



00377 35

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

SELECCIÓN DE CEPAS BACTERIANAS Y EVALUACIÓN DE SU CAPACIDAD PARA BIODEGRADAR UN INHIBIDOR DE HIDRATACIÓN DE ARCILLAS EMPLEADO EN LA PERFORACIÓN DE POZOS DE PETRÓLEO

## TESIS

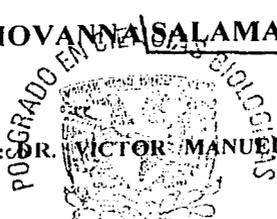
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A :

SANDRA GIOVANNA SALAMANCA PINZÓN

DIRECTOR DE TESIS: DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO



MÉXICO D.F.

OCTUBRE, 2003

COORDINACIÓN

I

CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**PAGINACION  
DISCONTINUA**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
COORDINACIÓN**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico el contenido de mi trabajo doctoral.

NOMBRE: Leopoldo Gutiérrez  
Salamanca Pinzón  
FECHA: 22 oct/03  
FIRMA: [Firma]

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 1 de septiembre de 2003, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) Salamanca Pinzón Sandra Giovanna, con número de cuenta 501459705, con la tesis titulada: "Selección de cepas bacterianas y evaluación de su capacidad para biodegradar un inhibidor de hidratación de arcillas empleado en la perforación de pozos de petróleo", bajo la dirección del(a) Dr. Victor Manuel Luna Pabello.

Presidente:	Dr. Germán Buitrón Méndez
Vocal:	Dr. Miroslav Macek Litochlebova
Secretario:	Dr. Victor Manuel Luna Pabello
Suplente:	Dr. Nathalie Cabirol
Suplente:	Dra. Refugio Rodríguez Vázquez

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 8 de octubre de 2003.

  
Dr. Juan José Morrone Lupi  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

II

---

**APOYO RECIBIDO:**

**Beca para realización de estudios de maestría otorgada por la DGEP (2001-2003)**

**JURADO:**

**DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ**

**DR. MIROSLAV MACEK LITOCHEBOVA**

**DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO**

**DRA. NATHALIE CABIROL**

**DRA. REFUGIO RODRÍGUEZ VÁZQUEZ**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**DEDICATORIA:**

A ti Alejandro, motorcito de mi vida, por tu apoyo en cada momento y por la sabiduría, la alegría y el amor que le imprimes a mis días.

A mis padres y a mis hermanos, porque para el amor, los buenos consejos y los buenos deseos no hay tiempo ni espacio.

A las estrellitas de mi cielo porque hicieron de la noche, un día.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**AGRADECIMIENTOS:**

A mis amigos de aquí y de allá por sus oídos y sus palabras, logrando de este tiempo uno más lleno de alegría y satisfacción.

A mi tutor, el Dr. Víctor Manuel Luna Pabello, a los integrantes de mi comité tutorial, Dra. Refugio Rodríguez Vázquez y Dr. Germán Buitrón, y a mi maestro y amigo, Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello, por sus recomendaciones, comentarios y aportes valiosos para el desarrollo y finalización de este proyecto de tesis y hacer de éste, no solo un trabajo de crecimiento académico e intelectual sino un trabajo de crecimiento personal y humano.

Al Dr. Miroslav Masek y la Dra. Natalie Cabirol, integrantes del jurado de tesis, por sus importantes comentarios y sugerencias.

Al Maestro Antonio Javier Vallecillo Maza, al Dr. César Hernández, al los Maestros Javier Zavala y Gloria Moreno, por su apoyo y colaboración.

Al Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por sus instalaciones y amable atención durante el tiempo de desarrollo de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio, al personal que labora en los mismos y a todos y cada uno de los que contribuyeron de alguna manera, para que este proyecto se llevara a cabo.

**RECONOCIMIENTOS:**

El trabajo experimental de esta tesis fue desarrollado en el Laboratorio de Microbiología Experimental del Departamento de Biología de la Facultad de Química y el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Este trabajo fue financiado en el marco del proyecto FIES- 97-03-I. "Desarrollo de un método de biodegradabilidad aerobia rápida de inhibidores de hidratación de arcillas empleados en los fluidos de perforación de pozos petroleros".

Asimismo se agradece el apoyo económico y técnico prestado por:

- Beca para realización de estudios de maestría otorgada por DGEP (2001-2003).
- Apoyo PAIP 5290-12 y 6190-14, Facultad de Química, UNAM, 2002 – 2003, respectivamente
- Coordinación de Bioprocesos Ambientales, Instituto de Ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de México
- Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I. P. N.
- Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México

---

*“La formulación de un problema es más importante que la solución”*

Albert Einstein

## ÍNDICE

### RELACIÓN DE ABREVIATURAS

RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	2
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>6</b>
2.1. Aspectos generales.....	6
2.2. Características generales de la perforación petrolera, los fluidos de perforación y los inhibidores de hidratación de arcillas.....	7
2.3. Aspectos generales sobre biodegradación.....	11
2.3.1. Factores implicados en el proceso de biodegradación.....	12
2.3.2. Generalidades acerca de los mecanismos genéticos en la biodegradación.....	14
2.5. Generalidades del diagnóstico molecular en microbiología ambiental.....	16
<b>CAPÍTULO 3. OBJETIVOS Y ESTRATEGIA DE TRABAJO.....</b>	<b>19</b>
3.1. Objetivo general.....	19
3.2. Objetivos particulares.....	19
3.3. Estrategia de trabajo.....	20
<b>CAPÍTULO 4. PRIMERA ETAPA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>21</b>
<b>4.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
4.1.1. Inhibidor de hidratación de arcillas K (IHAK).....	21
4.1.2. Medios de cultivo y condiciones de incubación.....	22
4.1.3. Origen de las cepas bacterianas y proceso de selección.....	23
4.1.3.1. Cepas provenientes de recortes de perforación (RP).....	23
4.1.3.2. Cepas provenientes de suelo expuesto a hidrocarburos (SEH).....	24
4.1.3.3. Aislamiento de ADN plasmídico.....	25
4.1.4. Conservación de las cepas.....	26
4.1.5. Determinación de la curva de crecimiento de las cepas seleccionadas y estandarización de inóculos.....	26

4.1.6. Prueba de biodegradación preliminar del IHAK y toma de muestras.....	27
<b>4.2. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
4.2.1. Cepas aisladas y seleccionadas para el desarrollo de la segunda etapa experimental.....	29
4.2.1.1. Cepa proveniente de RP.....	29
4.2.1.2. Cepa proveniente de SEH.....	30
4.2.1.3. Aislamiento de ADN plasmídico.....	31
4.2.2. Características de crecimiento de las cepas y estandarización de inóculos para las pruebas de biodegradación.....	32
4.2.3. Pruebas de biodegradación preliminar.....	34
4.3. Conclusiones parciales.....	35
<b>CAPITULO 5. ETAPA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>37</b>
<b>5.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
5.1.1. Identificación de las cepas de estudio.....	37
5.1.1.1. Caracterización fenotípica.....	37
5.1.1.2. Caracterización molecular basada en el análisis de la secuencia del gen ADNr 16S.....	38
5.1.1.2.1. Aislamiento, purificación y cuantificación del ADN total.....	38
5.1.1.2.2. Prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación del gen ADNr 16S.....	38
5.1.1.2.3. Secuenciación del fragmento del gen ADNr 16S.....	39
5.1.1.2.4. Alineamiento de secuencias, procesamiento y análisis filogenético.....	39
5.1.2. Pruebas de biodegradación del IHAK a diferentes concentraciones.....	42
5.1.2.1. Estandarización de inóculos y procesamiento de muestras experimentales.....	43
5.1.2.2. Análisis y procesamiento de los datos.....	44
<b>5.2. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
5.2.1. Identificación de las cepas de estudio.....	45
5.2.1.1. Caracterización fenotípica.....	45
5.2.1.2. Caracterización molecular basada en el análisis de la secuencia del gen ADNr 16S.....	48
5.2.1.2.1. Amplificación y secuenciación del gen ADN 16S.....	48

5.2.1.2.2. Alineamiento de secuencias, procesamiento y análisis filogenético.....	50
5.2.2. Pruebas de biodegradación del IHAK a diferentes concentraciones.....	55
5.2.3. Análisis integral de los resultados.....	60
5.3. Conclusiones parciales.....	65
<b>CAPITULO 6. CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>67</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>69</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>79</b>
<b>Anexo A. Clasificación de las bacterias empleadas en la filogenia de las cepas RPA y SEHMA.....</b>	<b>79</b>
<b>Anexo B. Caracterización fenotípica de las cepas de estudio.....</b>	<b>81</b>
<b>Anexo C. Análisis estadístico.....</b>	<b>82</b>

## RELACIÓN DE ABREVIATURAS

- ❖ ADN = Ácido desoxirribonucleico
- ❖ ADNr 16S = Ácido desoxirribonucleico ribosómico 16S
- ❖ ARN = Acido ribonucleico
- ❖ ANOVA = Análisis de varianza
- ❖ COT = Carbono orgánico total
- ❖ DBO = Demanda bioquímica de oxígeno
- ❖ DO = Densidad óptica medida en absorbancia
- ❖ DQO = Demanda química de oxígeno
- ❖ EL = Extracto de levadura
- ❖ FP = Fluido de perforación
- ❖ g = Gravedades
- ❖ IHA = Inhibidores de hidratación de arcillas
- ❖ IHAK = Inhibidor de hidratación de arcillas K
- ❖ kb = Kilo bases
- ❖ kbp = Kilo pares de bases
- ❖ LB = Medio Luria-Bertani
- ❖ LBI = Medio Luria-Bertani complementado con un porcentaje específico de IHAK
- ❖ M = Medio mineral
- ❖ ME = Medio mineral complementado con extracto de levadura
- ❖ MEI = Medio mineral complementado con extracto de levadura y 1 % de IHAK
- ❖ MI = Medio mineral complementado con 1% del IHAK
- ❖  $\mu\text{L}$  = microlitros
- ❖  $\mu\text{m}$  = micrómetros
- ❖ MPM = Marcador de peso molecular
- ❖ MSM = Medio de sales minerales

- ❖ MSMI = Medio de sales minerales complementado con un porcentaje específico de IHAK
- ❖ nm = nanómetros
- ❖ nt = nucleótidos
- ❖ PB = Pruebas de biodegradación
- ❖ pb = Pares de bases
- ❖ PCR = Reacción en cadena de la polimerasa
- ❖ RP = Recortes de perforación
- ❖ RPA = Cepa seleccionada, proveniente de recorte de perforación
- ❖ rpm = revoluciones por minuto
- ❖ SEH = Suelo expuesto a hidrocarburos
- ❖ SEHMA = Cepa seleccionada, proveniente de suelo expuesto a hidrocarburos
- ❖ SSF 0.85% = Solución salina fisiológica al 0.85% de cloruro de sodio
- ❖ TSA = Agar tripticase soya
- ❖ UFC = Unidades formadoras de colonias, recuento por mililitro (UFC/mL)
- ❖ u = unidades internacionales

---

## RESUMEN

Sandra Giovanna Salamanca Pinzón. Selección de cepas bacterianas y evaluación de su capacidad para biodegradar un Inhibidor de Hidratación de Arcillas empleado en la perforación de pozos de petróleo.

Director de tesis: Dr. Víctor Manuel Luna Pabello.

Con el fin de establecer la biodegradación de un inhibidor de hidratación de arcillas (IHA), empleado como aditivo en los fluidos de perforación de pozos de petróleo, el presente estudio se enfocó a evaluar la capacidad de biodegradación de dos cepas bacterianas, provenientes de recortes de perforación (RP) y suelo expuesto a hidrocarburos (SEH). La capacidad de utilizar el IHA tipo K (IHAK) a diferentes concentraciones de prueba (296 mg COT/L y 1479 mg COT/L) por cada una de estas cepas, fue determinada en términos de Carbón Orgánico Total (COT). La caracterización fenotípica indicó, que la cepa RPA corresponde a un *Bacillus licheniformis* y la cepa SEHMA, a una bacteria ubicada dentro del grupo de bacilos Gram-negativos, móviles, no fermentadores, oxidasa y catalasa positivos. Mediante el análisis del gen ADN 16S, la cepa RPA y SEHMA, fueron clasificadas como especies filogenéticamente cercanas a especies del género *Bacillus* y *Pseudomonas*, específicamente, a *Bacillus licheniformis* y *Pseudomonas stutzeri*. En las pruebas de degradación del IHAK, utilizándolo como única fuente de carbono, *B. licheniformis* obtuvo el 100% de degradación del IHAK al 0.1%, correspondiente a 296 mg COT/L y solo el 10% de degradación empleando el IHAK al 2%, correspondiente a 570 mg COT/L. Asimismo, *P. stutzeri* obtuvo el 100% de degradación del IHAK al 0.5%, correspondiente a 1692 mg COT/L. Estudios previos indican que el IHAK es susceptible de ser degradado rápidamente por cultivos microbianos mixtos. En este estudio, tanto las velocidades de degradación como la concentración final removida a nivel individual, son mayores a las reportadas utilizando cultivos bacterianos mixtos, sugiriéndose la posible utilización de estas cepas para el estudio de su perfil enzimático, metabólico y genético involucrado en la degradación de este tipo de compuestos o compuestos similares.

**Palabras clave:** *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas stutzeri*, inhibidor de hidratación de arcillas, fluidos de perforación, petróleo.

---

## SUMMARY

Sandra Giovanna Salamanca Pinzón. Bacterial strains selection and degrading capacity evaluation of a shale control inhibitors employed in drilling operations

Thesis directed by: Dr. Víctor Manuel Luna Pabello.

Shale control inhibitors (SCI) are additives included in the drilling fluids formulation. Two bacterial strains isolated from drilling mud (DM) and hydrocarbon-polluted soil (HPS) were able to use SCI type K (SCIK) *in vitro* in a different concentrations. The strains isolated (RPA and SEHMA), were classified by 16S rDNA analysis as a member of the genus *Bacillus* and *Pseudomonas*, clustering with *Bacillus licheniformis* and as belonging to the *Pseudomonas stutzeri* group respectively. *B. licheniformis* was able to use SCI up to concentrations of 296 mg TOC liter<sup>-1</sup> as sole source of carbon and *P. stutzeri* was able to use SCI up to concentrations of 1692 mg TOC liter<sup>-1</sup>. In this study the degradation velocity and final concentration of SCIK remove by two strains were analyzed. The apparent reduction in TOC resulted and degradation velocity by RPA and SEHMA strains, are greater that the reported on previously works with bacterial consortium. From this analysis is suggested the use of these bacterial strains as object of study of enzymatic, metabolic and genetic profile involved in degradation of this kind compounds or similar.

**Keywords:** Palabras clave: *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas stutzeri*, shale control inhibitors, drilling fluids, oil.

---

## CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN

En las actividades de perforación petrolera, se utilizan sustancias denominadas lodos o fluidos de perforación (FP) las cuales permiten mantener la estabilidad de las formaciones que constituyen las paredes del pozo y controlar algunos de los factores que inciden sobre la obtención del producto final.

En la formulación de algunos FP se encuentran los inhibidores de hidratación de arcillas (IHA), aditivos que previenen la hidratación del material arcilloso y por ende, el ensanchamiento de las paredes del pozo, evitando así, el colapso de las formaciones rocosas mientras se realiza la perforación.

Durante las operaciones de explotación y producción, se remueven partículas rocosas denominadas recortes de perforación (RP). Este tipo de materiales generalmente, se impregna con los FP durante el proceso, requiriendo limpieza y/o disposición final. En México, los FP y RP representan el 72% del volumen total de los residuos peligrosos generados en las operaciones que realiza Petróleos de México (PEMEX). Por ejemplo, la unidad de perforación y mantenimiento de PEMEX Exploración y Producción (PEP) generó 200 mil toneladas de este tipo de residuos en el 2001 ([www.pemex.com](http://www.pemex.com)).

Si bien, los fluidos de perforación y sus aditivos son esenciales para perforar con éxito un pozo de petróleo, también pueden convertirse en uno de los aspectos más problemáticos de una operación de perforación debido a la disposición final que se les debe dar después de ser utilizados.

Muchas veces, los ecosistemas receptores de este tipo de residuos, se ven alterados significativamente de forma negativa y el impacto ambiental generado a partir de este tipo de descargas, está directamente relacionado con los factores bióticos y abióticos, la toxicidad y la biodegradabilidad de los componentes que integran este tipo de sustancias.

El proceso de biodegradación es un factor clave en la reducción, a largo plazo, del impacto generado por este tipo de residuos. En la actualidad, la degradación de muchos compuestos contaminantes presentes en la naturaleza, se ha realizado utilizando metodologías de tipo biológico empleando una gran variedad de microorganismos. Estos, cuentan con enzimas sintetizadas a partir de genes presentes en el ADN cromosomal y/o plasmídico (Green y Trett, 1989; Top *et al.*, 1998; Masahito *et al.*, 1999 y 2000; Dinkla *et al.*, 2001; Jae-Chang y Sang-Jong, 2001). Este último, bajo ciertas circunstancias, confiere la capacidad para degradar moléculas orgánicas recalcitrantes (Summers, 1996), permitiendo que las poblaciones microbianas, logren una adaptación, sobreviviendo bajo presión selectiva (Del Solar *et al.*, 1998).

La persistencia y la acción antimicrobiana de algunos contaminantes dificultan la supervivencia de la mayoría de los microorganismos encontrados originalmente en el ambiente afectado. Solamente son capaces de sobrevivir, aquellos microorganismos que cuentan con la capacidad de tolerar la existencia de estas sustancias y puedan aprovechar directa o indirectamente estos compuestos como sustratos para la generación celular o la obtención de energía.

Uno de los aspectos más importantes en la microbiología ambiental es el análisis de la comunidad microbiana, incluidos la identificación de los microorganismos que le componen. En el caso de los procesos de biodegradación, la identificación de las especies microbianas y el estudio de la capacidad de degradación de estas especies, permite explorar el potencial de estas cepas sobre la degradación de compuestos tales como los IHA. De estos últimos y específicamente el IHA tipo K (IHAK), son escasos los reportes sobre los procesos de degradación que se llevan a cabo, los factores y mecanismos que intervienen en dichos procesos, así como los posibles microorganismos participantes, los perfiles enzimáticos y las rutas metabólicas implicadas. Aunado a lo anterior y considerando la problemática que representa el manejo y disposición final de los RP y FP en México, el presente trabajo tiene como fin, ampliar y complementar la información referente a la biodegradación del IHAK.

En este documento se describen, aspectos generales sobre el proceso de perforación petrolera, los FP y los IHA. Asimismo se mencionan, aspectos generales sobre el proceso de biodegradación,

ciertos factores y mecanismos genéticos involucrados y algunas generalidades referentes al diagnóstico molecular en microbiología ambiental. Se describen además, los materiales y las metodologías empleadas para el desarrollo del proyecto de investigación y de igual forma, el análisis y la discusión de los resultados obtenidos, específicamente, sobre el enriquecimiento, aislamiento y selección de dos cepas bacterianas, caracterizadas fenotípica y molecularmente, con el fin de evaluar de forma individual, la capacidad de estas cepas para biodegradar el IHAK a diferentes concentraciones.

---

## CAPITULO 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Aspectos generales

La historia del petróleo en México se remonta al año 1901 en el cual, los norteamericanos Edward L. Doheny y Charles A. Canfield, inician las primeras perforaciones en la hacienda “El Tulillo” en el Municipio de Ébano en San Luis Potosí. A través de los años, con el descubrimiento de nuevos yacimientos, la construcción de pozos petroleros y refinerías y luego de la huelga contra las compañías extranjeras en 1937, se llega a la creación de Petróleos Mexicanos.

En la actualidad, de acuerdo al último informe de “Petroleum Intelligence Weekly”, PEMEX ocupó en el 2000, el sexto lugar entre las empresas petroleras más importantes en el ámbito internacional, ubicándose en el tercer lugar por su nivel de producción anual de crudo, en el séptimo de acuerdo a sus reservas de petróleo crudo y en el séptimo por su producción de gas natural ([www.pemex.com](http://www.pemex.com)). Esta compañía realiza la exploración y aprovechamiento de las reservas de petróleo crudo y gas natural, que se localizan principalmente en las regiones noreste y sureste del país y costa afuera en el Golfo de México.

A nivel mundial, uno de los mayores problemas ambientales de los últimos años, ha sido la contaminación por hidrocarburos generada a partir de la manufactura, transporte y distribución del petróleo (Atlas y Cernigliá, 1995). Asimismo, el desarrollo en el transporte de los hidrocarburos y la explotación de los campos petrolíferos, han provocado, desde hace una

---

veintena de años, la multiplicación de vertidos accidentales masivos de productos petrolíferos en ambientes terrestres y marinos (Laubier, 1991).

Con el fin de tratar, remediar y recuperar el ecosistema alterado a partir de este tipo de contaminación, se han desarrollado e investigado por muchos años, técnicas de tratamiento que emplean métodos físicos, químicos y biológicos. Estos métodos incluyen entre otros, la combustión (Tarrio *et al.*, 1993), la limitación por contención física (Green y Trett, 1989; Ollis, 1992), la utilización de detergentes, dispersantes o surfactantes (Green y Trett, 1989; Ollis, 1992; Domenech, 1993), la utilización de polímeros gelificantes (Ollis, 1992) y la biodegradación (Domenech, 1993). Este último proceso, se denomina de acuerdo con Albert *et al.*, (1995), Madsen (1996) y Manahan (1998), como la descomposición de la materia orgánica natural o sintética, causada por la acción de los microorganismos con el fin de obtener moléculas más simples. Esta descomposición da lugar a la asimilación, digestión, metabolización o rompimiento, en este caso, de contaminantes ambientales, mediante la participación de determinados organismos y depende directamente, de la naturaleza química del compuesto y de los factores químicos, físicos y biológicos implicados (Atlas, 1981). Aunque es un proceso lento comparado con otras tecnologías de tratamiento, puede en algunos casos, tener menos implicaciones ambientales.

