



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

UTILIZACIÓN DE HIDROCARBUROS POR BACTERIAS  
AISLADAS DE UNA MUESTRA DE SUELO  
CONTAMINADO CON PETRÓLEO CRUDO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

LAURA MONTELONGO RAMÍREZ



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO, D.F.

2005.

m. 345610



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.

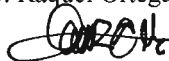
## **Jurado Asignado**

Presidente	Prof. María Guadalupe Tsuzuki Reyes
Vocal	Prof. Raquel Ortega Muñoz
Secretario	Prof. Alejandro Camacho Cruz
1 <sup>er</sup> Suplente	Prof. Luciano Hernández Gómez
2 <sup>o</sup> Suplente	Prof. Norma Trejo Medina

### **Sitio donde ser realizó el tema:**

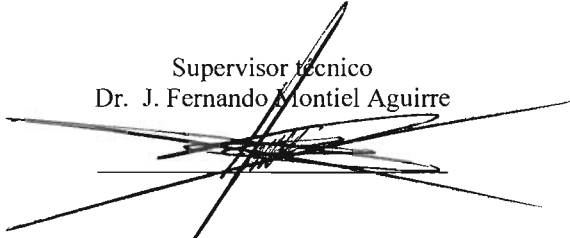
Laboratorio 1-A (anexo). Microbiología molecular. Departamento de Biología. Facultad de Química. UNAM.

Asesor del tema  
M. en C. Raquel Ortega Muñoz



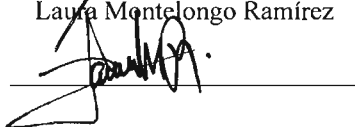
---

Supervisor técnico  
Dr. J. Fernando Montiel Aguirre



---

Sustentante  
Laura Montelongo Ramírez



---

autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Laura Montelongo  
Remírez

FECHA: 21 de Junio - 2025

FIRMA: [Firma]

Este trabajo está dedicado a las personas que con su cariño y esfuerzo lograron hacer de mí una mejor persona:

A mi esposo que me ha brindado su amor incondicional y siempre ha creído en mí (Gracias amor), a mis padres por darme la vida y las herramientas para continuar creciendo, a mis hermanos Claudia y Daniel, que con su ejemplo me han motivado para afrontar los obstáculos de la vida, a mis familiares, por el bienestar y el apoyo que me han brindado, a mis amigos, por esos momentos tan gratos que han compartido conmigo y todos mis compañeros y amigos del laboratorio 1-A (Microbiología molecular) por su apoyo.

A la M. en C. Raquel Ortega Muñoz por todo el apoyo, la atención y el interés que me brindó en este trabajo de tesis. Gracias por no hacerme sentir como una alumna, sino como una amiga.

Al Dr. Fernando Montiel Aguirre por todos sus consejos, motivación y la confianza que depositó en mí. Así mismo por el interés y apoyo en el desarrollo de este trabajo.

Resta sólo agradecer al H. Jurado la dedicación puesta en la revisión de este trabajo y la valiosa aportación de sus comentarios.

## CONTENIDO

<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 1. Antecedentes</b>	<b>3</b>
<b>Capítulo 2. Introducción</b>	<b>6</b>
Componentes del petróleo	6
Características del petróleo	6
Propiedades físicas del petróleo	10
Propiedades químicas del petróleo	10
Contaminación del suelo por hidrocarburos	11
Principales funciones del suelo	12
Naturaleza y propiedades del suelo	13
Parámetros ambientales que afectan a los contaminantes	14
Transporte y transformación de los contaminantes en el suelo	15
Biorremediación	17
Métodos de biorremediación	18
Vías metabólicas de degradación de hidrocarburos	19
Importancia de los microorganismos en la biorremediación	22
Espectroscopía de infrarrojo como método auxiliar en estudios de biorremediación	24
Regiones espectrales	25
Reflectancia total atenuada ATR	26
Interpretación de los espectros	27
Justificación	30
<b>Capítulo 3. Objetivos</b>	
Objetivo General	31
Objetivos particulares	31
<b>Capítulo 4. Material y Método</b>	
Diagrama de flujo	32
Obtención de la muestra de suelo	34
Aislamiento y caracterización de bacterias a partir de una muestra de suelo contaminado por hidrocarburos	34
Determinación del crecimiento de las bacterias en medio líquido con hidrocarburos	35
Identificación de las bacterias	36
Espectroscopía de infrarrojo con reflectancia total atenuada	38
Extracción de proteínas totales por el método de Laemmli	39
Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	39
Separación de proteínas totales en geles de poliacrilamida (PAGE)	40
Extracción de ADN plasmídico	41

