp. como la responsable indirecta de la biodegradación de fenantreno. La biodegradación de HAPs en consorcios bacterianos debe ser examinada con mayor precisión y énfasis a través de biología sintética hacia interacciones mutualistas cianobacteria-bacteria entre diferentes especies, compuestos derivados del petróleo y los factores ambientales en orden de potenciar las aplicaciones en biorremediación.

### Referencias bibliográficas

1. Amorim, M. J. B., Oliveira, E., Teixeira, A. S., Gravato, C. S., Loureiro, S., Guilhermino, L. C., Van Gestel, C. A. M., y Soares, A. M. V. M. (2011). Toxicity and bioaccumulation of phenanthrene in *Enchytraeus albidus* (Oligochaeta: Enchytraeidae). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(4), 967–972.
2. Ashby, M. K. (2004). Survey of the number of two-component response regulator genes in the complete and annotated genome sequences of prokaryotes. *FEMS Microbiology Letters*, 231(2), 277–281.
3. Bateson, M. M., y Ward, D. M. (1988). Photoexcretion and fate of glycolate in a hot spring cyanobacterial mat. *Applied and environmental microbiology*, 54(7), 1738–43.
4. Borde, X., Guieysse, B., Delgado, O., Muñoz, R., Hatti-Kaul, R., Nugier-Chauvin, C., Patin, H., y Mattiasson, B. (2003). Synergistic relationships in algal-bacterial microcosms for the treatment of aromatic pollutants. *Bioresource Technology*, 86(3), 293–300.
5. Cerniglia, C. E. (1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 4, 331–338.
6. Cerniglia, C. E., y Heitkamp, M. A. (1989). Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the aquatic environment. En U. Varanasi (Ed.), *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment* (pp. 41–68). Florida: CRC PRESS.
7. Elnaker, N. A., Elektorowicz, M., Naddeo, V., Hasan, S. W., y Yousef, A. F. (2018). Assessment of microbial community structure and function in serially passaged wastewater electro-bioreactor sludge: An approach to enhance sludge settleability. *Scientific Reports*, 8(7013), 1–11.
8. Jones, A. K. (1982). The interaction of algae and bacteria. En A. T. Bull y J. H. Slater (Eds.), *Microbial Interactions and Communities* (pp. 189–247). Nueva York: Academic Press.
9. Kanaly, R. A., y Harayama, S. (2000). Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology*, 182(8), 2059–2067.
10. Markou, G., y Georgakakis, D. (2011). Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy*, 88, 3389–3401.
11. Okerentugba, P. O., y Ezeronye, O. U. (2003). Petroleum degrading potentials of single and mixed microbial cultures isolated from rivers and refinery effluent in Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 2, 288–292.
12. Porwal, H. ., Mane, A. V., y Velhal, S. G. (2014). Biodegradation of dairy effluent by using microbial isolates obtained from activated sludge. *Water Resources and Industry*, 9, 1–15.
13. Prescott, L. M., Harley, J. P., y Klein, D. A. (2002). *Microbiología. McGRAW-HILL INTERAMERICANA* (5a ed.). Madrid: McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U.
14. Rahman, K. S. M., Rahman, T., Lakshmanaperumalsamy, P., y Banat, I. M. (2002). Occurrence of crude oil degrading bacteria in gasoline and diesel station soils. *Journal of Basic Microbiology*, 42(4), 284–291.
15. Salipante, S. J., Kawashima, T., Rosenthal, C., Hoogestraat, D. R., Cummings, L. A., Sengupta, D. J., Harkins, T. T., Cookson, B. T., y Hoffman, N. G. (2014). Performance comparison of Illumina and Ion Torrent next-generation sequencing platforms for 16S rRNA-based bacterial



- community profiling. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(24), 7583–7591.
16. Weis, L. M., Rummel, A. M., Masten, S. J., Trosko, J. E., y Upham, B. L. (1998). Bay or baylike regions of polycyclic aromatic hydrocarbons were potent inhibitors of Gap junctional intercellular communication. *Environmental Health Perspectives*, 106(1), 17–22.
  17. Whitton, B. A. (1992). Diversity, ecology and taxonomy of the cyanobacteria. En N. H. Mann y N. G. Garr (Eds.), *Photosynthetic Prokaryotes* (6ta ed., pp. 1–51). Londres: Biotechnology handbooks.
  18. Zehr, J. P., Bench, S. R., Carter, B. J., Hewson, I., Niazi, F., Shi, T., Tripp, H. J., y Affourtit, J. P. (2008). *Globally distributed uncultivated oceanic N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria lack oxygenic photosystem II* (Vol. 322). California.



SOCIEDAD QUÍMICA  
DE MÉXICO, A.C.  
“La química nos une”