## 2.2. Características generales de la perforación petrolera, los fluidos de perforación y los inhibidores de hidratación de arcillas

El proceso de perforación petrolera inicia con la instalación adecuada y el óptimo funcionamiento de los equipos, la maquinaria y los procesos que se llevan a cabo antes, durante y después de la perforación. Las condiciones y la longitud de los pozos de perforación, varían de acuerdo a las características de las formaciones rocosas y los suelos perforados, al igual que de la profundidad en la cual se localiza el yacimiento.

El método más común y aceptado para realizar la perforación de pozos petroleros, es mediante la operación de un equipo de perforación que hace rotar una broca o barrena a través de un tubo hueco ([www.pemex.com](http://www.pemex.com)). Este procedimiento, denominado perforación rotatoria, se inicia a partir del levantamiento de la torre de perforación y la instalación de la maquinaria requerida en toda la operación. La torre es una armazón rígida, formada con barras de acero, cuya función principal es la de subir y bajar el equipo de perforación. Esta torre tiene varias plataformas (Fig. 1), la parte más alta, la parte media y una tercera, reforzada cerca de su base, la cual se denomina piso de la torre (Harrington, 1997).

La herramienta de perforación es semejante a una broca. Está compuesta de uñas metálicas y se fija a una tubería, la cual a su vez atornilla una barra cuadrada llamada kelly. Esta barra atraviesa el orificio cuadrado de un disco de acero (la mesa rotatoria) ubicado en el piso de la torre. Un motor hace girar la mesa rotatoria de tal manera que la barra también gira y al hacerlo, la broca perfora las capas terrestres. Cuando la broca ha alcanzado una profundidad de 8 a 10 metros se

regresa a la superficie con el objeto de agregar un tubo adicional entre la broca y el kelly. Luego se introduce en el pozo y continua la perforación (Harrington, 1997).

La barra, el tubo y la broca constituyen la zarta de perforación. Mientras la perforación esta en progreso, se bombea por la zarta un lodo especial preparado con arcilla, agua y varios productos quimicos. El lodo o fluido de perforación, en adelante FP, regresa a la superficie por el espacio anular entre la tubería de perforación y la pared del orificio perforado, arrastrando consigo los pedazos de rocas cortados por el taladro. Ya en la superficie, la corriente del lodo pasa a través de una criba con el objeto de retener los pedazos de rocas, y continua hacia la bomba para ser utilizada nuevamente. Muestras de los pedazos de rocas se recogen para examinarlas, ya que indican la clase de formación que atraviesa el taladro (Harrington, 1997). En la figura 1, se observa cada una de las partes que constituyen el pozo petrolero, así como la ruta que siguen los fluidos de perforación, que incluyen en este caso, los inhibidores de hidratación de arcillas.

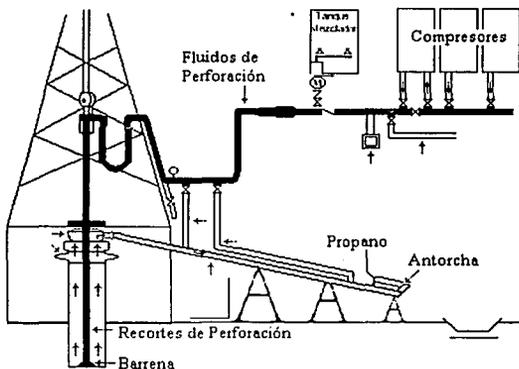


Figura 1. Esquema de un pozo petrolero. (tomado y adaptado de Ruiz-Sánchez, 2001)

El lodo o FP, además de ser uno de los requerimientos en la perforación rotatoria como sistema de circulación, tiene otras finalidades, tales como el enfriamiento de la broca y la formación de una especie de argamasa sobre las paredes del pozo la cual impide que éstas se derrumben. Sin embargo, a pesar de la capa protectora de lodo, las paredes del pozo perforado tienen la tendencia a derrumbarse, especialmente en formaciones de arena o arcilla (Harrington, 1997).

Existen tres clases principales de fluidos de perforación: lodo a base de agua, lodo a base de petróleo y lodo a base sintética (WBM, OBM y SBM, por sus siglas en inglés respectivamente).

Aunque estos fluidos son esenciales para la perforación exitosa de un pozo de petróleo, pueden convertirse además en uno de los aspectos más problemáticos de una operación de perforación debido a la disposición de los recortes que se sacan del pozo y de cualquier fluido de perforación que permanece unido a ellos. No obstante, el daño ambiental en el sitio del pozo es relativamente pequeño, puesto que se confina sólo a la vecindad de la operación de perforación. El grado de impacto que los fluidos de perforación tienen en el ambiente depende de la clase de lodo utilizado y las condiciones ambientales predominantes (Schlumberger Limited, 2001).

En la actualidad, el mayor desafío que se presenta en la formulación de los FP es satisfacer las condiciones exigentes de altas temperaturas y presiones que presentan algunos pozos profundos, pozos horizontales y de alcance extendido. Asimismo, evitar el daño o deterioro del medio ambiente (Schlumberger Limited, 2001).

Como parte de los aditivos en la formulación de los fluidos de perforación, se encuentran los inhibidores de hidratación de arcillas, en adelante IHA. Estos aditivos previenen el

ensanchamiento del pozo mientras se realiza la perforación en sitios con lutitas sensibles al agua. Inmediatamente después de agregar el IHA a un sistema base agua, las moléculas reaccionan con las partes activas presentes en las placas de los minerales de arcilla, enlazándose electrostáticamente y por consiguiente, disminuyéndose la tendencia de la arcilla a absorber el agua que la rodea. Esta acción limita la hidratación y el hinchamiento de las lutitas en presencia de los lodos o fluidos en base agua. Como aditivos presentes en los fluidos de perforación, los IHA deben cumplir con una serie de características que permitan su utilización. Deben ser estables térmicamente, no ser abrasivos ni corrosivos, deben evitar la proliferación de microorganismos, ser económicos y compatibles con otros aditivos, y deben poseer baja toxicidad y alta biodegradabilidad, entre otras (Domínguez y Luna-Pabello, 2001).

### **2.3. Aspectos generales sobre biodegradación**

El proceso de biodegradación o descomposición de la materia orgánica natural o sintética causada por la acción de los microorganismos con el fin de obtener moléculas más simples, es el resultado de los procesos de digestión, asimilación y metabolización de compuestos orgánicos (Murgel, 1984). Dicha utilización es dependiente de la naturaleza química de los compuestos, así como de los factores bióticos y abióticos presentes en el ambiente (Atlas, 1981). La interacción entre el microorganismo y el sustrato incluye la intervención de enzimas intracelulares, ectoenzimas y enzimas extracelulares que permiten, en algunos casos, que el sustrato sea utilizado como fuente de carbono, nitrógeno y otros nutrimentos, o bien, como aceptor final de electrones. En otros casos, el sustrato no proporciona ningún beneficio y las reacciones no enzimáticas derivadas de

los subproductos microbianos, causan cambios químicos como consumo de oxígeno, generación de subproductos de fermentación o alteraciones del pH.

Los procesos de biodegradación pueden agruparse en dos categorías: 1) Biodegradación primaria; la cual implica pequeñas alteraciones en la estructura química del compuesto, debida a la acción de los microorganismos que resulta en la pérdida de propiedades específicas de la sustancia. 2) Biodegradación última; este término se aplica cuando el compuesto orgánico es totalmente utilizado por los microorganismos y da como resultado dióxido de carbono, agua, sales minerales y biomasa (Domínguez y Luna-Pabello, 2001).

### **2.3.1. Factores implicados en el proceso de biodegradación**

En el proceso de biodegradación, los factores químicos, físicos y biológicos determinan la tasa de degradación, la eficiencia en la transformación parcial o total de los compuestos y por ende, la persistencia de estos en el ambiente.

Los factores químicos implicados en el proceso de biodegradación incluyen la composición y tipo de sustancia o compuesto, la longitud de las cadenas y/o la cantidad de compuestos aromáticos, el número y los sustituyentes en la o las moléculas. Asimismo, los factores físicos involucrados, incluyen: solubilidad, sorción, esparcimiento, dispersión, emulsificación, sedimentación, evaporación, estado físico y concentración del compuesto o mezcla, así como, temperatura, disponibilidad de oxígeno, presencia de nutrientes, actividad del agua, pH, salinidad y presión entre otros (Salamanca-Pinzón, 1999).

Asimismo, factores biológicos como el origen del cultivo microbiano, la tolerancia a la toxicidad del compuesto, el tiempo y la forma de adaptación pueden influir de manera determinante sobre la tasa de degradación. De igual forma, la versatilidad genética y la capacidad enzimática de los microorganismos, repercuten sobre la capacidad de supervivencia y la velocidad de degradación de la mezcla o los diferentes compuestos.

De acuerdo con Bartha (1990) y Manahan (1998) la recalcitrancia no es exclusiva de las sustancias xenobióticas, sino también de compuestos de origen natural como los hidrocarburos policíclicos aromáticos, compuestos fenólicos, etc. Por otro lado, algunas sustancias recalcitrantes no necesariamente son tóxicas para los microorganismos, sino que sencillamente son menos susceptibles a la degradación. Un potencial redox inadecuado, temperaturas desfavorables y/o valores extremos de pH (Bouwer 1992; Crews *et al.*, 1993; Zitomer y Speece, 1993), así como un balance de nutrimentos inorgánicos desfavorable, pueden determinar la recalcitrancia de un compuesto. Concentraciones de sustrato muy altas o muy bajas (Alexander, 1981), inhibición por un segundo compuesto (Wiggins y Alexander, 1988) o conversión de la sustancia a un producto tóxico (Murakami y Alexander, 1989), pueden influir de igual manera en la forma como un compuesto puede persistir en el ambiente. Por consiguiente, para que el proceso de biodegradación se lleve a cabo de manera efectiva es necesario que la relación entre los diferentes factores físicos, químicos y biológicos garantice no sólo el óptimo desempeño de los microorganismos involucrados en el proceso sino que se vea favorecida determinadamente la transformación del compuesto, minimizando así su impacto sobre el ambiente.

### 2.3.2. Generalidades acerca de los mecanismos genéticos en la biodegradación

Debido al acercamiento que ha tenido la genética con la biología molecular, se ha obtenido nueva información sobre la estructura y la organización de los genomas, considerados actualmente, como sistemas fluidos cuyo impacto sobre la evolución es atribuido a su plasticidad (Barbieri *et al.*, 2000). En años recientes, varios estudios que han comparado la secuencia de ADN de los genes que codifican para la degradación de compuestos tales como los aromáticos, han proporcionado información básica sobre la evolución, la diversidad y la distribución de los genes catabólicos (Van der Meer *et al.*, 1992).

Muchos de estos genes catabólicos pueden estar localizados en los cromosomas o en plásmidos (Green y Trett, 1989). Estos últimos, son elementos extracromosomales de ADN cuyo intervalo de longitud es de aproximadamente entre 300 pb a 2400 kpb (Kado, 1998), pueden ser auto transmisibles y tener un amplio grupo de huéspedes (Top *et al.*, 1998; You-Sun *et al.*, 2001; Cook *et al.*, 2001) entre estos, bacterias Gram positivas y Gram negativas (Kado, 1998).

La habilidad de las bacterias para explorar nuevos ambientes y de responder a nuevas presiones selectivas pueden explicarse con más facilidad por la adquisición de nuevos genes por transferencia horizontal, comparada con la modificación secuencial de las funciones de los genes por la acumulación de puntos de mutación (Davison, 1999). De este modo, el intercambio intergénico horizontal de los plásmidos, juega probablemente un papel importante en la diseminación y subsecuente recombinación de los genes catabólicos en las comunidades microbianas del suelo, lodos y el agua (Top *et al.*, 1998). De la misma manera, juega un papel

crucial en la evolución de las rutas degradativas de las bacterias (Van der Meer *et al.*, 1992) y contribuye significativamente a la adaptación de las comunidades microbianas naturales (Sobecky *et al.*, 1997). Se ha reportado previamente, un ejemplo importante de la adaptación mediada por plásmidos en poblaciones microbianas durante periodos de estrés por contaminación, en donde la frecuencia de los plásmidos catabólicos incrementa duplicándose de 2 a 10 veces (Burton *et al.*, 1982; Hada y Sizemore, 1981; Ogunseitán *et al.*, 1987; Sobecky *et al.*, 1997). Una explicación del incremento en esta frecuencia, es la diseminación de los genes catabólicos codificados por plásmidos, a través de la cual, estos son auto transmitidos o movilizadas dentro de la comunidad microbiana (Sobecky *et al.*, 1997).

Diversos estudios han reportado la intervención de este tipo de ADN extracromosomal en la degradación de una gran variedad de compuestos. Como ejemplo se puede mencionar, compuestos tales como anilinas (Boon *et al.*, 2001), ácido 2,4-D diclorofenoxiacético (Top *et al.*, 1998), 2-aminobenzoato (Altenschmidt *et al.*, 1990), tetracloruro de carbono (Lee *et al.*, 1999), triclosan, atrazina (Parales *et al.*, 2002) y diferentes hidrocarburos aromáticos (Eaton *et al.*, 1998; Sentschilo *et al.*, 2000) e hidrocarburos clorados (Jac-Chang y Sang-Jong, 2001; Saini y Kahlon, 1998). De igual forma, se han relacionado con la capacidad de conferir resistencia a metales pesados (Trajanovska *et al.*, 1997), radiación (Thomas y Smalla, 2000) y diversos compuestos xenobióticos (Davison, 1999).

---

## 2. 5. Generalidades del diagnóstico molecular en microbiología ambiental

Los métodos comúnmente usados para analizar la comunidad microbiana están basados en los aislamientos de cepas individuales sobre medio sólido, seguida por la caracterización de las colonias aisladas por uno o más métodos (Hurst *et al.*, 1997), no obstante, gran parte de los microorganismos presentes en la mayoría de ambientes no son fácilmente cultivados por las técnicas tradicionales y por ende, no son incluidos en los análisis subsiguientes. Las pruebas de tipo bioquímico, morfológico y serológico requieren habitualmente el crecimiento del organismo de estudio, por lo tanto, este tipo de procedimientos, son significativamente limitantes para el conocimiento de la diversidad verdadera de las bacterias y en otras situaciones, pueden ser complicados o difíciles de realizar (Relman, 1993).

El creciente uso de la secuencia del gen ribosomal ADNr 16S con fines filogenéticos, evolutivos y diagnósticos ofrece una oportunidad alterna. Esta región, es una secuencia universal contenida en todas las bacterias. Los "primers" o iniciadores derivados de la secuencia, alinean con todas las especies conocidas. La reacción en cadena de la polimerasa -PCR- puede utilizarse para amplificar y posteriormente detectar la secuencia original del gen 16S ribosomal conservada en todas las eubacterias. Las partes externas de esta secuencia, a diferencia de las secuencias internas, son altamente conservadas. La amplificación que utiliza los iniciadores diseñados para las secuencias originales, permite que la secuencia interna del producto pueda ser utilizado para el análisis filogenético que permita la identificación de aislamientos específicos.

El análisis del gen ADNr 16S ha resultado en una explosión de estudios filogenéticos. Estos análisis pueden realizarse con el ADN total extraído, obtenido de muestras ambientales con previo cultivo de bacterias aisladas (Raina *et al.*, 1999) o no aisladas (Cullen y Hirsch, 1998). Del mismo modo, es posible extraer el ADN total de la comunidad bacteriana de muestras ambientales (Borneman *et al.*, 1996) o bien, complementado con técnicas de microscopía, permite la determinación de bacterias activas *in situ* (Christensen *et al.*, 1999). En la figura 2, se presenta el dibujo esquemático del gen ARN 16S correspondiente a 1542 pb, así como las localizaciones aproximadas y la orientación de algunos de los iniciadores conocidos. Se indican además, los tamaños aproximados de los productos generados a partir de los pares de iniciadores empleados en el PCR.

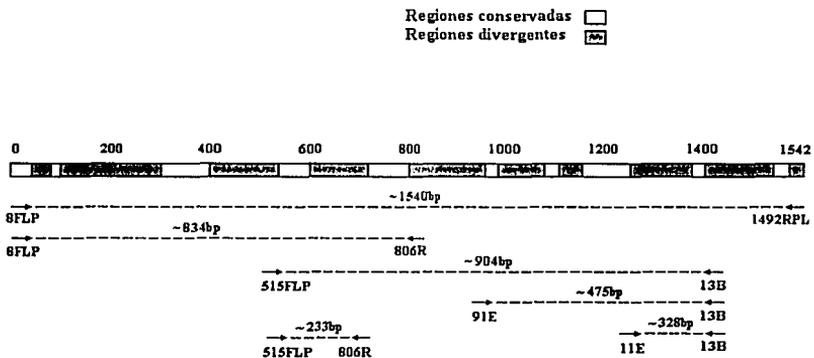


Figura 2. Dibujo esquemático del gen ARNr 16S (tomado de Relman, 1993)

---

Una de las herramientas empleadas en el análisis de las secuencias de ADN y ARN son las bases de datos, con las cuales se pueden hacer comparaciones y establecer diferencias, similitudes y obtener resultados conclusivos en el caso del diagnóstico mediante técnicas moleculares.

En microbiología ambiental y ecología microbiana, las bases de datos se usan comúnmente para la identificación de microorganismos mediante la secuencia del gen ADN<sub>r</sub> 16S y la recuperación y evaluación de la secuencia de genes de prueba o iniciadores para PCR (Raina *et al.*, 1999).

Muchos sistemas computacionales con programas para el análisis de secuencias están disponibles para los investigadores en el "Genetic Computers Group" (GCG) y varios sitios en Internet. Herramientas como Fasta y Blast, son proporcionados por el "Nacional Center for Biotechnology Information" (NCBI). Estos programas de búsqueda se usan con el fin de encontrar que secuencias en las bases de datos son similares a la secuencia desconocida, e identificar la relación distante a un ancestro común. De igual forma, permiten a los investigadores realizar la comparación de las secuencias, además de identificar las regiones homólogas o únicas en la secuencia de ácidos nucleicos de interés (Raina *et al.*, 1999).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

---

## CAPITULO 3. OBJETIVOS, HIPÓTESIS Y ESTRATEGIA DE TRABAJO

### 2.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad de degradación del inhibidor de hidratación de arcillas tipo K (IHAK) por bacterias seleccionadas e identificadas fenotípica y genotípicamente, provenientes de recortes de perforación y suelo expuesto a hidrocarburos.

### 2.2. Objetivos particulares

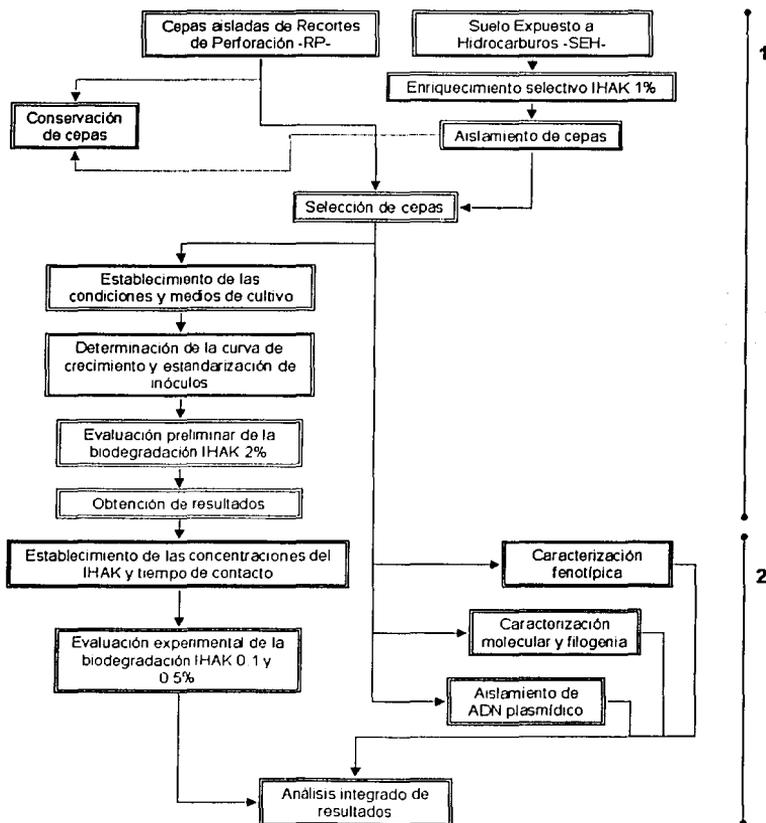
1. Seleccionar dos bacterias con capacidad biodegradadora del IHAK a partir de una comunidad bacteriana proveniente de recortes de perforación y suelo expuesto a hidrocarburos.
2. Determinar la presencia de ADN plasmídico en las cepas aisladas y preseleccionadas.
3. Evaluar *in vitro* la degradación del IHAK, a diferentes concentraciones, mediante la medición de carbono orgánico total.
4. Establecer la diferencia en cuanto a la capacidad de degradación de cada una de las bacterias, según las concentraciones del IHAK empleadas en la evaluación.
5. Caracterizar fenotípica y genotípicamente las cepas evaluadas.

### 2.3. Hipótesis

La cepa bacteriana proveniente de recortes de perforación tendrá una mayor capacidad de degradar el inhibidor de hidratación de arcilla tipo K (IHAK) que la cepa bacteriana proveniente de un suelo expuesto a hidrocarburos.