<b>Capítulo 5. Resultados y Discusión</b>	
Aislamiento de bacterias que degradan hidrocarburos	42
Identificación de bacterias que degradan hidrocarburos	43
Curvas de crecimiento de las bacterias en medio mineral con hidrocarburos	45
Análisis de infrarrojo con reflectancia total atenuada	50
Análisis de la separación electroforética de proteínas totales en bacterias que degradan hidrocarburos	59
Análisis de ADN plasmídico	62
<b>Capítulo 6. Conclusiones</b>	<b>63</b>
<b>Capítulo 7. Perspectivas</b>	<b>64</b>
<b>Capítulo 8. Referencias</b>	<b>65</b>
<b>Capítulo 9. Anexo</b>	
Medio mineral	69
Medio Luria	69
Medio Peptonado	69
Medios para Pseudomonas	69
Agar Bordet Gengou	70
Agar cetrimida	70
Agar Mac Conkey	70
Agar nutritivo	71
Agar sangre de carnero (ASC)	71
Extracción de proteínas	72
Geles de poliacrilamida	74
Extracción de ADN plasmídico	75
Tinción de Gram	77
Tinción de Cápsula	77
Tablas de resultados	78
Controles para las curvas de crecimiento	80

## RESUMEN

En México, la industria del petróleo en su conjunto ha tenido un impacto negativo en materia ambiental. Debido a la amplia gama de productos derivados del petróleo, no ha sido posible evaluar la contaminación involucrada desde la fase de explotación hasta la obtención de los productos petroquímicos básicos. El problema de los suelos contaminados con hidrocarburos radica en que hasta hace pocos años no existía conciencia del grado de la dificultad y el costo que representa la remediación de los suelos contaminados, siendo mucho más caro remediar que prevenir (Chappin, R. G. y Summerlin, L. R. 1988.).

Este problema ha dado lugar a buscar diferentes estrategias para la recuperación de los suelos con problemas de contaminación. Para este fin, se utilizan entre muchos otros procedimientos, microorganismos nativos con capacidad de degradar hidrocarburos como fuente de carbono. Sin embargo, son pocos los microorganismos que han podido ser aislados y que poseen la habilidad de degradar hidrocarburos (Molina, M. y Rochelle, A. 1991). Por tal motivo, se planteó como objetivo de este trabajo aislar bacterias nativas de una muestra de suelo contaminado con petróleo crudo y estudiar la capacidad que tienen éstas bacterias de utilizar mezclas de hidrocarburos como única fuente de carbono y energía.

Se aislaron dos bacterias diferentes de una muestra de tierra contaminada proveniente de Poza Rica, Veracruz y se cultivaron en un medio mineral conteniendo petróleo o diesel como única fuente de carbono; se evaluó el crecimiento de las bacterias en estos medios realizando curvas de crecimiento a través de espectrofotometría UV-Vis. La degradación de los hidrocarburos en el medio se confirmó mediante un análisis por espectrofotometría de infrarrojo (FTIR ATR). Las bacterias se identificaron mediante un sistema denominado API 20E para bacilos no fermentadores.

Las bacterias aisladas de la muestra de suelo contaminado por petróleo crudo se identificaron como *Pseudomonas aeruginosa* y *Bordetella sp* y se demostró su capacidad para degradar mezclas de hidrocarburos como el diesel centrifugado y el petróleo ligero.



Una vez hecha la identificación se realizó un estudio del patrón electroforético de las proteínas totales de las bacterias cultivadas en los medios con hidrocarburos y en medios nutritivos que sirvieron como controles. Por otra parte, se realizó una extracción de ADN plasmídico de las bacterias para saber si éstas son portadoras de algún plásmido que pudiera conferirles la capacidad de degradar hidrocarburos.

En relación al análisis electroforético, se encontró que algunas de las proteínas (29 kD, 36 kD y 45 kD ) expresadas por las bacterias que se mantuvieron en los medios con hidrocarburos, no se detectaron en las bacterias que se mantuvieron en el medio de control (peptonado). Esto podría significar que dichas proteínas están involucradas con la utilización de los hidrocarburos como sustrato. Por otra parte, en la extracción del ADN plasmídico se observó que sólo la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* era portadora de un plásmido.

Se concluye que las cepas *Bordetella sp.* y *Pseudomonas aeruginosa* son capaces de crecer en medios contaminados por compuestos orgánicos como petróleo crudo y/o sus derivados, que tienen la capacidad de utilizar estos contaminantes como fuente de carbono y energía, posiblemente gracias a proteínas inducidas por contacto con estos hidrocarburos cuando carecen de otra fuente de energía para sobrevivir.

## 1. ANTECEDENTES

Desde mediados de los años 80, la capacidad para reparar ecosistemas dañados ha sido interpretada como una evidencia acerca de nuestro conocimiento de los mecanismos biológicos. En la actualidad el mundo industrializado se enfrenta a grandes problemas de la más diversa índole. Sin embargo, en los últimos años la contaminación ambiental se ha convertido en tema de preocupación y polémica generalizada en cuanto a causas, impacto social y las consecuencias a mediano y largo plazo (Luna-Pabello, V. M. *et al.*, 1994).