## 2.4. Estrategia de trabajo

Con base en la información bibliográfica se realizó el planteamiento del trabajo de investigación, el establecimiento de los protocolos y la estrategia general de investigación presentada a continuación. El trabajo de investigación, se desarrollo en dos etapas experimentales: (1) la primera etapa y (2) la segunda etapa experimental, a partir de las cuales se obtuvieron los resultados que se discuten y analizan de forma detallada más adelante.



---

## CAPITULO 4. PRIMERA ETAPA EXPERIMENTAL

### 4.1. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.1.1. Inhibidor de hidratación de arcillas K (IHAK)

Este inhibidor de hidratación de arcillas, fue seleccionado en función de su uso en los campos petroleros Mexicanos. Al igual que otros IHA, el IHAK se adiciona a los FP a una concentración del 6 al 10% en peso. Es un polímero orgánico con altas velocidades de consumo, que incrementa la eficiencia en el proceso de perforación, reacciona con las partes activas de las placas de los minerales de arcilla, actuando mediante intercambio catiónico, es estable térmicamente hasta los 200°C y a los cambios de pH en los fluidos de perforación (Domínguez y Luna-Pabello, 2001). A continuación se presentan las características fisicoquímicas del IHAK y en la tabla 1, los grupos funcionales presentes en esta sustancia.

Características fisicoquímicas del inhibidor de hidratación de arcillas K (Klagard, Compañía: M. I. Drilling) (Ambriz, 2001):

- |                                     |                      |
|-------------------------------------|----------------------|
| ❖ Utilizado en el sureste de México | ❖ pH (unidades): 6.5 |
| ❖ Aspecto: líquido azul             | ❖ COD: 284 g/L       |
| ❖ Solubilidad en agua: completa     | ❖ %C: 55             |
| ❖ Amina modificada                  | ❖ %N: 20             |
| ❖ IHA tipo catiónico                | ❖ %H: 17             |
| ❖ Gravedad específica: 1.1          | ❖ COT: 295 g/L       |

**TABLA 1.** Grupos funcionales presentes en el IHAK detectados a partir del análisis de espectros de infrarrojo (Tomado de Ambriz, 2001)

Bandas (cm <sup>-1</sup> )	Grupo funcional
3600 - 3000	Grupo R-NH <sub>2</sub>
2950 - 2850	-CH <sub>3</sub> y CH <sub>2</sub> -
1650 - 1630	Grupo -NH <sub>2</sub> -
1480	-CH <sub>3</sub>
1280 - 1050	Alquil aminas
950 - 870	Grupo -NH <sub>2</sub> -

#### 4.1.2. Medios de cultivo y condiciones de incubación

Durante el desarrollo del proyecto de investigación se emplearon los medios TSA (MERCK), LB -Luria Bertani- sólido y líquido (medio previamente descrito y preparado según Sambrook *et al.*, 1989) y medio de sales minerales (MSM) (Iwaki *et al.*, 1999) sólido y líquido. Estos medios se complementaron en algunos casos con un porcentaje específico de IHAK filtrado en membrana de polipropileno con un tamaño de poro de 0.45 µm, utilizando un portafiltro swinnex® de 25 mm (3.4 cm<sup>2</sup>) Millipore®.

Los medios sólidos y líquidos empleados durante todo el estudio se incubaron a 37 °C. La agitación de los medios líquidos se hizo de manera constante a 150 rpm y 75 rpm en un agitador orbital (Lab Line Incubator Shaker orbital Daigger®). La velocidad de agitación se ajustó dependiendo del volumen del medio de cultivo.

ESTE CON  
FALLA DE ORIGEN

### 4.1.3. Origen de las cepas bacterianas y proceso de selección

Las cepas bacterianas empleadas, corresponden a cepas aisladas en un estudio previo, a partir de recortes de perforación RP, puestos en contacto con el IHAK, obtenidos de pozos petroleros del sureste mexicano y cepas bacterianas aisladas de suelo expuesto a hidrocarburos SEH, proveniente de áreas cercanas a pozos de petróleo. Para este estudio, se seleccionaron dos cepas, una proveniente del RP y otra proveniente del SEH, empleando distintos criterios de selección, debido a la desigualdad en cuanto al origen de las muestras y el proceso de aislamiento.

#### 4.1.3.1. Cepas provenientes de recortes de perforación (RP)

Las cepas bacterianas provenientes del RP obtenidos de pozos del sureste mexicano, fueron aisladas previamente y proporcionadas por Zapata (2002). Estas cepas estuvieron en contacto con el IHAK y a cada una de estas, se les asignaron las letras: A, B, D, E, y G.

Para la selección de la cepa bacteriana a emplearse en las pruebas experimentales, se consideraron los siguientes criterios cualitativos:

- Crecimiento en el medio mineral (MMI 1%) medio preparado y previamente descrito en OECD (1992).
- Crecimiento en MMI 1% complementado con Extracto de Levadura (EL) 50 mg/L
- Ausencia de crecimiento en placa con agar simple y placa con agar MM (sin IHAK y EL)
- Presencia de ADN plasmídico

Adicionalmente se consideró como criterio cuantitativo, la respuesta de crecimiento de tres de las cepas provenientes del RP, con el IHAK como sustrato. Esta respuesta de crecimiento se midió

---

espectrofotométricamente (UltraSpec 3000 UV/VIS espectro photometer – Pharmacia Biotech), mediante la lectura de la densidad óptica (DO) y el conteo de Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/ mL). Para esta prueba, se emplearon dos grupos de medios de cultivo conformados por seis medios en total. Los medios minerales compuestos de acuerdo a OECD, 1992, incluyeron:

1. Medio mineral (M) simple
2. Medio mineral (MI) con 1% del IHAK
3. Medio mineral (ME) con EL 50 mg/L
4. Medio mineral (MEI) con 1% del IHAK y EL 50 mg/L

Los medios de cultivo compuestos de acuerdo Iwaki, et al., 1999, modificado son:

5. Medio de sales minerales (MSM) simple
6. Medio de sales minerales (MSMI) con 1% del IHAK

El análisis de los datos experimentales se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA), con una prueba de comparación múltiple LSD (Least significant difference)  $\alpha = 0.05$ . La variable dependiente correspondió a los datos de UFC/mL. La evaluación se hizo entre los medios ME y MEI y entre las tres cepas bacterianas empleadas y denominadas A B y D.

#### **4.1.3.2. Cepas provenientes de suelo expuesto a hidrocarburos (SEH)**

Para la obtención de las cepas bacterianas provenientes del SEH, se hizo un enriquecimiento del suelo con 1% del IHAK en el medio mineral MSM (MSMI 1%). Durante los 20 días en los que se llevó a cabo el enriquecimiento, se realizaron pases consecutivos con el fin de remover el material particulado y la materia orgánica. Las condiciones de incubación correspondieron a

37° C, 150 rpm. Luego del enriquecimiento del SEH con el IHAK, se aislaron las cepas bacterianas, empleando diluciones seriadas y siembras consecutivas en los medios de cultivo sólidos MSMI 1% complementado con 20 g/L de agar agar, LB, TSA (MERCK), MacConkey (OXOID) y Agar sangre.

Para la selección de la cepa bacteriana proveniente del SEH, a emplearse en las pruebas experimentales, se utilizaron los medios de cultivo líquidos y sólidos MSMI 1%, MSMI 1% sin nitrógeno, MSM, LB y LBI 1% y se consideraron los siguientes criterios cualitativos:

- ❖ No-formación de esporas
- ❖ Supervivencia de la cepa después de 10, 15 y 20 días en MSMI 1%,
- ❖ Presencia de ADN plasmídico
- ❖ Crecimiento en medio LB, LBI 1% y MSMI 1% sólido y en MSMI 1% sin nitrógeno
- ❖ Como criterio de exclusión se consideró el crecimiento de las cepas bacterianas en el medio MSM sólido y líquido sin IHAK como única fuente de carbono.

#### 4.1.3.3. Aislamiento de ADN plasmídico

Considerado como uno de los criterios para la selección de las cepas de estudio, se empleó el procedimiento para determinar la presencia de plásmidos. El aislamiento de éste tipo de ADN, se realizó según el protocolo de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). El ARN fue eliminado con SIGMA Ribonucleasa -A.E C 3.1.27.5- 32 mg de proteína/mL -E 1%- extraída de páncreas de bovino. Se empleó además el sistema de purificación Midiprep Wizard® PureFecton Plasmid DNA Purification System – Promega. La cuantificación del ADN plasmídico aislado, se realizó

con espectrofotometría (UltraSpec 3000 UV/visible espectro photometer – Pharmacia Biotech). Por otra parte, con fines de visualización, se hicieron las electroforesis correspondientes en gel de agarosa al 1% (agarosa ultrapure GIBCO BBL) en buffer TBE (Buffer TBE Ultrapure 10X GIBCO BBL). Como referencia para la extracción, la cuantificación y la electroforesis se utilizó el plásmido pUC19 contenido en una cepa especial de *Escherichia coli*. La captura, el procesamiento y el análisis de imágenes se hizo con el digitalizador de imágenes Fluor –S™ Multimager BioRAD, equipado con el programa Quantity one 4.2.1.0.

#### 4.1.4. Conservación de las cepas

Durante el experimento se manejó un cultivo de referencia de cada cepa. Estos cultivos se mantuvieron conservados en glicerol al 80% con medio LB, MSMI 1% y Solución Salina Fisiológica (SSF) 0.85%. Adicionalmente se manejaron cultivos conservados en medios líquidos y sólidos tales como MSMI 1% y LB complementado con IHAK al 1% (LBI 1%) a 4 y 20 °C.

#### 4.1.5. Determinación de la curva de crecimiento de las cepas seleccionadas y estandarización de inóculos

La determinación de la curva de crecimiento de las cepas seleccionadas se realizó mediante la lectura periódica de la DO<sub>550</sub> nm, durante 24 horas. Los matraces de 250 mL conteniendo 50 mL de caldo LBI 2% se inocularon con 1% de un cultivo puro crecido toda la noche en el mismo medio. Este último se inoculó con una suspensión de cinco colonias crecidas previamente en agar LB durante 24 h en 1 mL de agua estéril. Posteriormente, con el fin estandarizar los inóculos para las pruebas de biodegradación, utilizando una posible correlación entre la DO y las UFC, se

midieron estos dos parámetros en la fase exponencial de crecimiento de cada cepa. Las UFC/mL se contaron sobre agar LBI 1% con el método de Miles y Misra (Miles *et al.*, 1938). Para la estandarización de los inóculos de cada una de las cepas bacterianas se obtuvo el “pellet” a partir de centrifugación a 2000 x G de 100 mL de un cultivo crecido en medio LBI 2% en fase media exponencial. El “pellet” se lavó dos veces con SSF 0.85%. Posteriormente, se suspendió el material celular en agua destilada estéril y se determinó la DO para el cálculo de las UFC/mL iniciales, considerando la correlación de los dos parámetros establecida en este estudio. El inóculo de cada una de las cepas bacterianas se ajustó a una concentración bacteriana de  $1 \times 10^6$  UFC/mL.

#### 4.1.6. Prueba de biodegradación preliminar del IHAK y toma de muestras

Las pruebas de biodegradación preliminares se realizaron con las cepas bacterias seleccionadas, denominadas cepas RPA y SEHMA proveniente del RP y el SEH respectivamente. Se utilizó como medio de cultivo base para esta determinación, el medio MSM complementado con el IHAK al 2% (MSMI 2%). Esta concentración corresponde a 5905 mg de carbono orgánico total por litro (COT/L). Como se describe en la tabla 2, en algunos de los tratamientos el medio MSMI 2% fue complementado además con EL (0.005 g/L). Los tratamientos y el contenido de los medios utilizados se realizaron considerándose cuatro controles: control de inóculo, de procedimiento, de adsorción y control de degradación abiótica. El tratamiento prueba para la cepa RPA contenía además del IHAK, EL. El tratamiento prueba para la cepa SEHMA contenía IHAK como única fuente de carbono. Estas pruebas de biodegradación se llevaron a cabo mediante el cultivo de las cepas bacterianas objeto de estudio durante 21 días.

TABLA 2. Composición de los medios de cultivo empleados en las pruebas de biodegradación.

Cepa bacteriana	Grupo	Matraz	Contenido			
			Inóculo	MSM	THA	IG
RPA	1	Muestra	✓	✓	✓	✓
	2	Control inóculo	✓	✓		
	3	Control de procedimiento	✓	✓		✓
	4	Control de adsorción	✓	✓	✓	✓
	5	Control de degradación abiótica		✓	✓	✓
SEHMA	1	Muestra	✓	✓	✓	
	2	Control inóculo	✓	✓		
	3	Control de procedimiento	✓	✓		✓
	4	Control de adsorción	✓	✓	✓	✓
	5	Control de degradación abiótica		✓	✓	✓

La toma de muestras durante la prueba de biodegradación se realizó al día 0 antes y después de la inoculación de las cepas bacterianas y al día 21 del experimento. De la misma muestra tomada se realizó el conteo de UFC/mL y la determinación de COT. Para el conteo de UFC se utilizó el procedimiento de Miles y Minsra mediante seis diluciones seriadas las cuales se interpretaron aproximadamente 12 horas después.

El manejo de las muestras para el análisis de COT se realizó de acuerdo con los métodos estandarizados, sección 5310 B (Clesceri *et al.*, 2000). Las muestras se filtraron por una membrana de polipropileno con un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ , se conservaron con ácido fosfórico 1/20 y posteriormente, se refrigeraron hasta el momento de la lectura. El COT se midió en un aparato TOC 5050 Total Organic Carbon Analyzer Shimadzu, con un ASI-5000 A Autosampler Shimadzu.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

---

## 4.2. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

### 4.2.1. Cepas aisladas y seleccionadas para el desarrollo de la segunda etapa experimental

#### 4.2.1.1. Ceba proveniente de RP

De las cinco cepas bacterianas obtenidas previamente del RP y proporcionadas para este estudio, fueron pre-seleccionadas las cepas A, B y D, utilizando los criterios planteados para este propósito. Posteriormente, se ejecutó la prueba correspondiente a la comparación de la respuesta de crecimiento de las tres cepas. Los datos obtenidos a partir de esta prueba, luego del análisis de varianza y la aplicación de la prueba LSD ( $\alpha = 0.05$ ), permitieron establecer la diferencia en cuanto al medio de cultivo ME y MEI y a la respuesta de crecimiento de las tres cepas.

En el medio de cultivo MEI se obtuvo el mayor crecimiento (promedios más altos de UFC/mL con las tres cepas: A, B y D) y a nivel de bacterias, la cepa bacteriana A fue la que resultó con el promedio más alto de UFC/mL en el medio MEI.

Considerando los resultados obtenidos, a partir de la aplicación de los criterios de selección, incluyendo los resultados estadísticos derivados de la prueba de crecimiento ante el IHAK (Anexo C), fue seleccionada la cepa bacteriana A de entre las cepas provenientes del RP, para la realización de las pruebas experimentales. Esta cepa bacteriana será nombrada en adelante como cepa RPA.

#### 4.2.1.2. Cepa proveniente de SEH

Mediante los procedimientos descritos para el aislamiento de las cepas bacterianas a partir del SEH, se recuperaron 13 cepas correspondientes a 12 bacilos Gram-negativos y 1 bacilo Gram-positivo. Se asignaron las letras K1, K2, K3, K4, T1, T2, T3, T4, M1, M2, M3, M4B y MA a cada una de las cepas aisladas. Los medios que proporcionaron el mejor crecimiento y el más abundante, en cuanto a cantidad y diversidad de las colonias, fueron el medio TSA y el agar sangre. En el medio MacConkey sólo se recuperó un tipo de colonia. Las fotografías de las cepas bacterianas obtenidas y posteriormente aisladas se presentan en la figura 3.

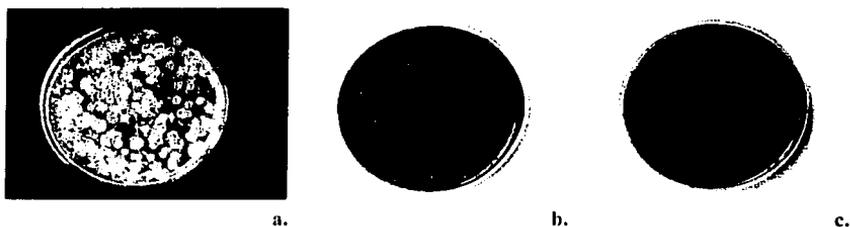


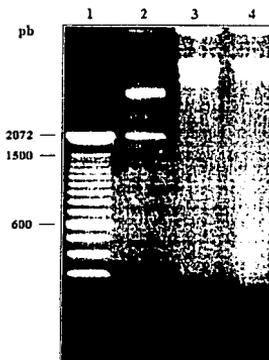
Figura 3. Crecimiento en placa en los medios TSA (a), Agar sangre (b) y MacConkey (c), de las cepas recuperadas del SEH después de enriquecimiento con el IHAK.

De las 13 cepas bacterianas aisladas del SEH, fue seleccionada la cepa MA de acuerdo a los criterios de selección previstos. Entre las características de esta cepa se encuentran: la no-formación de esporas, supervivencia de la cepa después de 10, 15 y 20 días en MSMI 1%, presencia de ADN plasmídico, crecimiento en medio LB, LBI 1% y MSMI 1% sólido, crecimiento en MSMI 1% sin nitrógeno y ausencia de crecimiento en el medio MSM sólido y

líquido sin IHAK como única fuente de carbono. Esta cepa bacteriana seleccionada se nombrará en adelante como cepa SEHMA.

#### 4.2.1.3. Aislamiento de ADN plasmídico

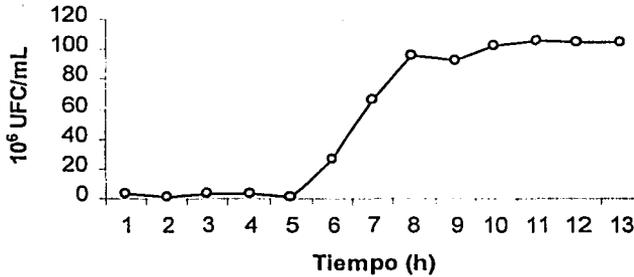
Considerando que la presencia de ADN plasmídico fue un requerimiento pre-establecido para la selección de las cepas a emplearse en las pruebas experimentales, se procedió a verificar su presencia en las cepas preseleccionadas. Al respecto el ADN plasmídico se pudo obtener a partir de las cepas RPA y SEHMA mediante el protocolo de lisis alcalina y con Midiprep Wizard® - Promega (Fig. 4). Este tipo de ADN se pudo aislar, cuantificar y visualizar en repetidas ocasiones con el fin de corroborar el resultado, cumpliendo así, con este criterio para la continuación de las subsecuentes pruebas experimentales.



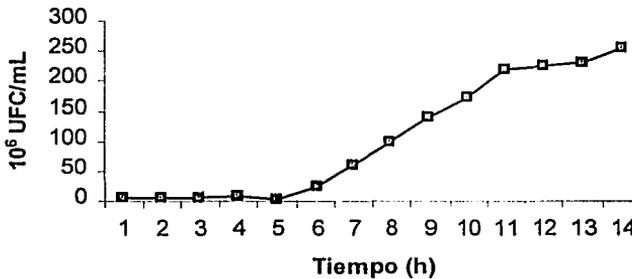
**Figura 4.** ADN plasmídico obtenido de las cepas seleccionadas RPA y SEHMA. Pozo 1: MPM (100 bp DNA Ladder GIBCO BBL). Pozo 2: plásmido pUc19 en *E. coli*. Pozo 3: ADN plasmídico de la cepa RPA y pozo 4: ADN plasmídico de la cepa SEHMA

#### 4.2.2. Características de crecimiento de las cepas y estandarización de inóculos para las pruebas de biodegradación

A partir de la representación gráfica del número de células frente al tiempo, en la curva de crecimiento determinada durante 24 horas, para las cepas seleccionadas (Fig. 5), se determinó que la fase exponencial de crecimiento de la cepa RPA se lleva a cabo de las 4 a las 8 horas de crecimiento y en el caso de la cepa SEHMA, de las 5 a las 10 horas.



a.



b.

Figura 5. Curva de crecimiento en medio LBI 2% de las cepas bacterianas RPA (a) y SEHMA (b)

A los resultados obtenidos se les aplicó una regresión lineal (Fig. 6), obteniéndose una correlación entre las dos mediciones. En el caso de la cepa RPA  $R^2 = 0.984$  y para la cepa SEHMA  $R^2 = 0.952$ . Considerando la existencia de esta correlación, se ajustaron los inóculos de cada una de las cepas bacterianas a una concentración bacteriana de  $1 \times 10^6$  UFC/mL para el desarrollo de las pruebas de biodegradación preliminares.

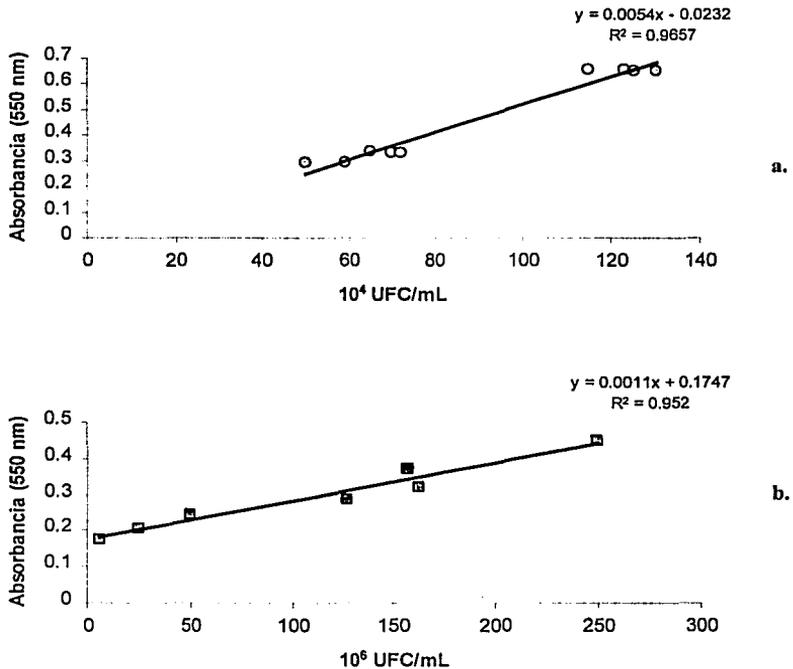


Figura 6. Correlación entre DO y UFC en fase exponencial de crecimiento de las cepas bacterianas RPA (a) y SEHMA (b)

#### 4.2.3. Prueba de biodegradación preliminar

La prueba de biodegradación llevada a cabo durante 21 días con el IHAK al 2% (5905 mg COT/L) y con las cepas bacterianas RPA y SEHMA, generaron los resultados de COT presentes en la figura 7. En esta grafica se presenta la concentración inicial antes de la mezcla, así como el primer y último dato obtenido durante la prueba, correspondientes a los días 0 y 21. Igualmente, en la figura 8, se observan los resultados del crecimiento de cada una de las cepas. Los valores se encuentran expresados con el logaritmo decimal del número de células (UFC/mL) a diferentes tiempos.

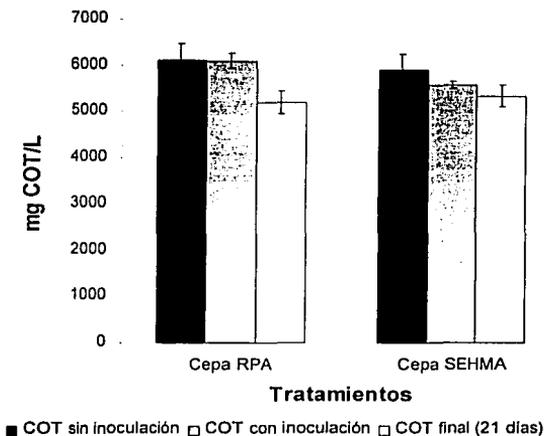


Figura 7. Resultados en términos de COT de la prueba de biodegradación preliminar del IHAK al 2% con las dos cepas

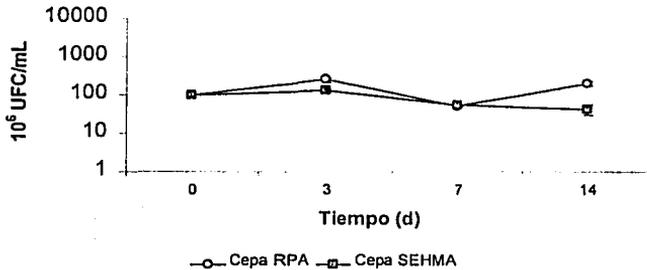


Figura 8. Resultados promedio del conteo de UFC/mL de las cepas en estudio

En cuanto a los valores de remoción del carbono durante el tiempo de la prueba, la cepa RPA utilizó 912 mg COT/L, correspondiente a un 15 % de remoción del carbono total contenido en el matraz, y la cepa SEHMA utilizó, 571 mg COT/L correspondiente a un 10 % del carbono total contenido en el matraz como única fuente de carbono. Estos resultados preliminares, permitieron establecer el tiempo de contacto, la cantidad de bacterias por mL y las concentraciones del IHAK a emplear en las pruebas experimentales siguientes.

### 4.3. Conclusiones parciales

- De acuerdo a los criterios de selección aplicados, de las cinco cepas bacterianas provenientes del RP, fue seleccionada la cepa bacteriana denominada RPA. Adicionalmente, a partir de una comunidad bacteriana compuesta por 12 bacilos Gram positivos y un bacilo Gram negativo, aislada de suelo expuesto a hidrocarburos, fue seleccionada la cepa bacteriana denominada SEHMA.

- Las dos cepas seleccionadas, provenientes de recortes de perforación y suelo expuesto a hidrocarburos, presentaron ADN de tipo plasmídico. Este material genético fue aislado, cuantificado y visualizado mediante los diferentes protocolos empleados
  
- La estandarización de los inóculos en las pruebas de biodegradación, se realizó considerando la correlación obtenida entre DO y UFC en la fase exponencial de crecimiento de las dos cepas
  
- Las cepas RPA y SEHMA degradan el IHAK al 2% (5905 mg COT/L). Particularmente, la cepa RPA utilizó 912 mg COT/L (15%) del IHAK como fuente de carbono adicional y la cepa SEHMA utilizó 571 mg COT/L (10%) como única fuente de carbono.
  
- A partir de los resultados obtenidos en las pruebas de biodegradación preliminar, y con el fin de realizar pruebas de biodegradación de la segunda etapa experimental, se estableció: 1) El aumento del inóculo de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^8$  UFC/mL. 2) La reducción en el tiempo de evaluación de 21 a 7 días y, 3) La reducción de la concentración del IHAK del 2% al 0.5 y 0.1 %, simulando así otros valores de concentración similares a las detectadas en campo.

## **CAPITULO 5. SEGUNDA ETAPA EXPERIMENTAL**

### **5.1. MATERIALES Y MÉTODOS**

El presente capítulo se llevó a cabo de acuerdo a los resultados obtenidos en la primera etapa experimental. Las dos cepas seleccionadas, cepas RPA y SEHMA, son evaluadas según su capacidad de degradación del IHAK a diferentes concentraciones, analizándose la velocidad a la que se lleva a cabo la utilización del sustrato. Adicionalmente, se describe la caracterización mediante pruebas fenotípicas y genotípicas de dichas cepas.

#### **5.1.1. Identificación de las cepas de estudio**

##### **5.1.1.1. Caracterización fenotípica**

Para la caracterización fenotípica de las cepas RPA y SEHMA, se utilizaron las pruebas primarias y secundarias tales como: características macroscópicas de las colonias, examen con tinción de Gram, morfología (forma, disposición de las células bacterianas, presencia o ausencia de estructuras específicas, posición y forma de estos) y características metabólicas o bioquímicas, utilizando medios de cultivo diferenciales, estos últimos se ejecutaron considerando la diferencia de las dos cepas en cuanto a la tinción de Gram (Anexo B). La identificación de la cepa SEHMA se complementó adicionalmente con las pruebas bioquímicas comerciales API20 E ® Sistema de identificación de Enterobacterias y otros bacilos Gram negativos (BioMerieux) y el sistema Crystal ® Enteric / Nonfermenter (BBL).

---

### **5.1.1.2. Caracterización molecular basada en el análisis de la secuencia del gen ADN<sub>r</sub> 16S**

Este tipo de identificación se realizó aislando y purificando el ADN total, seguido por la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del fragmento del gen ADN<sub>r</sub> 16S. La secuenciación y el análisis de las secuencias mediante el alineamiento y procesamiento de estas, permitieron establecer la filogenia de las bacterias RPA y SEHMA.

#### **5.1.1.2.1. Aislamiento, purificación y cuantificación del ADN total**

Para la extracción del ADN total microbiano se empleó el protocolo adaptado y modificado de Cullen y Hirsch (1998). El pellet para la extracción del ADN de la bacteria, se obtuvo a partir de 3 – 4 mL de cultivo crecido durante 16 horas en medio LBI 2%. La purificación se hizo de acuerdo a Knaebel y Crawford (1997). Para la observación del ADN total obtenido se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (agarosa ultrapure GIBCO BBL) en buffer TAE (Tris – Acetato -EDTA 1X). La cuantificación del ADN se efectuó mediante espectrofotometría.

#### **5.1.1.2.2. Prueba de reacción en cadena de la polimerasa –PCR- para la amplificación del gen ADN<sub>r</sub> 16S**

El fragmento del ADN<sub>r</sub> 16S se amplificó a partir del ADN total obtenido, mediante la técnica de PCR (Termociclador GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems) con los oligonucleótidos 8 FPL y 1492 RPL, previamente reportados (Relman, 1993). La mezcla de PCR contenía 2.5 U de ADN polimerasa (Platinum *Pfx* DNA polymerase), Buffer *Pfx* , 2.4 mM de DNTP's, 50 mM de MgSO<sub>4</sub> y 10 pmol de cada uno de los oligonucleótidos 8 FPL y 1492 RPL.

Después de 5 minutos a 94 °C la amplificación se efectuó en 35 ciclos que incluyeron 1 minuto de desnaturalización a 94 °C, 1 minuto de alineamiento de los oligonucleótidos a 55 °C y 2.3 minutos de extensión a 72 °C. La finalización de la amplificación se hizo en cuatro pasos que implicaron 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 55°C, 10 minutos a 72° C y 1 minuto o más a 4 °C. La purificación se efectuó con *QUIAQUICK PCR Purification Kit (QUIAGEN INC)* de acuerdo al protocolo descrito por el proveedor. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa con buffer TAE. El marcador de peso molecular empleado fue de 1Kb, de 14 fragmentos (MPM 1 Kb Gene Ruler ADN ladder FERMENTAS MBI).

#### **5.1.1.2.3. Secuenciación del fragmento del gen ADNr 16S**

El producto de PCR generado, correspondiente al tamaño esperado, fue secuenciado desde el extremo 5'. La secuenciación del amplificado fue realizada por el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México; con un secuenciador automático ABI Prism (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer PE, Applied Biosystems) utilizando 8 FPL como oligonucleótido.

#### **5.1.1.2.4. Alineamiento de secuencias, procesamiento y análisis filogenético**

Las secuencias del gen ADNr 16S de la cepas RPA y SEHMA se compararon individualmente con las secuencias existentes en las bases datos, mediante un análisis BLAST utilizándose el programa BLASTN (Altschul *et al.*, 1997) versión 2.2.3 del GenBank (National Center of Biotechnology information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Las secuencias resultantes a partir de ese análisis, junto con secuencias existentes en el GenBank de bacterias pertenecientes

al filum Firmicutes (Clases Bacilli y Clostridia) y al filum Proteobacteria (Clases  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  proteobacteria) fueron alineadas de forma múltiple usando el programa CLUSTAL\_X (Thompson *et al.*, 1997) versión 1.81. La descripción detallada de las secuencias empleadas se presenta a continuación:

Secuencias incorporadas en el alineamiento realizado junto con la secuencia de la cepa RPA:

1. *Escherichia coli* O157:H7 EDL933 serotipo O157:H7 (GenBank: AE005174.1) (Perna *et al.*, 2001)
2. *Alcaligenes* sp. NKNTAU (GB: U82826.1) (Denger *et al.*, 1997)
3. *Eubacterium limosum* PM31 (GB: AF064242.1) (Jansen y Hansen, 2001)
4. *Clostridium butyricum* IBUN 64A (GenBank: AJ289706.1) (Montoya *et al.*, 2001)
5. *Paenibacillus lautus* CCM 3892 (GenBank: D78472.1) (Shida *et al.*, datos no publicados)
6. *Bacillus thuringiensis* WS 2617 (GenBank: Z84594.1) (Lechner *et al.*, 1998)
7. *Bacillus mycoides* 2048 DSM (GenBank: X55061.1) (Ash *et al.*, 1991)
8. *Bacillus* sp. GCB-2 (GenBank: AJ000648.1) (Maas *et al.*, datos no publicados)
9. *Bacillus licheniformis* NCDO 1772 (GenBank: X60623.1) (Ash *et al.*, 1991)
10. *Bacillus* sp. Aislado de termita (GenBank: X81131.1) (Hutson *et al.*, datos no publicados)
11. Secuencia de la cepa RPA obtenida en este trabajo de investigación.

Secuencias incorporadas en el alineamiento realizado junto con la secuencia de la cepa SEHMA fueron:

1. *Ochrobactrum* sp. PR17 (GenBank: AF229848.1) (Reiter y Sessitsch, Datos no publicados)
2. *Sphingomonas* sp. ATCC 21423 (GenBank: AF503277.1) (Cleary *et al.*, Datos no publicados)

3. *Alcaligenes* sp. NKNTAU (GenBank: U82826.1) (Denger *et al.*, 1997)
4. *Burkholderia cepacia* PW3 (GenBank: AB091761.1) (El Sayed *et al.*, Datos no publicados)
5. *Desulfohalobacter vibrioforme* B54 (GenBank: U12254.1) (Lien y Beeder 1997)
6. *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* (GenBank: AF482990.1) (Khamessian *et al.*, Datos no publicados)
7. *Aeromonas* sp PG4-1 (GenBank: AB076859.1) (Khan *et al.*, 2002)
8. *Pseudomonas* sp. 5A (GenBank: AF411854.1) (Eckford *et al.*, Datos no publicados)
9. *Pseudomonas* sp. JPL-1 (GenBank: AY030314.1) (Satoh *et al.*, Datos no publicados)
10. *Pseudomonas stutzeri* ATCC 17682 (GenBank: AJ006107.2) (Sikorski *et al.*, Datos no publicados)
11. *Pseudomonas stutzeri* JJ (GenBank: AF411219.1) (Dijk *et al.*, Datos no publicados)
12. *Pseudomonas balearica* TG-3 (GenBank: AF054936.1) (Sorokin *et al.*, 1999)
13. *Pseudomonas putida* DLL-E4 (GenBank: AF447394.1) (Liu *et al.*, Datos no publicados)
14. Secuencia de la cepa SEHMA obtenida en este trabajo de investigación

La clasificación de bacterias utilizadas en la construcción de los árboles filogenéticos de las cepas de estudio se tomó del GenBank (National Center of Biotechnology information; (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?name=Eubacteria>) (Anexo B). La visualización de los tres tipos de árboles obtenidos se hizo con el programa TreeView (Page, 1996).

Después del alineamiento, las secuencias se revisaron manualmente con el fin de buscar las regiones homólogas dentro del gen y excluir los espacios o “gaps”. Se utilizaron los programas MEGA 2 (Kumar *et al.*, 2001) y DAMBE (Xia, 2000., Xia y Xie, 2001) para obtener el índice de transversiones y transiciones ( $R = S/V$ ) y el índice de frecuencia nucleotídica.

Posteriormente, utilizando el programa PHYLIP versión 3.5c (Felsenstein, 1993) se hizo la construcción de los árboles filogenéticos usando los métodos de distancia, parsimonia y máxima verosimilitud. Para obtener el árbol de distancia de las cepas bacterianas RPA y SEHMA, se empleó el modelo de Felsenstein (1984), se realizaron 100 remuestreos con reemplazo y se obtuvo un árbol consenso. Fueron utilizados los programas Seqboot (100 replicados en bootstrap), Neighbor (neighbor-joining) ADNDist y Consense. Los programas ADNpars y ADNmL se emplearon para la obtención de los árboles mediante los métodos de parsimonia y máxima verosimilitud, todos estos implementados en el programa PHYLIP.

### 5.1.2. Pruebas de biodegradación del IHAK a diferentes concentraciones

Este procedimiento se ejecutó con las dos cepas de estudio, la cepa RPA y la cepa SEHMA. Para la realización de las pruebas de biodegradación se consideró el medio MSM como medio de cultivo base para esta determinación. El medio de cultivo se complementó con dos concentraciones diferentes del IHAK: 1) 0.1%, correspondiente a 296 mg COT/L y 2) 0.5%, correspondiente a 1479 mg COT/L. La prueba se realizó por 7 días e incluyó seis controles: control de inóculo, control de procedimiento, control de remoción o degradación abiótica con y sin extracto de levadura (EL), control de adsorción con y sin EL. La descripción de los tratamientos y el contenido de los medios utilizados se amplía en la tabla 3.

TABLA 3. Composición de los medios de cultivo empleados en las pruebas de biodegradación.

Cepa Bacteriana	Matraz	Número de Matraz	Contenido				
			Inóculo	MSM	UJAX	EL	EL
RPA	Muestra sin EL	1	✓	✓	✓		
	Muestra con EL	2	✓	✓	✓	✓	
	Control de Inóculo	3	✓	✓			
	Control de procedimiento	4	✓	✓		✓	
	Control de adsorción sin EL	5	✓	✓	✓		✓
	Control de adsorción con EL	6	✓	✓	✓	✓	✓
	Control de Deg. Abiótica sin EL	7			✓		✓
	Control de Deg. Abiótica con EL	8			✓	✓	✓
SEHMA	Muestra sin EL	1	✓	✓	✓		
	Muestra con EL	2	✓	✓	✓	✓	
	Control de Inóculo	3	✓	✓			
	Control de procedimiento	4	✓	✓		✓	
	Control de adsorción sin EL	5	✓	✓	✓		✓
	Control de adsorción con EL	6	✓	✓	✓	✓	✓
	Control de Deg. Abiótica sin EL	7			✓		✓
	Control de Deg. Abiótica con EL	8			✓	✓	✓

### 5.1.2.1. Estandarización de inóculos y procesamiento de muestras experimentales

Para la estandarización de los inóculos de cada una de las cepas bacterianas se consideró el procedimiento empleado en las pruebas preliminares, sin embargo, el inóculo a emplearse en la prueba de biodegradación se ajustó a una concentración bacteriana de  $1 \times 10^8$  UFC/mL.

La toma de muestras durante la prueba de biodegradación llevada a cabo durante 7 días, se realizó a los días 0, 3 y 7 del experimento. El manejo de las muestras para el análisis de COT se realizó de acuerdo con los métodos estandarizados, sección 5310 B (Clasceri *et al.*, 2000). Las muestras se filtraron por una membrana de polipropileno con un tamaño de poro de  $0.45 \mu\text{m}$ , se

conservaron con ácido fosfórico 1/20 y posteriormente, se refrigeraron hasta el momento de la lectura. El COT se midió en un aparato TOC 5050 Total Organic Carbon Analyzer Shimadzu, con un ASI-5000 A Autosampler Shimadzu.

### 5.1.2.2. Análisis y procesamiento de los datos

El análisis de los datos experimentales se realizó mediante un análisis de varianza factorial ANOVA II (SAS for Windows Version 8.2, SAS Institute Inc. Cary, NC, EUA). Se emplearon las pruebas múltiples de medias de Duncan y Tukey con un  $\alpha = 0.05$ . La variable dependiente correspondió a los datos de COT. Las pruebas se realizaron entre grupos (0.1% y 0.5%), entre cepas (RPA y SEHMA), entre cada uno de los tratamientos o matraces empleados (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8) y entre cada uno de los tiempos de muestreo (1, 3 y 7).

---

## 5.2. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 5.2.1. Identificación de las cepas de estudio

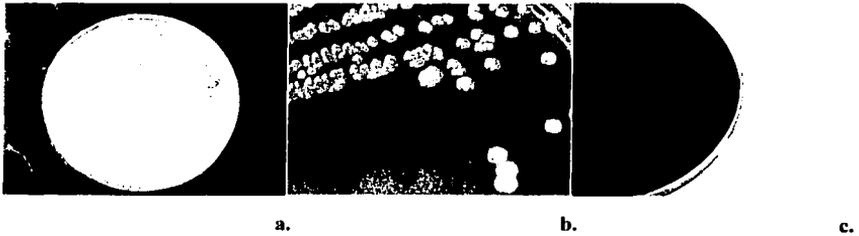
#### 5.2.1.1. Caracterización fenotípica

La cepa aislada previamente a partir de RP y seleccionada bajo los criterios aplicados previamente en el capítulo 4, denominada cepa RPA, corresponde a una bacteria Gram-positiva, con forma bacilar (Fig. 11), cuyo crecimiento en agar TSA permitió reconocer la formación de colonias blancas, opacas con forma irregular. Mediante la determinación de características fenotípicas (Anexo B), se estableció que dicha cepa bacteriana pertenece a la especie *Bacillus licheniformis* (Gordon *et al.*, 1973; Murray *et al.*, 1984; Barrow y Feltman, 1993). El crecimiento de la cepa en medio sólido (Fig. 9), es típico para este tipo de bacteria.

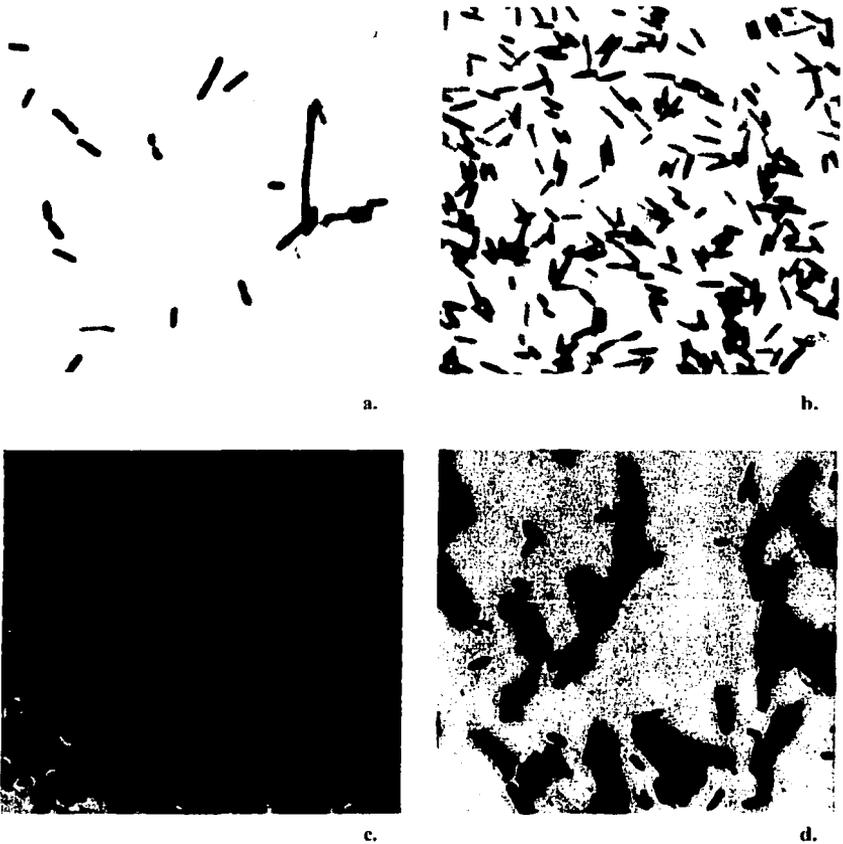
Por otra parte, la identificación preliminar de la cepa aislada de SEH, denominada como cepa SEHMA, se efectuó mediante la determinación de las características fenotípicas (Anexo B) con las cuales, se pudo definir a la cepa dentro del grupo de bacilos Gram-negativos, móviles, no fermentadores, oxidasa y catalasa positivos (Barrow *et al.*, 1993), (Fig. 10 y 11). Este grupo de bacterias incluyen géneros como *Alcaligenes*, *Shewanella*, *Pseudomonas* (productoras de álcali). A partir de este resultado se realizaron las pruebas comerciales de identificación API20 E ® (BioMérieux) y Crystal ® (BBL) mediante las cuales no se pudo identificar adecuadamente a la cepa bacteriana SEHMA debido a que la aproximación que ejecutó el programa integrado a estos sistemas, definió a esta bacteria como *Ochrobactrum anthropi* y *Shewanella putrefaciens* contando con menos del 80 % de confianza en el resultado.



**Figura 9.** Cepa bacteriana RPA. a) crecimiento en placa en medio TSA. b) acercamiento de la colonia. c) crecimiento en agar sangre.



**Figura 10.** Cepa bacteriana SEIIMA. a) crecimiento en placa en medio TSA. b) acercamiento de la colonia. c) crecimiento en agar sangre.

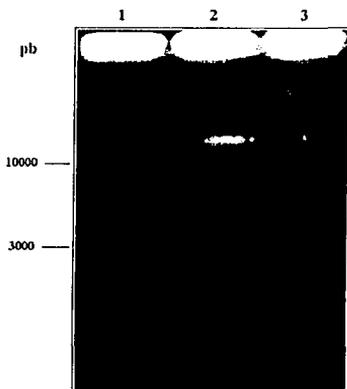


**Figura 11.** Fotografías de las cepas bacterianas RPA y SEHMA con tinción de Gram al microscópio (100X). a) Cepa RPA, Bacilo Gram-positivo. b) Cepa SEHMA, Bacilo Gram-negativo. c) Cepa RPA esporulada (espora central, elipsoidal). d) Mezcla de las Cepas RPA y SEHMA.

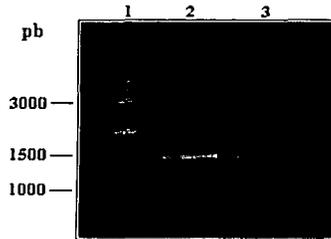
### 5.2.1.2. Caracterización molecular basada en el análisis de la secuencia del gen ADNr 16S

#### 5.2.1.2.1. Amplificación y secuenciación del gen ADN 16S

El ADN total de las cepas bacterianas RPA y SEHMA, fue aislado, purificado y cuantificado. La observación del ADN total obtenido se efectuó con una electroforesis en gel de agarosa al 1% (Fig. 12). A partir del ADN total obtenido de cada cepa bacteriana, se amplificó el fragmento del gen ADNr 16S con los oligonucleótidos 8 FPL y 1492 RPL. Posterior a su purificación el fragmento se visualizó en el gel de agarosa al 1% (Fig. 13). El producto de PCR de las cepas bacterianas RPA y SEHMA correspondieron al tamaño esperado (1542 pb)



**Figura 12.** ADN total extraído de las cepas bacterianas RPA y SEHMA. Pozos: 1, MPM (Gene-Ruler 1 Kb DNA ladder FERMENTAS MBI); 2, ADN total obtenido de la bacteria SEHMA; 3, ADN total obtenido de la bacteria RPA



**Figura 13.** Gen ADN<sub>r</sub> 16S amplificado mediante PCR obtenido a partir del ADN total de las cepas RPA y SEHMA. Pozos: 1, MPM (Gene-Ruler 1 Kb DNA ladder FERMENTAS MBI); 2, ADN<sub>r</sub> 16S amplificado, obtenido de la cepa RPA; 3, ADN<sub>r</sub> 16S amplificado, obtenido de la cepa SEHMA.

Con el procedimiento de secuenciación empleado, se obtuvo para la cepa RPA, una secuencia de 999 nucleótidos (Fig. 14.a.) cuya composición corresponde a: 248 (25%) A; 224 (22%) C; 307 (31%) G; 187 (19%) T; 33 (3%) N. Porcentaje G + C: 53%. Para la cepa bacteriana SEHMA, la secuencia obtenida fue de 1007 nucleótidos (Figura 14.b.) y su composición corresponde a: 251 (25%) A; 215 (21%) C; 292 (29%) G; 198 (20%) T; 51 (5%) N. Porcentaje G + C: 50% Para los análisis filogenéticos se trabajó con una secuencia de 986 de la cepa RPA y una secuencia de 1005 nucleótidos de la cepa SEHMA.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1	CNNNCAACGA	ACGCTGCCGC	CCTCCCTAAT	ACATGCAAGT	CGACGGGACC	GACGGGAGCT
61	TGCTCCCTTA	GGTCAGCGGC	GGAGCGGTGA	GTAACACGTG	GGTAACCTGC	CTGTAAAGCT
121	GGGATAACTC	CGGGAACCG	GGGTAAATAC	CGGATCGTIG	ATTGCAACCG	ATGGTCTAAT
181	CATAAAAAGT	GGCTTTTAGC	TACCACCTAC	ASATGGAUCC	CGGGCGGATT	AGCTGTTGG
241	TCAGGTAAGC	GCTCACCAG	GGCAGCATGC	GTAGCGGACC	TGAGAGGGTG	ATCGGGCA
301	CTGGCACTGA	GACACGGCCC	AGACTCTTAC	GGGAGCGAGC	AGTAGGGAAT	CTTCCGCAAT
361	GGACGAAGT	CTGACGGAC	AACCGCCCT	GAGTGTAA	CGTTTCCGA	TCTTAAAACT
421	CTGTTGTTAG	GGAAAGAAA	GTAACCTTGC	AATAGGGCG	GACCTTGAGC	CTACTTAACC
481	ACAAAGCCAC	GGCTAACTAC	GTCGCCAGC	CGCGGGTAAT	AGCTAGTGG	CAAGGGTGT
541	CGCGAAATTA	TGGCGGTAAA	CGCGCCCGAC	CGCGTTCCT	AAGTCTGATG	TGAAGCGCC
601	CGGCTCAACC	GGGGAGCGGT	CATTGGAAAC	TGGGGAACTT	GAGTCACAAA	AAGGAGAGCT
661	GAATTCACCC	TGTACCGGTG	AAATCGGTAN	AGATCTGGAG	GAACACCAGT	CGGGAAAGCC
721	GACTCTCTGC	TCTGTAAC	ACGGTCAGGC	GCCAAAGCGT	GGGGAGCGAA	GAGGATTA
781	TACCTCGCTA	CTCCACGGCC	TAAACGATAG	TGCTAGTGT	AAAGGGTTC	CGCCTTANT
841	CGTGCACGAA	CGCATNAGCA	TNCGCCTGGG	GANNCGTGN	CAGACTGAAA	CTCAAGGAAT
901	TCACGGCGGC	CNCNCAACNG	NGGNACATGG	GGTTNANTTC	AANCACNCGA	AAANCTTACA
961	GGHNTGAA	TCTTNNHANC	CTAANAHAGC	GNHCGMTC		

a)

1	CNNNCAATGT	NHNGACTGAG	CGGGCAGCCC	CTNAACACAT	GCCAAAGCTC	GAGTGGCA
61	GTNGTGGTCC	TTCNCGCAT	CGCGGCNCA	CGHGAAGAC	GTGTCTAGC	TAATCGCTAG
121	GCAATNTGNC	TGGCTCACTG	CGCGGTATA	GACTNCGGTG	GNAACACTGC	AAGGCATAT
181	ACCGCATAC	GTGCTAGCG	GTAGAAAGCG	GGGGATCTT	CGGACTCGC	CTACACAGAT
241	GAGCCTAGCT	CGGATTAGCT	AGTGGGTAG	GTAAAGCTC	ACCAAGCGGA	CGATCGCTAG
301	CTGGTCTGAC	AGGATGATCA	GCCACTCTG	AAGTGAGCA	CGGTCCAGC	TCTACCGGA
361	GGCAGCAGTG	GGGAATATG	GACAATGGCG	GAAAGCCTGA	TCCACCATG	CGGGTGTGT
421	GAACAGAGCT	TTCGGATTG	AAAGCACTTT	AAGTGGGAG	GAAGGGCAGT	AAGCTAATAC
481	CTTGCCTGTT	TGACCTTACC	CACAGAATAA	GCACCGGCTA	ACTTCTGGC	ACGAGCGCG
541	GTAATACGAA	GGGTGCAACG	GTTAATCGGA	ATTACTGGCC	GTAAGCGCCG	CGTAGGTGCT
601	TTGATAACTT	GGATGTGAAA	CGCCCGGGCT	CAACTTGGA	ATTGCATCCA	AAACTGTCTG
661	ACTAGAGTAT	GGCAGAGGGT	GGTGGAAAT	CTGTCTAGC	GGTGAAATCC	GTANATATAG
721	GAAGGAACAC	CAGTGGCGAA	GGCGACACCC	TGGGCTAATA	CTGACACTGA	GGTGCNAAAG
781	CGTGGCGGAC	GAAACAGAT	TAGATACCT	GGTAGCTCAC	CGCCGTAACCA	GTCNACTAN
841	CGGTTGGGAT	CCTTGAATC	TTAHGGGGC	ACTATAGHNT	TAANTHACG	CGTGGGGCT
901	ACNCGCNHAG	GNTAJAACNA	AAHAAATGAC	GGGNCNCCN	CAANNCGGN	NHNTGNMNT
961	NATTCAAHNA	NCGHAAACCC	TTACNCGGNT	TNAHNGGAAA	AAATTHN	

b)

Figura 14. Secuencia del fragmento del gen ADNr 16S de las cepas: a) RPA y b) SEHMA.

### 5.2.1.2.2. Alineamiento de secuencias, procesamiento y análisis filogenético

La comparación de la secuencia de la cepa RPA (999 pb) mediante un análisis BLAST empleándose el programa BLASTN demostró la estrecha relación entre la secuencia de esta cepa bacteriana con miembros del género *Bacillus*, en particular con *Bacillus licheniformis*. En el caso de la comparación de la secuencia de la cepa SEHMA (1007 pb) mediante el mismo análisis, se

demonstró la estrecha relación de la secuencia de esta bacteria con miembros de la familia Pseudomonadaceae, en particular con el grupo de *Pseudomonas stutzeri*. Después del alineamiento y la revisión manual se estableció una longitud de secuencia para la cepa RPA de 986 nucleótidos y de 1005 nucleótidos para la cepa SEHMA.

Mediante el programa PHYLIP versión 3.5c (Felsenstein, 1993) se realizó la construcción de los árboles filogenéticos usando los métodos de distancia (Fig. 15 y 18), parsimonia (Fig. 16 y 19) y máxima verosimilitud (Fig. 17 y 20) para las dos bacterias de manera independiente.

Los tres árboles obtenidos por los diferentes métodos para cada una de las cepas bacterianas, tienen una topología similar. En cada caso este resultado demuestra que los tres árboles no son excluyentes entre sí sino que son comparativos y conclusivos en cuanto a la estrecha relación entre estas cepas y las resultantes luego de la comparación. Esto permite afirmar que de acuerdo a la secuencia del gen ADNr 16S, las dos cepas bacterianas, cepa RPA y SEHMA, son filogenéticamente cercanas a la especie *Bacillus licheniformis* (GenBank accesión no. AY436611; unpublished data) y a la especie *Pseudomonas stutzeri* (GenBank accesión no. AY436612; unpublished data) respectivamente.

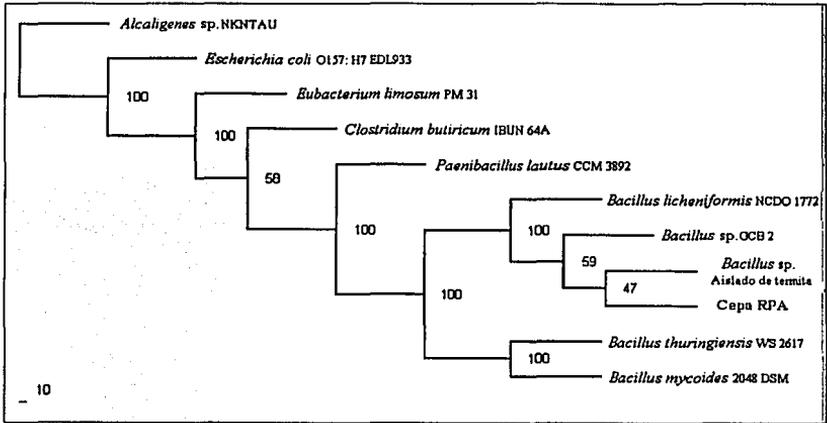


Figura 15. Árbol filogenético obtenido por el método de distancia para la cepa RPA

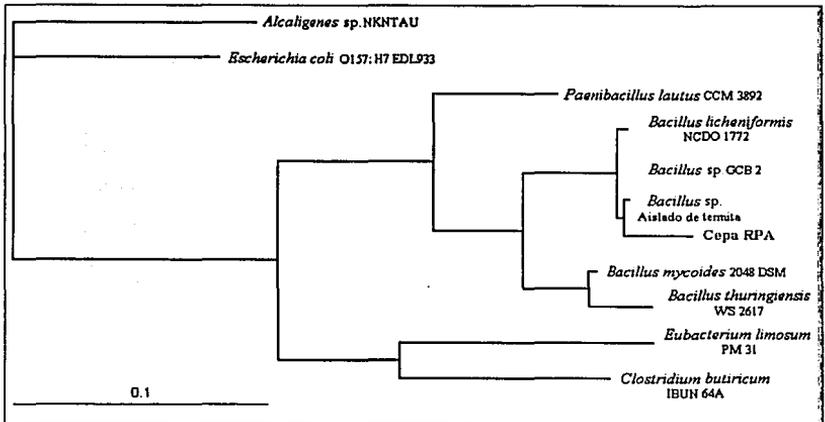


Figura 16. Árbol filogenético obtenido por el método de parsimonia para la cepa RPA

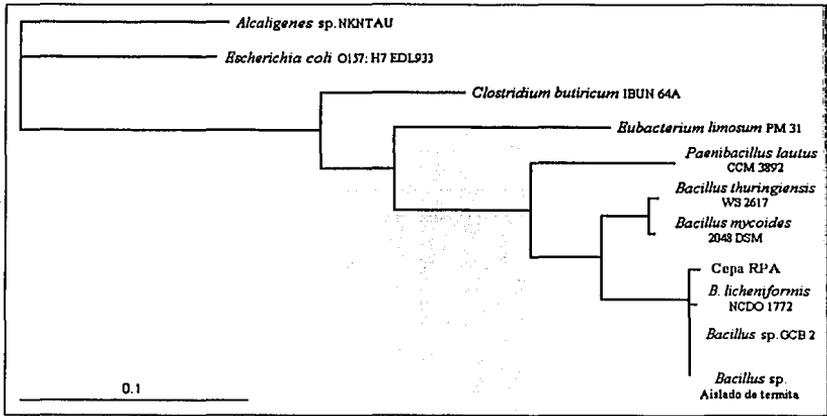


Figura 17. Árbol filogenético obtenido por el método de máximo verosimilitud para la cepa RPA

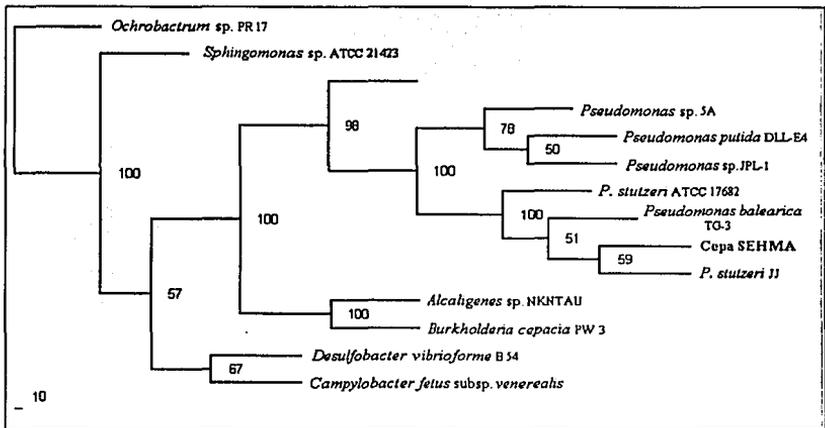


Figura 18. Árbol filogenético obtenido por el método de distancia para la cepa SEHMA

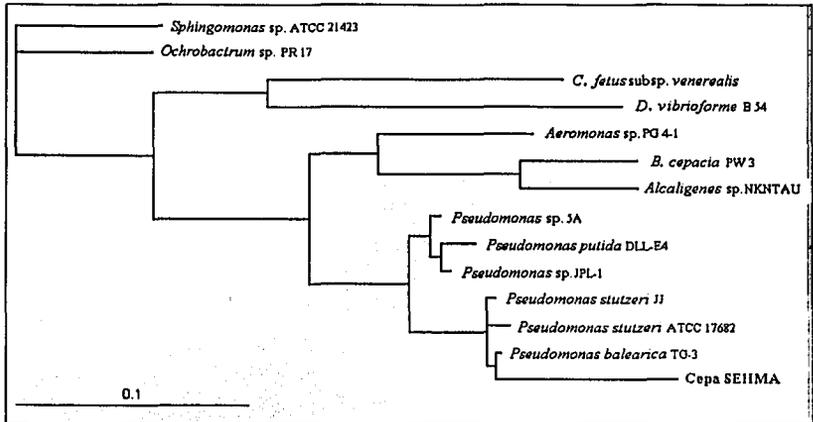


Figura 19. Árbol filogenético obtenido por el método de parsimonia para la cepa SEHMA

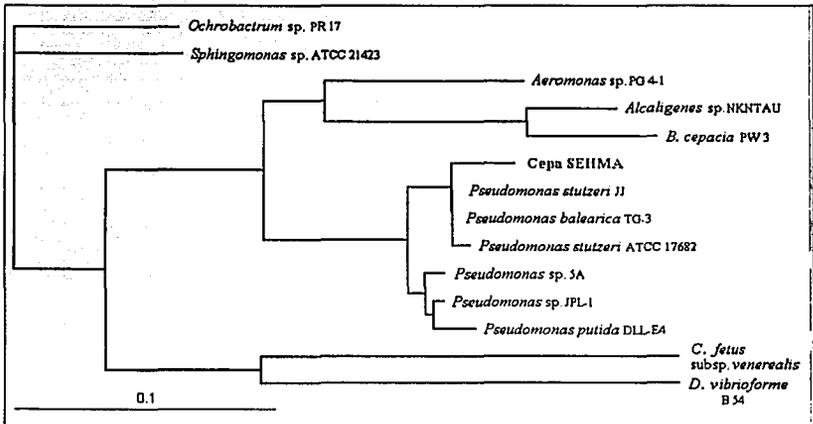


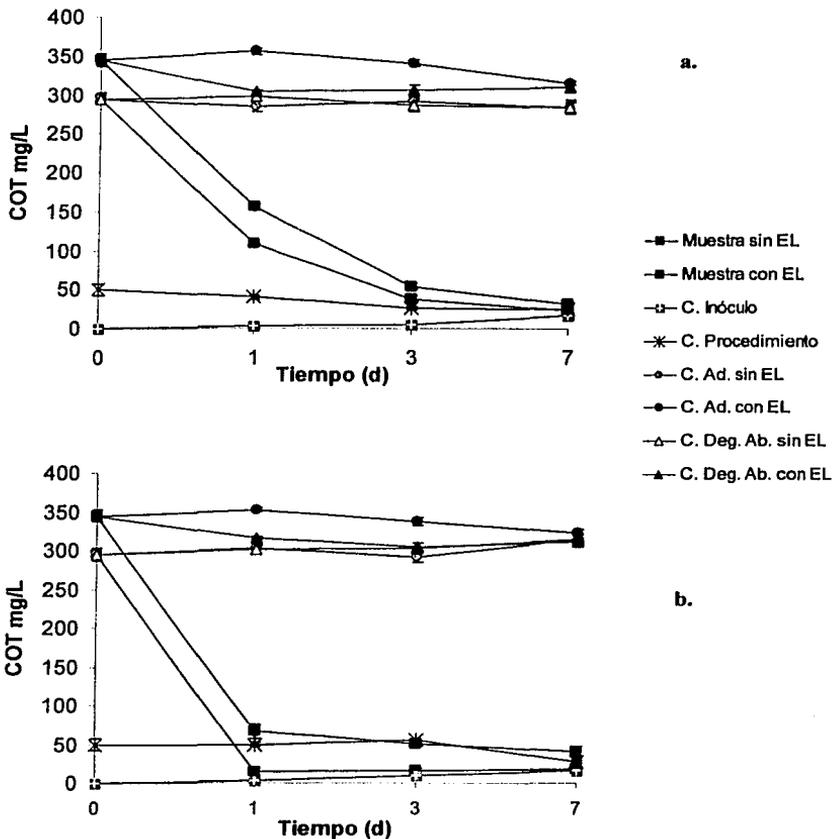
Figura 20. Árbol filogenético obtenido por el método de máximo verosimilitud para la cepa SEHMA

### 5.2.2. Pruebas de biodegradación del IHAK a diferentes concentraciones

Las pruebas de biodegradación con el IHAK al 0.1% (296 mg COT/L) y al 0.5% (1479 mg COT/L), llevadas a cabo durante 7 días con las cepas bacterianas RPA y SEHMA, generaron los resultados de COT representados en las figuras 21 y 22, en las que se grafican las muestras y los respectivos controles de cada tratamiento. En la figura 21, los puntos correspondientes a los tratamientos con extracto de levadura (EL) tienen una contribución de 45 mg/L de COT. En la figura 22, los puntos correspondientes a los tratamientos con EL, presentan una contribución de 200.5 mg/L de COT.

Durante estas pruebas de biodegradación, se obtuvieron valores importantes en cuanto a la remoción del carbono presente en los tratamientos de prueba, tanto en el caso del IHAK como única fuente de carbono o como fuente de carbono adicional. Al respecto, en la prueba con el IHAK al 0.1% (296 mg COT/L) la cepa bacteriana RPA utilizó 296 mg COT/L correspondiente a 100% en la muestra con el IHAK como única fuente de carbono y 249 mg COT/L correspondiente al 72% en la muestra complementada con EL, como fuente de carbono adicional. La cepa bacteriana SEHMA utilizó 249 mg COT/L correspondiente al 84% en la muestra con el IHAK como única fuente de carbono y 245 mg COT/L correspondiente al 71% en la muestra complementada con EL, como fuente de carbono adicional. Asimismo, en la prueba con el IHAK al 0.5% (1479 mg COT/L), la cepa RPA utilizó 328 mg COT/L correspondiente a 22% en la muestra con el IHAK como única fuente de carbono y 80 mg COT/L correspondiente al 5% en la muestra complementada con EL, como fuente de carbono adicional. La cepa SEHMA utilizó 374 mg COT/L correspondiente al 25% en la muestra con el IHAK como única fuente de carbono

y 1692 mg COT/L correspondiente al 100% en la muestra complementada con EL, como fuente de carbono adicional.



**Figura 21.** Degradación del IHAK al 0.1% (295.8 mg COT/L) de la cepa RPA (a) y SEHMA (b) con respecto al tiempo.

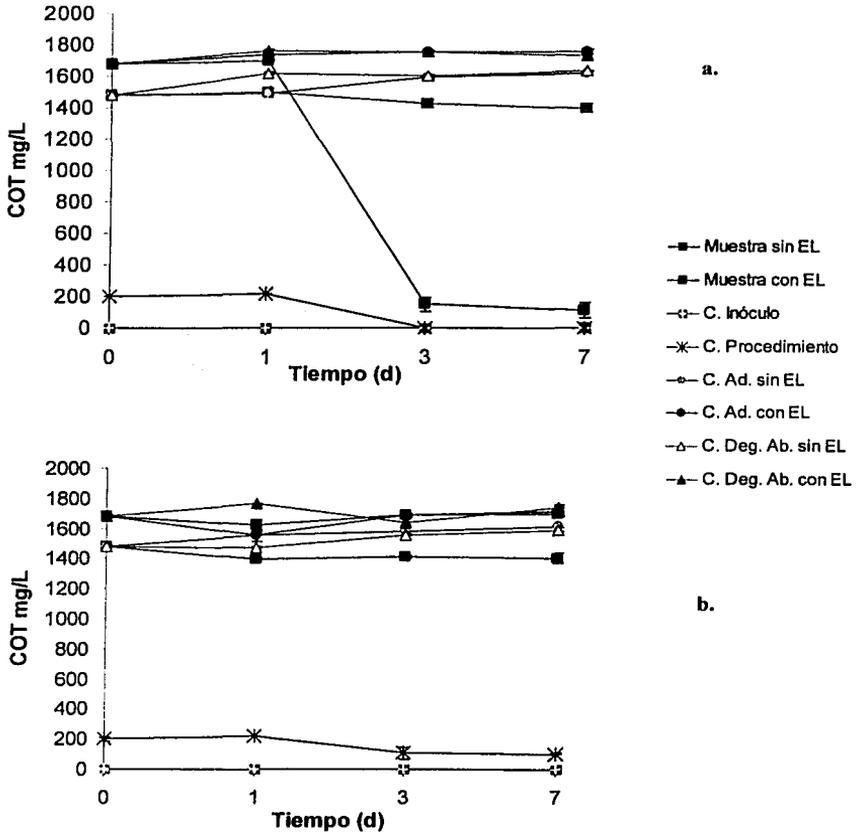


Figura 22. Degradación del IHAK al 0.5% (1479 mg COT/L) de la cepa RPA (a) y SEHMA (b) con respecto al tiempo

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

---

La adición de extracto de levadura como fuente de carbono adicional al IHAK, influyó positivamente en la degradación del IHAK al 0.5% (1479 mg COT/L) por la cepa SEHMA, con una remoción del 100% (1692 mg COT/L) y en la degradación del IHAK al 2%, realizada previamente, por la cepa RPA, con una remoción del 10% (570 mg COT/L), sin embargo la adición de esta fuente de carbono no fue determinante para los demás tratamientos ya que los valores de degradación con el IHAK como única fuente de carbono fueron mayores.

A partir de los datos de COT obtenidos en la prueba de biodegradación durante 7 días (0.1% y 0.5% del IHAK) y posterior a la aplicación del ANOVA con las pruebas de medias múltiples de Duncan y Tukey con un  $\alpha = 0.05$  (Anexo C), fue posible demostrar que existe una diferencia significativa ( $P < 0.001$ ) en cuanto a la concentración del IHAK (0.1 y 0.5%) y el tipo de cepa empleada en la degradación del inhibidor (RPA y SEHMA). Las pruebas estadísticas realizadas a los diferentes tratamientos, generaron seis grupos distintos con una diferencia significativa ( $P < 0.001$ ) entre cada uno de ellos. Los grupos de tratamientos correspondieron a: grupo A (8 y 6), grupo B (7 y 5), grupo C (1), grupo D (2), grupo E (4) y grupo F (3). En cuanto al tiempo, mediante las dos pruebas, se agruparon el tiempo 1 en un grupo y el tiempo 3 y 7 en otro, denotando una diferencia significativa ( $P < 0.001$ ) entre el primer día de muestreo y el día 3 y 7, respectivamente. La agrupación de estos últimos corresponde a la falta de diferencia significativa entre estos tiempos.

Para determinar la velocidad de degradación del IHAK, los resultados obtenidos en las pruebas de biodegradación, se trataron como una cinética de primer orden, considerando que la velocidad

de formación de los productos resultantes de la degradación, es directamente proporcional a la concentración del sustrato. Se calculó la constante  $k$  de la tasa de biodegradación, como la pendiente de la curva al representar gráficamente  $\ln C_0/C$  vs  $t$ , y finalmente, se halló el tiempo necesario para biodegradar el 50% del IHAK en cada caso. La aplicación del modelo de biodegradación de primer orden se realizó sobre los datos puntuales de las rectas graficadas (figuras 21 y 22), en los que se observa una disminución del IHAK de manera lineal, específicamente en los intervalos de tiempo del día 0 al 1 con las bacterias RPA y SEHMA con el IHAK al 0.1%, del día 0 al 1 con la bacteria RPA y el IHAK al 0.5% y del día 1 al 3 con la bacteria SEHMA y el IHAK al 0.5%.

Para la cinética de primer orden:  $C = C_0 e^{-kt}$  se empleó la ecuación con la expresión lineal:

$$\ln \frac{C_0}{C} = \frac{\mu_{\max} B_0}{Y} t = kt$$

Al representar gráficamente esta función, según los datos obtenidos en las pruebas de biodegradación con el IHAK al 0.1 y 0.5%, se obtuvo  $k$ . Posteriormente conforme a la ecuación:

$$t = -\frac{1}{k} \ln \frac{C_0}{C}$$

Se determinó el tiempo necesario para degradar el 50% del IHAK inicialmente presente para cada caso. Los resultados obtenidos a partir de esta aproximación empírica, se describen en la tabla 4, donde se presentan los datos de manera decreciente en cuanto a la velocidad de degradación del IHAK.

TABLA 4. Velocidades de degradación del IHAK

Cepa Bacteriana	RPA	RPA	SEHMA	SEHMA	SEHMA	RPA	RPA	SEHMA
Concentración del IHAK	0.1%	0.1%	0.5%	0.1%	0.1%	0.5%	0.5%	0.5%
Extracto de levadura	sin	con	con	sin	con	sin	con	sin
Intervalo de tiempo	0-1	0-1	1-3	0-1	0-1	0-1	0-1	1-3
Valor de k	3.04	1.63	1.2	1	0.79	0.06	0.03	0.02
R <sup>2</sup> de la recta	1	1	1	1	1	1	1	1
mg COT/L inicial	295	345	1680	295	345	1479	1680	1479
Tiempo (días) para degradar el 50% del IHAK	0.23	0.43	0.58	0.69	0.88	11.55	23.10	34.6574
Tiempo (horas) para degradar el 50% del IHAK	5.5	10.2	13.9	16.6	21.1	277.3	554.5	831.8

### 5.2.3. Análisis integral de los resultados

Uno de los aspectos más importantes en la microbiología ambiental es el análisis de la estructura de las comunidades microbianas y por ende la identificación de los microorganismos que las componen. En el caso de los procesos de biodegradación, el conocimiento de las especies implicadas, así como el estudio de su capacidad metabólica y la respuesta que puedan tener ante los cambios en las condiciones ambientales, permite explorar el potencial de estos microorganismos, sobre la degradación de diversos compuestos, entre estos, compuestos tales como los inhibidores de hidratación de arcillas, específicamente en este caso, el inhibidor de hidratación de arcillas tipo K, presente en los fluidos de perforación utilizados en campos petroleros Mexicanos.

Considerando los resultados obtenidos a partir de la caracterización fenotípica y molecular empleando el gen ADNr 16S, se demuestra que existe una gran similitud de la cepa bacteriana

---

RPA con el género *Bacillus* particularmente con la especie *B. licheniformis* y de la cepa SEHMA con el género *Pseudomonas*, específicamente con especies del grupo de *P. stutzeri*. Es importante anotar que los dos microorganismos son reportados y relacionados con capacidades metabólicas para degradar diferentes compuestos en el ambiente.

Existen cepas de *B. licheniformis* no patógenas para el hombre y están distribuidas ampliamente en el medio ambiente (De Boer *et al.*, 1994). El hábitat típico de esta bacteria Gram-positiva es el suelo, especialmente los suelos pobres en nutrientes tales como los páramos y los desiertos (De Boer *et al.*, 1994). *Bacillus licheniformis* ha sido reportado como un microorganismo involucrado en la reducción de nitrógeno generando poli-amino ácidos (Pötter *et al.*, 2001) como el ácido poli gamma-glutámico (Hoppensack *et al.*, 2003), en la degradación de nitro-aromáticos explosivos como el 5-nitro-1,2,4-triazol-3-one (NTO) (Le Champion *et al.*, 1999), en la degradación de queratina (Rozs *et al.*, 2001), en la producción de biosurfactantes (Thaniyavarn *et al.*, 2003) y en general, esta involucrado con la producción de enzimas tales como queratinasas (Wang y Shih, 1999), proteasas (Raninger y Steiner, 2003) y alfa-amilasas (Ikram-ul-Haq *et al.*, 2003) entre otras.

*Pseudomonas stutzeri*, por otro lado, es una gamma proteobacteria, distribuida ampliamente como una especie de *Pseudomonas* no fluorescente (Ginard *et al.*, 1997). Se ha aislado frecuentemente, de heces de vertebrados no humanos, químicos para elaborar papel, agua potable y el medio ambiente (Sikorski *et al.*, 2002). En general, el género *Pseudomonas* ha sido estudiado de manera sobresaliente debido a la habilidad de sus especies para metabolizar diversidad de

compuestos. Específicamente, *Pseudomonas stutzeri* se reporta ampliamente como un microorganismo versátil en cuanto a su metabolismo, incluida la capacidad de llevar a cabo procesos de nitrificación y desnitrificación (Sikorsky *et al.*, 2002) y la degradación de diversos contaminantes ambientales (Rius *et al.*, 2001), tales como tetracloruro de carbono (Parales *et al.*, 2002), fenantreno (Grimberg *et al.*, 1996), tricloro etileno, dicloro etileno, cloroformo (Chauhan *et al.*, 1998) *o*-xileno (Baggi *et al.*, 1987) y naftaleno (Rosselló-Mora *et al.*, 1994), entre otros.

Con relación a los resultados obtenidos en las pruebas de biodegradación del IHAK, las cepas seleccionadas en este estudio, bajo condiciones experimentales particulares, lograron un 100% de remoción del IHAK medido en términos de mg COT/L. En el caso de *Bacillus licheniformis* cepa RPA, la degradación del IHAK fue del 100% como única fuente de carbono, al 0.1% (296 mg COT/L). De igual forma, *Pseudomonas stutzeri* cepa SEHMA, degradó el 100% del IHAK al 0.5% (1479 mg COT/L), en la muestra complementada con EL como fuente de carbono adicional. En cuanto a la velocidad de degradación del IHAK, *Bacillus licheniformis* cepa RPA, degradó el 50% del IHAK como única fuente de carbono, al 0.1%, en 5.47 horas y en 10.20 horas en la muestra complementada con EL. En el caso de *Pseudomonas stutzeri* cepa SEHMA, esta cepa bacteriana, degradó el 50% del IHAK empleándolo como única fuente de carbono, al 0.5% en 16.63 horas y en 21.05 horas en la muestra complementada con EL. De igual manera, esta cepa bacteriana, degradó el 50% del IHAK al 0.1% a las 13.86 horas en la muestra complementada con EL. Estos resultados difieren de los resultados presentados en estudios previos, en donde se emplearon exclusivamente consorcios bacterianos y/o concentraciones inferiores del IHAK (Ruiz-Sánchez, 2001 y Ambriz, 2001). Por ejemplo, Ambriz, reporta datos que al analizarse según las velocidades de degradación, representan una velocidad de degradación

empleando tres tipos diferentes de consorcios, de  $14.32 \pm 2$  horas con una concentración inicial del IHAK de 170 mg COD/mL

Domínguez y Luna-Pabello (2001), reportan que el IHAK corresponde a una posible mezcla de compuestos orgánicos e inorgánicos con grupos funcionales del tipo amino, amina secundaria, hidrocarburos aromáticos y saturados de cadena pequeña. Adicionalmente, Rodiles (2001), reporta que el IHAK es un premutágeno, que al tratarse con enzimas microsomales, induce mutación de bases y mutaciones por corrimiento de fase tanto por delección como por adición. Considerando esto, es importante destacar que *Bacillus licheniformis* cepa RPA y *Pseudomonas stutzeri* cepa SEHMA, cuentan con la capacidad enzimática para degradar el IHAK a pesar de sus características premutagénicas y antimicrobianas, y que dicha capacidad para biodegradar el IHAK a diferentes concentraciones, se realiza de manera aparentemente eficiente, con una velocidad y porcentaje de degradación mayor a lo reportando por Ruiz-Sánchez, 2001 y Ambriz, 2001.

Teniendo en cuenta lo anterior, puede afirmarse que el procedimiento utilizado para el aislamiento de la comunidad bacteriana en general, así como el procedimiento para la selección de *Bacillus licheniformis* cepa RPA y *Pseudomonas stutzeri* cepa SEHMA, fueron eficaces según los resultados obtenidos. De igual manera, las metodologías utilizadas para la identificación fenotípica y genotípica de bacterias, incluyendo la filogenia realizada con el análisis y la comparación de las secuencias resultantes.

Es importante resaltar que este estudio es pionero en cuanto a la biodegradación del IHAK por cultivos puros, y los resultados de velocidad y porcentaje de degradación obtenidos, hacen recomendable el trabajo con ambas cepas con el fin de obtener de las mismas, su perfil genético enzimático y metabólico, asociado con la degradación de este tipo de compuestos o compuestos similares.

Adicionalmente se puede aprovechar, que dichas cepas bacterianas se encuentran caracterizadas con el fin de utilizarlas como modelo de estudio en cuanto a su fisiología, particularmente, los factores que controlan su crecimiento, su actividad en ambientes contaminados y sus reacciones específicas en el proceso de biodegradación. Asimismo, dichas cepas, podrían evaluarse a manera de consorcio junto con otras, para establecer las interacciones microbianas derivadas a partir de su crecimiento y/o su capacidad de biodegradación. Del mismo modo, debido a que muchos de los genes que intervienen en la degradación de compuestos ambientales se encuentran en ADN de tipo plasmídico, estas cepas bacterianas podrían emplearse para determinar la relación entre la presencia de este tipo de material extracromosomal y la degradación del IHAK o alguno de sus componentes y/o compuestos similares.

Cabe mencionar que desafortunadamente en la práctica, mucha de la información requerida para la implementación de tecnologías tales como la biorremediación, no está disponible fácilmente y el uso de los microorganismos en dichos procesos esta basado en su mayoría en experiencias empíricas más que en el conocimiento (Lovley, 2003). Por consiguiente, los resultados obtenidos en este estudio, aportan una noción básica, no obstante, de gran importancia, en cuanto a la posible aplicación de estos microorganismos, sus genes o enzimas en tecnologías tales como la

---

biorremediación, con el fin de mitigar la problemática generada a partir del manejo y disposición final de los FP y RP que a nivel nacional, representan el 72% del volumen total de los residuos peligrosos generados en las operaciones que realiza Petróleos de México

“Si se pudiera desarrollar modelos comparables para predecir la actividad de los microorganismos durante la bioremediación, hoy en día, la implementación de este tipo de estrategias podría ser mucho más fácil” Derek R. Lovley,

### 5.3. Conclusiones parciales

- La cepa RPA fue caracterizada fenotípicamente, como *Bacillus licheniformis*
- La cepa SEHMA fue caracterizada fenotípicamente de manera parcial dentro grupo de bacilos Gram negativos, móviles, no fermentadores, oxidasa y catalasa positivos.
- La secuencia de 999 nucleótidos de la cepa RPA con un porcentaje de G + C del 53% y la secuencia de 1007 nucleótidos de la cepa SEHMA, con un porcentaje de G + C del 50%, demuestran que los árboles filogenéticos obtenidos con los métodos de distancia, parsimonia y máxima verosimilitud, presentan una topología similar no excluyente sino comparativa y conclusiva en cuanto a la identificación genotípica mediante el análisis del gen ribosomal 16S.
- Los análisis del gen ADNr 16S resultaron en la identificación de las cepas seleccionadas como especies filogenéticamente cercanas a especies del género *Bacillus* y *Pseudomonas*, específicamente, a *Bacillus licheniformis* en el caso de la cepa RPA y *Pseudomonas stutzeri* en el caso de la cepa SEHMA

- *Bacillus licheniformis* cepa RPA, obtuvo la mayor degradación del IHAK al 0.1%, correspondiente a 296 mg COT/L (100% de remoción) como única fuente de carbono y al 2%, correspondiente a 570 mg COT/L (9.6%)
- *Pseudomonas stutzeri* cepa SEHMA, obtuvo la mayor degradación del IHAK al 0.5%, correspondiente a 1692 mg COT/L (100%) utilizándolo como fuente de carbono adicional con el extracto de levadura.
- Con respecto a la velocidad en la que se llevó a cabo la degradación del IHAK, *Bacillus licheniformis* cepa RPA, degradó el 50% del IHAK al 0.1%, a la 5.47 horas como única fuente de carbono y a las 10.20 horas en la muestra complementada con extracto de levadura. *Pseudomonas stutzeri* cepa SEHMA, degradó el 50% del IHAK al 0.1% a las 16.63 horas como única fuente de carbono y a las 21.05 horas en la muestra complementada con extracto de levadura. Asimismo, *Pseudomonas stutzeri* cepa SEHMA, degradó el 50% del IHAK al 0.5% a las 13.86 horas.

## 6. CONCLUSIONES GENERALES

- En este estudio, se evaluó y seleccionó una cepa bacteriana proveniente de recortes de perforación denominada cepa RPA. Adicionalmente, a partir de suelo expuesto a hidrocarburos, se aisló una comunidad bacteriana compuesta por 12 bacilos Gram-negativos y 1 bacilo Gram-positivo. De acuerdo a los criterios de selección aplicados, se escogió la cepa denominada cepa SEHMA a partir de esta comunidad bacteriana aislada.
- Las dos cepas seleccionadas, provenientes de recortes de perforación y suelo expuesto a hidrocarburos, presentaron ADN de tipo plasmídico. Este material genético fue aislado, cuantificado y visualizado mediante los diferentes protocolos empleados.
- La cepa RPA fue caracterizada fenotípicamente, como *Bacillus licheniformis*
- La cepa SEHMA fue caracterizada fenotípicamente de manera parcial dentro grupo de bacilos Gram negativos, móviles, no fermentadores, oxidasa y catalasa positivos.
- Los árboles filogenéticos obtenidos con las secuencias del gen ribosomal 16S de las cepas RPA y SEHMA, con los métodos de distancia, parsimonia y máxima verosimilitud, presentan una topología similar demostrando que no son excluyentes sino comparativos y conclusivos en cuanto a la identificación genotípica de estas dos cepas bacterianas.
- Los análisis del gen ADNr 16S resultaron en la identificación de las cepas seleccionadas como especies filogenéticamente cercanas a especies del género *Bacillus* y *Pseudomonas*, específicamente, a *Bacillus licheniformis* en el caso de la cepa RPA y *Pseudomonas stutzeri* en el caso de la cepa SEHMA.

- *Bacillus licheniformis* cepa RPA y *Pseudomonas stutzeri* cepa SEHMA, degradan el IHAK al 0.1% (296 mg COT/L), 0.5% (1479 mg COT/L) y 2% (5905 mg COT/L), no se presentó correlación alguna entre la concentración de la sustancia y el porcentaje de remoción.
- *Bacillus licheniformis* cepa RPA, obtuvo la mayor degradación del IHAK al 0.1%, correspondiente a 296 mg COT/L (100% de remoción) como única fuente de carbono y al 2%, correspondiente a 570 mg COT/L (9.6%)
- *Pseudomonas stutzeri* cepa SEHMA, obtuvo la mayor degradación del IHAK al 0.5%, correspondiente a 1692 mg COT/L (100%) utilizándolo como fuente de carbono adicional con el extracto de levadura.
- La adición de extracto de levadura como fuente de carbono adicional al IHAK, influyó positivamente la degradación del IHAK al 0.5% por la cepa SEHMA, con una remoción del 100% y en la degradación del IHAK al 2% por la cepa RPA, con una remoción del 10%. Sin embargo, la adición de esta fuente de carbono no fue determinante en los demás tratamientos, ya que los valores de degradación al emplear el IHAK, como única fuente de carbono, fueron mayores.
- Con respecto a la velocidad en la que se llevó a cabo la degradación del IHAK, *Bacillus licheniformis* cepa RPA, degradó el 50% del IHAK al 0.1%, a las 5.47 horas como única fuente de carbono y a las 10.20 horas en la muestra complementada con extracto de levadura. *Pseudomonas stutzeri* cepa SEHMA, degradó el 50% del IHAK al 0.5% a las 16.63 horas como única fuente de carbono y a las 21.05 horas en la muestra complementada con extracto de levadura. Asimismo, *Pseudomonas stutzeri* cepa SEHMA, degradó el 50% del IHAK al 0.5% a las 13.86 horas.

---

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Alexander M. 1981. Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science*, 211: 132-138
2. Albert L. A., López S. M. y Flores J. 1995. *Diccionario de la contaminación*. Centro de Ecología y Desarrollo. México D.F. México. pp 85
3. Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J. H., Zhang Z., Miller W. y D. Lipman, J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database programs. *Nucleic. Acid. Res.* 25: 3389-3402
4. Altenschmidt U., Eckerskorn C. y Fuchs G. 1990. Evidence that enzymes of a novel aerobic 2-amino-benzoate metabolism in denitrifying *Pseudomonas* are coded on a small plasmid. *Eur. J. Biochem.* 194: 647-653
5. Ambriz K. T. 2001. *Estudio fisicoquímico y microbiológico de la biodegradabilidad aerobia rápida de inhibidores de hidratación de arcillas empleados en la formulación de fluidos de perforación*. Tesis de Maestría. UNAM. México, D. F. México
6. Atlas R. M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological Reviews*, 45 (1): 180-209
7. Ash C., Farrow J. A. E., Wallbanks S. y Collins M. D. 1991. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit ribosomal RNA sequences. *Lett. Appl. Microbiol.* 13: 202-206
8. Atlas R. M. y Cerniglia C. E. 1995. Bioremediation of petroleum pollutants. *BioScience*, 45 (5): 332-338
9. Baggi G., Barbieri E. G. y Tollari S. 1987. Isolation of a *Pseudomonas stutzeri* strain that degrades  $\sigma$ -xylene. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2129-2131
10. Barbieri P., Arengli F. L. G., Bertoni G., Bolognese F. y Galli E. 2000. Evolution of catabolic pathways and metabolic versatility in *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Antonie van Leeuwenhoek*, 79: 135-140
11. Bartha R. 1990. Isolation of microorganisms that metabolize xenobiotic compounds. In: *Isolation of biotechnological organisms from nature*. Labeda, D. P. Ed. Environmental Biotechnology Series. Mac Graw Hill. Nueva York, U.S.A. pp 283-307

12. Barrow G. I. y Feltman R. K. 1993. *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*. 3a Edition, Cambridge University Press
13. Boon N., Goris J., De Vos P., Verstraete W. y Top E. 2001. Genetic diversity among 3-chloroaniline and aniline degrading strains of the Comamonadaceae. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1107-1115
14. Borneman J., Skroch P. W., O'Sullivan., Palus J. A., Rumjanek N. G., Jansen J. L., Nienhuis J. y Triplett E. W. 1996. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (6): 1935-1943
15. Bouwer E. J. 1992. Bioremediation of organic contaminants in the subsurface. En: *Environmental Microbiology*. Mitchell R. Wiley-Liss, Inc. Nueva York, E.U.A. pp 287-289
16. Burton N. F., Day M. J. y Bull A. T. 1982 Distribution of bacterial plasmids in clear an polluted sites in a South wales river. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 1026-1029
17. Chauhan S., Barbieri P. y Wood T. K. 1998. Oxidation of trichloroethylene, 1,1-dichloroethylene, and chloroform by toluene/o-xylene monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3023-3024
18. Christensen H., Hansen M. y Sorensen J. 1999. Counting and size classification of active soil bacteria by fluorescence in situ hybridization with an rRNA oligonucleotide probe. *Appl. Environ. Microbiol.* 165 (4): 1753-1761
19. Cleary J. M., Lauro F. M. y Bartlett D. H. A 16S based phylogeny of polysaccharide producing *Sphingomonas* strains. Datos no publicados
20. Clesceri L. S., Greenberg A. E. y Eaton A. D. APHA, AWWA, WEF. 2000. *Standard methods for the examination of water and wastewaters*. 20 th edition. American Water Works Association
21. Cook M. A., Osborn A. M., Bettendorf J. y Sobecky P. 2001. Endogenous isolation of replicon probes for assessing plasmid ecology of marine sediment microbial communities. *Microbiology*, 147: 2089-2101
22. Crews B., Malachosky E., y Hinman L. D. 1993. The effect of pH on microbial biodegradation of oil-based drilling mud in a slurry-phase bioreactor. *SPE*. 25992: 540-555
23. Cullen D. W. y Hirsch P. R. 1998. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. *Soil. Biol.. Biochem.* 30 (8/9): 983-993
24. Davison J. 1999. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid*, 42: 73-91

25. De Boer A. S., Priest F y Diderichsen B. 1994. Review: On the industrial use of *Bacillus licheniformis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 595-598
26. Denger K., Laue H. y Cook A. M. 1997. Anaerobic taurine oxidation: a novel reaction by a nitrate-reducing *Alcaligenes* sp. *Microbiology*, 143: 1919-1924
27. Del Solar G., Giraldo R., Ruiz-Echevarría M. J., Espinosa M. y Díaz-Orejás R. 1998. Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 (2): 434-464
28. Dijk J. A., Stams A. J. M., Schraa G., Ballerstedts H., de Bont J. A. M. y Gerritse J. Anaerobic oxidation of 2-chloroethanol under denitrifying conditions by *Pseudomonas stutzeri* strain JJ. Datos no publicados
29. Dinkla I. J. T., Gabor E. M. y Janssen D. B. 2001. Effects of iron limitation on the degradation of toluene by *Pseudomonas* strains carrying the TOL (pWWO) Plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3406-3412
30. Domenech, X.. 1993. *Química Ambiental. El impacto Ambiental de los Residuos*. Editorial Niraguano S. A. Madrid. España. pp 61-95
31. Domínguez L. E. y Luna-Pabello V. M. 2001. Informe Final Integral. Proyecto FIES 97-03-1. *Desarrollo de un método de biodegradabilidad aerobia rápida para inhibidores de arcillas empleados en los fluidos de perforación de pozos petroleros*. México, D. F. México
32. Eaton R. W., Selifonova O. V. y Gedney R. M. 1998. Isopropylbenzene catabolic pathways in *Pseudomonas putida* RE204: nucleotide sequence analysis of the *ibp* operon neighboring DNA from pRE4. *Biodegradation*, 9: 119-132
33. Eckford R., Cook F. D., Saul D. J., Aislabie J. y Foght J. Free-living heterotrophic nitrogen-fixing bacteria isolated from fuel-contaminated Antarctic soils. Datos no publicados
34. El Sayed W. S., Ibrahim M. K., Abu Shady M. R., El Beih F. M., Ohmura N., Saiki H. y Ando A. Isolation and characterization of phenol-catabolizing bacteria from coking plant. Datos no publicados
35. Felsenstein J. 1993. PHYMLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle. E.U.A.
36. Ginard M., Lalucat J., Tummeler B. y Romling U. 1997. Genome organization of *Pseudomonas stutzeri* and resulting taxonomic and evolutionary considerations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47 (1): 132-143

37. Gordon R. E., Haynes W. C. y Pang Ch.-N. 1973. *The Genus Bacillus*. US. Department of Agricultural Handbook N° 427. U.S. Department of agriculture. Washington D. C. E.U.A.
38. Green J. y Trett M. W. 1989. *The fate and effects of oil in freshwater*. Center for Research in Aquatic Biology University of London. Published in Association whit The British Petroleum Company P.I.C. Londres y Nueva York, Elsevier Applied Science
39. Grimberg S. J., Stringfellow W. T. y Aitken M. D. 1996. Quantifying the biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas stutzeri* P16 in the presence of a nonionic surfactant. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2387-2392
40. Hada H, S. y Sizemore R. K. 1981. Incidence of plasmids in marine *Vibrio* spp. isolated from an oil field in the northwestern gulf of Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 199-202
41. Harrington C. 1997. En: <http://www.genesysrg.com/mision/petroleo.htm>.  
[http://www.uamerica.edu.co/perforacion/l\\_indice.htm](http://www.uamerica.edu.co/perforacion/l_indice.htm)
42. Hoppensack A., Oppermann-Sanio F. B. y Steinbuechel A. 2003. Conversion of the nitrogen content in liquid manure into biomass and polyglutamic acid by a newly isolated strain of *Bacillus licheniformis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 218 (1): 39-45
43. Hurst C. J., Knudsen G. R., Mc. Inerney M. J., Stetzenbach L. D. y Walter M. V. *Manual of Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology Press. Washington D. C. E.U.A. 1997. pp 422-423
44. Hutson R. A., Farrow J. A. E. y Collins M. D. *Bacillus* species from termites. Datos no publicados
45. Ikram-ul-Haq., Ashraf H., Iqbal J. y Qadeer M. A. 2003. Production of alpha amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium. *Bioresour Technol.* 87 (1): 57-61
46. Iwaki H., Shimizu M., Tokuyama T. y Hasegawa Y. 1999. Biodegradation of cyclohexylamine by *Brevibacterium oxydans* IH-35-A. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2232-2234
47. Jac-Chang C. y Sang-Jong K. 2001. Detection of mega plasmid for polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Sphingomonas* sp. Strain KS14. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3 (4): 503-506
48. Jansen M. y Hansen T. A. 2001. Non-growth-associated demethylation of dimethylsulfoniopropionate by (homo) acetogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (1): 300-306

49. Kado C. I. 1998. Origin and evolution of plasmids. *Antonie van Leeuwenhoek*. 73: 117-126
50. Khan S. T., Horiba Y., Yamamoto M. y Hiraishi A. 2002. Members of the family Comamonadaceae as primary poly (3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate)-degrading denitrifiers in activated sludge as revealed by a polyphasic approach. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (7): 3206-3214
51. Khamesan A. y Chan E. C. S. *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* complete 16S rRNA gene, isolate from human blood. Datos no publicados
52. Knaebel D. B. y Crawford R. L. 1997. Extraction and purification of microbial DNA from petroleum-contaminated soils and detection of low numbers of toluene, octane and pesticide degraders by multiplex polymerase chain reaction and southern analysis. *Mol. Ecol.* 4: 579-591
53. Kumar S., Tamura K., Jakobsen I. B. y Nei M. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
54. Laubier L. 1991. Las mareas negras. *Mundo científico*. 116 (11): 906-915
55. Le Champion L., Vandais A. y Ouazzani J. 1999. Microbial remediation of NTO in aqueous industrial wastes. *FEMS Microbiol Lett.* 176 (1): 197-203
56. Lechner S., Mayr R., Francis K. P., Pruss B. M., Kaplan T., Wiessner-Gunkel E., Stewart G. S. y Scherer S. 1998. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 1373-1382
57. Lee C. H., Lewis A., Paszczynski A. y Crawford R. L. 1999. Identification of an extracellular agent (correction of catalyst) of carbon tetrachloride dehalogenation from *Pseudomonas stutzeri* strain KC as pyridine 2,6-bis (thiocarboxylate). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261: 562-566
58. Lien T. y Beeder J. 1997. *Desulfobacter vibrioformis* sp. nov., a sulfate reducer from a water-oil separation system. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47 (4): 1124-1128
59. Liu Z., Hong Q. y Li S. P. 16S rDNA sequence of methyl parathion degrading strain DLL-E4. Datos no publicados
60. Lovley, D. 2003. Cloning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation. *Nature Reviews Microbiology*. 1: 35-44

61. Maas E. W., Kodama M., Thiele J. H., Bennasar A., Brooks H. J. L. y Moore E. R. B. Phylogenetic characterisation of paralytic shellfish toxin (PST). producing bacteria isolated from marine algal cultures. Datos no publicados
62. Madsen E. L. 1996. Methods for determining biodegradability. En:
63. Manahan S. E. 1998. *Introduction to environmental chemistry*. Lewis Publishers Inc. New York, U.S.A. pp 701
64. Masahito H., Hirano M. y Nagata T. 1999. Involvement of two plasmids in the degradation of carbanyl by *Arthrobacter* sp. strain RC100. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1015-1019
65. Masahito H., Hirano M. y Tokuda S. 2000. Involvement of two plasmids in fenitrothion degradation by *Burkholderia* sp. strain NF100. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1737-1740
66. Miles A. A., Misra S. S. K. y Irwin J. O. 1938. The estimation of bacterial power of the blood. *J. hygieniene*, 38: 732-49. Descrito en: Microbiología de los alimentos, *Técnicas de análisis microbiológico* Vol. 1, Segunda edición ICMSF, Ed. Acribia, Zaragoza, España.
67. Montoya D., Arévalo C., González S., Aristizábal F. y Schwarz W. H. 2001. New solvent-producing *Clostridium* sp. strains, hydrolyzing a wide range of polysaccharides, are closely related to *Clostridium butyricum*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 27 (5): 329-335
68. Murakami Y. y Alexander M. 1989. Destruction and formation of toxins by one bacterial species affect biodegradation by a second species. *Biotechnol. Bioeng.* 33: 832-838
69. Murgel S. 1984. *Limnología sanitaria. Estudio de la polución de aguas continentales.* U. De Sao Paulo, S.E.T.E.S.B. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington D. C.
70. Murray R. G. E., Brenner D. J., Bryant M. P., Holt J. G., Krieg N. R., Moulder J. W., Pfennig N., Sneath P. H. A., Williams S. T. y Staley J. T. 1984. *Bergey's Manual of systematic bacteriology* Vol 1, 2, 3, 4. Ed. Williams & Wilkins
71. NCBI, En: <http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>
72. OECD. 1992b. *Guidelines for testing of chemicals. Ready biodegradability.* 301 A. "DOC Die-away test". Organization for Economic Cooperation and Development. París, Francia
73. Ogunseitan O. A., Tedford E. T., Pacia D., Sirotkin K. M. y Saylor G. S. 1987. Distribution of plasmid in grounwater bacteria. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 1: 311-317
74. Ollis D. 1992. Slick solution for spills. *Nature.* 358: 453-454

75. Page R. D.M. 1996. TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *CABIOS* 12: 357-358
76. Parales R. E. Bruce N. C. Schmid A. y Wackett L. P. 2002. Minireview: Biodegradation, biotransformation and biocatalysis (B3). *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4699-4709
77. Perna N. T., Plunkett G. I., Burland V., Mau B., Glasner J. D., Rose D. J., Mayhew G. F., Evans P. S., Gregor J., Kirkpatrick H. A., Posfai G., Hackett J., Klink S., Boutin A., Shao Y., Miller L., Grotbeck E. J., Davis N. W., Lim A., Dimalanta E., Potamousis K., Apodaca J., Anantharaman T. S., Lin J., Yen G., Schwartz D. C., Welch R. A. y Blattner F. R. 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 409: 529-533
78. Pötter M., Oppermann-Sanio F. B. y Steinbuechel A. 2001 A Cultivation of bacteria producing polyamino acids with liquid manure as carbon and nitrogen source. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2): 617-622
79. Raina M., Pepper I. L. y Gerba C. P. *Environmental Microbiology*. Academic Press. New York, U.S.A. 1999
80. Raninger A. y Steiner W. 2003. Accelerated process development for protease production in continuous multi-stage cultures. *Biotechnol Bioeng.* 82 (5): 517-524
81. Reiter B. y Sessitsch A. Phylogenetic analysis of *Ochrobactrum* sp. isolates from the rhizosphere of potato plants. Datos no publicados
82. Relman D. A. 1993. *Universal bacterial 16S rDNA amplification and Sequencing. En Diagnostic molecular microbiology, principles and applications*, edited by Persing D. H., Smith T. F., Tenover F. C. y White T. J. by ASM Washington D.C. USA. pp 489-495
83. Rius N., Fuste M.C., Guasp C., Lalucat J. y Loren J. G. 2001. Clonal population structure of *Pseudomonas stutzeri*, a species with exceptional genetic diversity. *J.Bacteriol.* 183 (2): 736-744
84. Rodiles-López, J. O. 2001. *Determinación de la capacidad genotóxica de algunos inhibidores de hidratación de arcillas empleados en fluidos de perforación petrolera usando sistemas microbianos*. Tesis de Maestría en Ciencias Químico-Biológicas, ENCB, IPN. México, D.F. México.
85. Roselló-Mora R. A., Lalucat J. y García-Valdéz E. 1994. Comparative biochemical and genetic analysis of naphthalene degradation among *Pseudomonas stutzeri* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 966-972

86. Rozs M., Manczinger L., Vagvolgyi C. y Kevei F. 2001. Secretion of a trypsin-like thiol protease by a new keratinolytic strain of *Bacillus licheniformis*. *FEMS Microbiol Lett.* 205 (2): 221-224
87. Ruiz-Sánchez A. 2001. *Obtención de un consorcio microbiano degradador de un inhibidor de hidratación de arcillas de fluidos de perforación*. Tesis de Maestría, ENCB, IPN. México, D.F. México
88. Salamanca-Pinzón S. G. 1999. *Degradación de Hidrocarburos por bacterias aisladas de la bahía de Cartagena*. Tesis de pregrado en Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias, PUJ. Bogotá, Colombia
89. Sambrook J., Fritsch E. F. y Maniatis T. 1989. *Molecular cloning a laboratory manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
90. Saini H. S. y Kahlon R. S. 1998. Characterization of a degradative plasmid coding for metabolism of 3-chlorobenzoate by *Pseudomonas putida* and its expression in *Escherichia coli*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 271-276
91. Satoh I., Hattori N. y Venkateswaran K. Molecular microbial diversity of spacecraft assembly facilities. Datos no publicados
92. Schlumberger Limited. 2001. In: <http://www.slb.com/sced/es/watch/mud/cycle.htm>.
93. Sentschilo V. S., Perebituk A. N., Zehnder J. B. y Van Der Meer J. R. 2000. Molecular diversity of plasmid bearing genes that encode toluene and xylene metabolism in *Pseudomonas* strains isolated from different contaminated sites in Belarus. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2842-2852
94. Shida O., Takagi H., Kadowaki K., Komagata K. y Nakamura L. Taxonomy of the genus *Paenibacillus*. Datos no publicados
95. Sikorski J., Teschner N. y Wackernagel W. 2002. Highly different levels of natural transformation are associated with genomic subgroups within a local population of *Pseudomonas stutzeri* from soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 865-873
96. Sikorski J., Rossello-Mora R. y Lorenz M. G. Analysis of genotypic diversity and relationships among *Pseudomonas stutzeri* strains by PCR-based genomic fingerprinting and multilocus enzyme electrophoresis. Datos no publicados

97. Sobczyk P. A., Mincer T. J., Chang M. C. y Helinski D. R. 1997. Plasmids isolated from marine sediment microbial communities contain replication and incompatibility regions unrelated to those of known plasmid groups. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 888-895
98. Sorokin D. Y., Teske A., Robertson L. A. y Kuenen J. G. 1999. Anaerobic oxidation of thiosulfate to tetrathionate by obligately heterotrophic bacteria, belonging to the *Pseudomonas stutzeri* group. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30 (2): 113-123
99. Summers D. 1996. *The biology of plasmid*. Department of genetics, University of Cambridge, Cambridge. Blackwell Science Ltd.
100. Tarrío F., Márquez V., Bodelón F., Álvarez A., Torralba C., Gómez A., Sarda F., Salcedo F., Villaverde M., Martín F., Montero M. y Sanz J. 1993. *Tratado universal del medio ambiente. Técnicas de defensa del medio ambiente*. Vol 4. Editorial Rezza. México.
101. Thaniyavarn J., Roongsawang N., Kameyama T., Haruki M., Imanaka T., Morikawa M. y Kanaya S. 2003. Production and characterization of biosurfactants from *Bacillus licheniformis* F2.2. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67 (6): 1239-1244
102. Thomas C. M. y Smalla K. 2000. Trawling the horizontal gene pool. *Microbiology Today*, 27: 24-27
103. Thompson D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F. y Higgins D. G. 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876-4882
104. Top E. M., Daele P. V., Sacyer N. y Forney L. 1998. Enhancement of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4D) degradation in soil by dissemination of catabolic plasmid. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 73: 87-94
105. Trajanovska S., Britz M. L. y Bhawe M. 1997. Detection of heavy metal ion resistance genes in Gram positive and Gram negative bacteria isolated from a lead-contaminated site. *Biodegradation*, 8: 113-124
106. Van der Meer J. R., de Vos W. M., Harayama S. y Zehnder A. J. B. 1992. Molecular Mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol. Rev.* 56: 677-694
107. Wang J. J. y Shih J. 1999. Fermentation production of keratinase from *Bacillus licheniformis* PWD-1 and a recombinant *B. subtilis* FDB-29. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 22 (6): 608-616

- 
108. Wiggins B. A. y Alexander M. 1988. Role of chemical concentration and second sources in acclimation of microbial communities for biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2803-2807
  109. Xia X. 2000. *Data analysis in molecular biology and evolution*. Kluwer Academic publishers, Boston. pp. 276.
  110. Xia X., y Xie Z., 2001 DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity*, 92: 371-373
  111. You-Sun C., Na-Ri L., Choong-Il C., Eun-Sook S., Myeong-Sok L., Youngsoo K. y Kyung-Hee M. 2001. Molecular cloning of the nahG encoding salicylate hydrolase from *Pseudomonas fluorescens*. *Molecules and Cells*. 11: 105-109
  112. Zapata 2002, *Aislamiento y caracterización de bacterias biodegradadoras de IHAK*. Tesis de licenciatura. UNAM, México, D. F. México.
  113. Zitomer D. H. y Speece R. E. 1993. Sequential environments for enhanced biotransformation of aqueous contaminants. *Environ. Sci. Techn.* 27 (2): 227-244.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Anexo A. Clasificación de las bacterias empleadas en la filogenia de las cepas RPA y SEHMA

**TABLA A. 1.** Clasificación de las bacterias empleadas para la construcción de los árboles filogenéticos de la cepa RPA (Tomada del GenBank (National Center of Biotechnology information; (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?name=Eubacteria>))

Bacteria (Eubacteria)	
Firmicutes (Gram-positive bacteria)	
• Bacilli	
Bacillales	
Bacillaceae	
Bacillus	
<i>Bacillus</i> sp. GC 11-2	
<i>Bacillus licheniformis</i> NCDO 1772	
<i>Bacillus</i> sp. Aislado de termita	
Bacillus cereus group	
<i>Bacillus mycoides</i> 2048 DSM	
<i>Bacillus thuringiensis</i> WS 2647	
Paenibacillaceae	
Paenibacillus	
<i>Paenibacillus lautus</i> CCM 3892	
• Clostridia	
Clostridiales	
Clostridiaceae	
Clostridium	
<i>Clostridium butyricum</i> IBUN 64A	
Eubacteriaceae	
Eubacterium	
<i>Eubacterium limosum</i> PM31	
Proteobacteria (purple bacteria and relatives)	
• Alphaproteobacteria	
• Betaproteobacteria	
Burkholderiales	
Alcaligenaceae	
Alcaligenes	
<i>Alcaligenes</i> sp. NKNTAU	
• Delta/epsilon subdivisions	
• Gammaproteobacteria	
Enterobacteriaceae group	
Escherichia	
Escherichia coli	
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933	
unclassified Proteobacteria	

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**TABLA A. 2.** Clasificación de las bacterias empleadas para la construcción de los árboles filogenéticos de la cepa SEHMA (Tomada del GenBank (National Center of Biotechnology information; (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?name=Eubacteria>))

Bacteria (Eubacteria)	
Proteobacteria (purple bacteria and relatives)	
•	Alphaproteobacteria
	Rhizobiales (rhizobacteria)
	Brucellaceae
	Ochrobactrum
	<i>Ochrobactrum</i> sp. PR17
	Sphingomonadales
	Sphingomonadaceae
	Sphingomonas
	<i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 21423
•	Betaproteobacteria
	Burkholderiales
	Alcaligenaceae
	Alcaligenes
	<i>Alcaligenes</i> sp. NKN7A1
	Burkholderiaceae
	Burkholderia
	<i>Burkholderia cepacia</i> PW3
•	delta/epsilon subdivisions
	delta subdivision
	Desulfobacter
	<i>Desulfobacter vibriofarum</i> B54
	epsilon subdivision
	Campylobacter group
	Campylobacter
	Campylobacter fetus
	<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>Venerialis</i>
•	Gammaproteobacteria
	Aeromonadaceae/Succinivibrionaceae group
	Aeromonas
	<i>Aeromonas</i> sp PG4-1
	Pseudomonadales
	Pseudomonadaceae
	Pseudomonas
	<i>Pseudomonas</i> sp. 5A
	<i>Pseudomonas</i> sp. JP1-1
	Pseudomonas stutzeri group
	<i>Pseudomonas balearica</i> TG-3
	Pseudomonas stutzeri
	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 17682
	<i>Pseudomonas stutzeri</i> JJ
	Pseudomonas putida group
	Pseudomonas putida
	<i>Pseudomonas putida</i> D11-E4
•	unclassified Proteobacteria

## Anexo B. Caracterización fenotípica de las cepas de estudio y filogenia

TABLA B.1. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas RPA y SEHMA

Características para la identificación	Copa bacteriana RPA	Copa bacteriana SEHMA
Reacción de Gram	+	-
Forma	Bacilar	Bacilar
Cadena de células	+	-
Posición y forma de la espora	VX	-
Catalasa	+	-
Oxidasa	-	+
Sulfuro	-	-
Indol	-	-
Motilidad	+	+
Crecimiento a 50° C	-	-
Crecimiento a 60° C	-	-
Crecimiento a en 6.5% de NaCl	+	-
TSI	-	K/K
Glucosa	-	-
Lactosa	-	-
Carbohidratos, ácido a partir de:		
Glucosa	+	-
Rafinosa	+	-
Xilosa	+	-
Salicin	+	-
Ramnosa	-	-
sacarosa	-	-
melobiosa	-	-
Inocitol	-	-
arabinosa	-	-
sorbitol	-	-
Manosa	-	-
Reducción de nitratos	+	-
Ureasa	+	-
VP	+	-
RM	-	-
Utilización de citrato	+	+
Crecimiento de Agar Mac Conkey	-	+
Hidrólisis de caseína	+	-
Arginina	-	-
Utilización de gelatina	-	-
OF		
Oxidación	+	+
Fermentación	+	+

V: Espora central / subterminal

X: Espora oval (elipsoidal)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ANEXO C. Análisis estadístico

### Análisis estadístico de los datos obtenidos de la evaluación realizada en la etapa preliminar referente a la respuesta de crecimiento de las bacterias preseleccionadas (A, B y D) ante el IHAK

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) Prueba de comparación múltiple LSD (Least significant difference)  $\alpha = 0.05$ . La variable dependiente corresponde a los datos de UFC/mL. La evaluación se hizo entre los medios ME y MEI y entre las bacterias A, B y D.

TABLA C. I. Análisis estadístico realizado para el medio I (ME)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	Prob> F
Tratamiento	2.00	127556.31	63778.16	2.99	0.19
Error	3.00	64054.53	21351.51		
Total ajustado	5.00	191610.54			

	R-cuadrada	C. V.	Root MSE	prom. UFC
	0.67	5.20	146.12	2810.90

Fuente de variación	Grados de libertad	Tipo I SS	Cuadrados medios	F calculada	Prob> F
Medio	0.00	0.00			
Bacteria	2.00	127556.31	63778.16	2.99	0.19

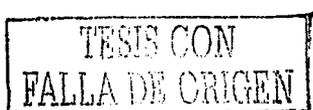
  

Fuente de variación	Grados de libertad	Tipo III SS	Cuadrados medios	F calculada	Prob> F
Medio	0.00	0.00			
Bacteria	2.00	127556.31	63778.16	2.99	0.19

Prueba T (LSD) para variable UFC/mL.  $\alpha = 0.05$ ., G.l.= 3., MSE= 21351.51.

Valor crítico de T= 3.18

LSD= 465.02



*Medias con la misma letra no tienen diferencia significativa*

Grupo de T	Promedio	N	Bacteria
A	2983.2	2	A
A	2822.9	2	B
A	2626.6	2	D

Conclusión: no hay diferencia significativa entre las bacterias con el medio ME

**TABLA C. 2.** Análisis estadístico realizado para el medio 2 (MEI)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	Prob> F
Tratamiento	2.00	263920.48	131960.24	22.97	0.02
Error	3.00	17235.28	5745.09		
Total ajustado	5.00	281155.76			

<i>R-cuadrada</i>	<i>C. V.</i>	<i>Root MSE</i>	<i>prom. UFC</i>
0.94	2.22	75.80	3416.06

Fuente de variación	Grados de libertad	Tipo I SS	Cuadrados medios	F calculada	Prob> F
Medio	0.00	0.00			
Bacteria	2.00	263920.48	131960.24	22.97	0.02

Fuente de variación	Grados de libertad	Tipo III SS	Cuadrados medios	F calculada	Prob> F
Medio	0.00	0.00			
Bacteria	2.00	263920.48	131960.24	22.97	0.02

Prueba T (LSD) para variable UFC/mL.  $\alpha = 0.05$ , G.l.= 3., MSE= 5745.093.

Valor crítico de T= 3.18

LSD= 241.22

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

*Medias con la misma letra no tienen diferencia significativa*

Grupo de T	Promedio	N	Bacteria
A	3707.9	2	A
B	3316	2	D
B	3224.28	2	B

Conclusión: Existe diferencia significativa entre las bacterias con el medio MEI. El promedio más alto de UFC/mL es de la bacteria A

**TABLA C. 3.** Análisis estadístico realizado para la Bacteria A

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	Prob> F
Tratamiento	1.00	783313.50	783313.50	24.09	0.04
Error	2.00	65035.63	32517.81		
Total ajustado	3.00	848349.43			

	R-cuadrada	C. V.	Root MSE	prom. UFC
	0.92	5.52	180.33	3265.38

Fuente de variación	Grados de libertad	Tipo I SS	Cuadrados medios	F calculada	Prob> F
Medio	1.00	783313.50	783313.50	24.09	0.04
Bacteria	0.00	0.00			

Fuente de variación	Grados de libertad	Tipo III SS	Cuadrados medios	F calculada	Prob> F
Medio	1.00	783313.50	783313.50	24.09	0.04
Bacteria	0.00	0.00			

Prueba T (LSD) para variable UFC/mL.  $\alpha = 0.05.$ , G.I.= 2., MSE= 32517.81.

Valor crítico de T= 4.30

LSD= 775.88

*Medias con la misma letra no tienen diferencia significativa*

Grupo de T	Promedio	N	Medio
A	3707.9	2	MEI
B	2822.9	2	ME

Conclusión: Existe diferencia significativa entre los medios de cultivo ME y MEI para la bacteria A. El promedio más alto de UFC/mL es del medio MEI

**TABLA C. 4.** Análisis estadístico realizado para la Bacteria B

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	Prob> F
Tratamiento	1.00	357167.59	357167.59	84.86	0.01
Error	2.00	8417.53	4208.76		
Total ajustado	3.00	365585.12			

<i>R-cuadrada</i>	<i>C. V.</i>	<i>Root MSE</i>	<i>prom. UFC</i>
0.98	2.22	64.87	2925.47

Fuente de variación	Grados de libertad	Tipo I SS	Cuadrados medios	F calculada	Prob> F
Medio	1.00	357167.59	357167.59	84.86	0.01
Bacteria	0.00	0.00			

Fuente de variación	Grados de libertad	Tipo III SS	Cuadrados medios	F calculada	Prob> F
Medio	1.00	357167.59	357167.59	84.86	0.01
Bacteria	0.00	0.00			

Prueba T (LSD) para variable UFC/mL.  $\alpha = 0.05$ ., G.I.= 2., MSE= 4208.763.

Valor crítico de T= 4.30

LSD= 279.13

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

*Medias con la misma letra no tienen diferencia significativa*

Grupo de T	Promedio	N	Medio
A	3224.28	2	MEI
B	2626.65	2	ME

Conclusión: Existe diferencia significativa entre los medios de cultivo ME y MEI para la bacteria B. El promedio más alto de UFC/mL es del medio MEI

TABLA C. 5. Análisis estadístico realizado para la Bacteria D

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	Prob> F
Tratamiento	1.00	110755.84	110755.84	28.27	0.03
Error	2.00	7836.66	3918.33		
Total ajustado	3.00	118592.50			
	<i>R-cuadrada</i>	<i>C. V.</i>	<i>Root MSE</i>	<i>prom. UFC</i>	
	0.93	1.99	62.60	3149.60	

Fuente de variación	Grados de libertad	Tipo I SS	Cuadrados medios	F calculada	Prob> F
Medio	1.00	110755.84	110755.84	28.27	0.03
Bacteria	0.00	0.00			

Fuente de variación	Grados de libertad	Tipo III SS	Cuadrados medios	F calculada	Prob> F
Medio	1.00	110755.84	110755.84	28.27	0.03
Bacteria	0.00	0.00			

Prueba T (LSD) para variable UFC/mL.  $\alpha = 0.05$ ., G.I.= 2., MSE= 3918.33.

Valor crítico de T= 4.30

LSD= 269.33

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

---

*Medias con la misma letra no tienen diferencia significativa*

Grupo de T	Promedio	N	Medio
A	3316	2	MEI
B	2983.2	2	ME

Conclusión: Existe diferencia significativa entre los medios de cultivo ME y MEI para la bacteria D. El promedio más alto de UFC/mL es del medio MEI.

Conclusión general del Análisis estadístico de los datos obtenidos de la evaluación realizada en la etapa preliminar referente a la respuesta de crecimiento de las bacterias preseleccionadas (A, B y D) ante el IHAK:

Existe una diferencia significativa en cuanto al medio de cultivo ME y MEI, este último proporcionó los promedios más altos de UFC/mL con las tres bacterias (A, B y D). A nivel de bacterias, la A es la bacteria con promedio más alto de UFC/mL en el medio MEI respecto a las bacterias B y D.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Análisis estadístico de los datos obtenidos de la prueba de biodegradación de las cepas RPA y SEHMA ante el IHAK al 0.1 y 0.5%

TABLA C. 6. Tabla obtenida mediante el análisis de varianza ANOVA II (SAS for Windows Version 8.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	Prob> F
Tratamiento	1	46640940.66	46640940.66	176.13	< .0001
Error	190	50314895.86	26481524		
Total ajustado	191	96955836.52			
	<i>R-cuadrada</i>	<i>C. V.</i>	<i>Root MSE</i>	<i>prom. UFC</i>	
	0.481053	77.23381	514.602	666.2911	
Fuente de variación	Grados de libertad	Tipo I SS	Cuadrados medios	F calculada	Prob> F
Grupo	1	46640940.66	46640940.66	176.13	< .0001

### Resultados de la prueba múltiple de medias con el método de Duncan ( $\alpha = 0.05$ )

La variable dependiente correspondió a los datos de COT. Las pruebas se realizaron entre grupos (0.1% y 0.5%), entre bacterias (A y MA), entre cada uno de los tratamientos o matraces empleados (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8) y entre cada uno de los tiempos de muestreo (1, 3 y 7).

La descripción de la composición de cada uno de los matraces se encuentra en la Tabla 1 del documento de tesis

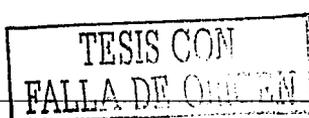


TABLA C. 7. Resultados de la prueba múltiple de medias con el método de Duncan ( $\alpha = 0.05$ )

EFECTOS						
The GLM Procedure						
Class Level Information						
Class	Levels	Values				
bacteria	2	1 2				
grupo	2	1 2				
tiempo	3	1 3 7				
replica	2	1 2				
matraz	8	1 2 3 4 5 6 7 8				
Number of observations						192
GLOBAL						
EFECTOS						
The GLM Procedure						
Dependent Variable: dato						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F	
Model	82	96269711.31	1174020.87	186.51	<.0001	
Error	109	686125.21	6294.73			
Corrected Total	191	96955836.52				
R-Square	Coeff Var	Root MSE	dato Mean			
0.992923	11.90760	79.33931	666.2911			
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F	
bacteria	1	135028.07	135028.07	21.45	<.0001	
grupo	1	46640940.66	46640940.66	7409.53	<.0001	
matraz	7	28630456.60	4090065.23	649.76	<.0001	
replica	1	8.17	8.17	0.00	0.9713	
tiempo	2	140251.15	70125.58	11.14	<.0001	
bacteria*grupo	1	142821.83	142821.83	22.69	<.0001	
bacteria*matraz	7	1366319.41	195188.49	31.01	<.0001	
bacteria*tiempo	2	194908.46	97454.23	15.48	<.0001	
grupo*matraz	7	15030164.52	2147166.36	341.11	<.0001	
grupo*tiempo	2	69997.15	34998.58	5.56	0.0050	
tiempo*matraz	14	818485.90	58463.28	9.29	<.0001	
bacteri*grupo*matraz	7	1520471.52	217210.22	34.51	<.0001	
bacteri*grupo*tiempo	2	130628.54	65314.27	10.38	<.0001	
bacteri*tiempo*matraz	14	836134.78	59723.91	9.49	<.0001	
grupo*tiempo*matraz	14	613094.54	43792.47	6.96	<.0001	
GLOBAL						

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Continuación: TABLA C. 7. Resultados de la prueba múltiple de medias con el método de Duncan ( $\alpha = 0.05$ )

EFFECTOS				
The GLM Procedure				
Duncan's Multiple Range Test for dato				
NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.				
Alpha				0.05
Error Degrees of Freedom				109
Error Mean Square				6294.727
Number of Means				2
Critical Range				22.70
Means with the same letter are not significantly different.				
Duncan Grouping	Mean	N	bacteria	
A	692.81	96	2	
B	639.77	96	1	
	GLOBAL			
EFFECTOS				
The GLM Procedure				
Duncan's Multiple Range Test for dato				
NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.				
Alpha				0.05
Error Degrees of Freedom				109
Error Mean Square				6294.727
Number of Means				2
Critical Range				22.70
Means with the same letter are not significantly different.				
Duncan Grouping	Mean	N	grupo	
A	1159.16	96	2	
B	173.42	96	1	
	GLOBAL			

Continuación: TABLA C. 7. Resultados de la prueba múltiple de medias con el método de Duncan ( $\alpha = 0.05$ )

EFFECTOS							
The GLM Procedure							
Duncan's Multiple Range Test for dato							
NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.							
	Alpha Error	Degrees of Freedom	0.05				
	Error Mean Square		109				
			6294.727				
Number of Means	2	3	4	5	6	7	8
Critical Range	45.39	47.77	49.35	50.51	51.41	52.14	52.74
Means with the same letter are not significantly different.							
Duncan Grouping	Mean	N	matraz				
A	1019.56	24	8				
A	1019.33	24	6				
B	938.60	24	7				
B	934.86	24	5				
C	727.99	24	1				
D	613.00	24	2				
E	72.53	24	4				
F	4.46	24	3				
EFFECTOS							
The GLM Procedure							
Duncan's Multiple Range Test for dato							
NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.							
	Alpha Error	Degrees of Freedom	0.05				
	Error Mean Square		109				
			6294.727				
Number of Means	2	3					
Critical Range	27.80	29.26					
Means with the same letter are not significantly different.							
Duncan Grouping	Mean	N	tiempo				
A	704.49	64	1				
B	648.28	64	7				
B	646.10	64	3				

### Resultados de la prueba múltiple de medias con el método de Tukey ( $\alpha = 0.05$ )

La variable dependiente correspondió a los datos de COT. Las pruebas se realizaron entre grupos (0.1% y 0.5%), entre bacterias (A y MA), entre cada uno de los tratamientos o matraces empleados (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8) y entre cada uno de los tiempos de muestreo (1, 3 y 7).

La descripción de la composición de cada uno de los matraces se encuentra en la Tabla 1 del documento de tesis

**TABLA C. 8.** Resultados de la prueba múltiple de medias con el método de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

EFFECTOS			
The GLM Procedure			
Tukey's Studentized Range (HSD) Test for dato			
NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.			
Alpha			0.05
Error Degrees of Freedom			109
Error Mean Square			6294.727
Critical Value of Studentized Range			2.80293
Minimum Significant Difference			22.697
Means with the same letter are not significantly different.			
Tukey Grouping	Mean	N	bacteria
A	692.81	96	2
B	639.77	96	1
EFFECTOS			
The GLM Procedure			
Tukey's Studentized Range (HSD) Test for dato			
NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.			
Alpha			0.05
Error Degrees of Freedom			109
Error Mean Square			6294.727
Critical Value of Studentized Range			2.80293
Minimum Significant Difference			22.697
Means with the same letter are not significantly different.			
Tukey Grouping	Mean	N	grupo
A	1159.16	96	2
B	173.42	96	1

Continuación: TABLA C. 8. Resultados de la prueba múltiple de medias con el método de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

EFECTOS			
The GLM Procedure			
Tukey's Studentized Range (HSD) Test for dato			
NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.			
Alpha			0.05
Error Degrees of Freedom			109
Error Mean Square			6294.727
Critical Value of Studentized Range			4.37084
Minimum Significant Difference			70.786
Means with the same letter are not significantly different.			
Tukey Grouping	Mean	N	matraz
A	1019.56	24	8
A			
A	1019.33	24	6
B	938.60	24	7
B			
B	934.86	24	5
C	727.99	24	1
D	613.00	24	2
E	72.53	24	4
E			
E	4.46	24	3
GLOBAL			
EFECTOS			
The GLM Procedure			
Tukey's Studentized Range (HSD) Test for dato			
NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.			
Alpha			0.05
Error Degrees of Freedom			109
Error Mean Square			6294.727
Critical Value of Studentized Range			3.36043
Minimum Significant Difference			33.327
Means with the same letter are not significantly different.			
Tukey Grouping	Mean	N	tiempo
A	704.49	64	1
B	648.28	64	7
B			
B	646.10	64	3