El aire, el agua y el suelo presentan un detrimento en su calidad y su recuperación se torna difícil debido a la gran variedad de contaminantes que contienen y las concentraciones en las que éstos se encuentran (Luna-Pabello, V. M. *et al.*, 1994).

El aumento en la actividad industrial, la falta de control de calidad, el descuido industrial y los accidentes producen que compuestos orgánicos e inorgánicos industriales en el ambiente sean considerados actualmente como la fuente número uno de contaminación ambiental en la tierra, subsuelo y ambientes marinos. Los residuos oleosos producidos por la industria petrolera continúan siendo un problema ambiental respecto a su tratamiento y disposición final. El daño que esto produce sobre la salud ha llamado la atención de investigadores de todo el mundo para implementar tecnologías que limpien el ambiente de los contaminantes. Se estima que a nivel mundial uno de los mayores contaminantes son los derrames de petróleo y de sus derivados (Botello, A. 1998).

Hoy en día la contaminación por el petróleo y sus derivados ha despertado un gran interés en la comunidad científica, especialmente después de los grandes derrames petroleros, como los del Atlantic Empress que derramó 257 mil toneladas de crudo en las Indias Occidentales en 1979; el derrame del Buque Castillo del Beliver que en 1983 derramó 239 mil toneladas en Sudáfrica; el Amoco Cádiz que en la Costa Atlántica de Francia derramó 221 mil toneladas de petróleo en 1978; Torrey Canyon en Inglaterra y el del Tampico Maru sobre las costas de Baja California, a partir del cual fueron derramadas e introducidas en el mar miles de toneladas de petróleo crudo (Botello, A. 1998).

Derrames más recientes son los del Buque Exxon Valdez que en 1989 derramó 36 mil toneladas de crudo en Alaska, el del Buque Prestige que derramó 77 mil toneladas frente a las costas de España en el 2002. Además se calcula que las plataformas petroleras vierten al mar alrededor de 130 mil toneladas de crudo anuales (Atlas, R. y Bartha, R. 2002).

México, país con un alto grado de industrialización y por ende de exploración y explotación de sus recursos naturales y minerales, no podía escapar a un accidente como el derrame del pozo Ixtoc-1 el 3 de junio de 1979, en la Sonda de Campeche y recientemente lo ocurrido el 22 de diciembre del 2004, una explosión en una estación de bombeo de Petróleos Mexicanos (PEMEX) en el estado de Veracruz, donde se derramaron siete mil barriles de petróleo al Río Coatzacoalcos, que desemboca en el Golfo de México. Los fuertes vientos y la corriente del río empujaron el petróleo hacia el mar, donde cubrió playas y animales silvestres en el este de México.

Por lo anterior, es obvio que el impacto de estos derrames es considerablemente variable y es la zona costera con su gran productividad la más dañada durante un derrame de petróleo. En México, la industria del petróleo en su conjunto ha tenido un impacto negativo en materia ambiental. Debido a la amplia gama de productos derivados del petróleo, no ha sido posible evaluar cuantitativamente la contaminación involucrada desde la fase de explotación hasta la obtención de los productos petroquímicos básicos (Saval, B. 1995).

La industria petrolera está constituida por las siguientes áreas: prospección, explotación, producción, refinación y procesamiento de gas, así mismo, la infraestructura petrolera está integrada por pozos, baterías de separación, complejos procesadores de gas, centrales de almacenamiento y bombeo, red de ductos y presas para el confinamiento de desechos sólidos y líquidos procedentes de la perforación y mantenimiento de los pozos (PEMEX, 1988).

Por lo general, el petróleo tal y como se extrae de los pozos no sirve como energético ya que requiere de altas temperaturas para degradarse y servir como combustible, por lo tanto, para poder aprovecharlo como energético es necesario separarlo en diferentes fracciones que constituyen los diferentes combustibles como el gasavión, gasolina, turbosina, diesel, petróleo ligero y petróleo pesado también llamado gasóleo (PEMEX, 1999). Los procesos de refinación del petróleo para convertirlo en productos útiles incluyen técnicas como la destilación, donde se separan los productos del petróleo por sus diferentes temperaturas de evaporación (tabla 1.1).

**Tabla 1.1 Rango de temperaturas en la refinación del petróleo por destilación.**

<b>Rango de temperatura de evaporación</b>	<b>Productos de la destilación del petróleo</b>
<20° C	Gas natural
20-200° C	Gasolina
185-345° C	Keroseno, gasolina de jet, diesels
345-540° C	Aceites de lubricación
>540° C	Aceites residuales

(Overton, E. *et al.*, 1994)

Por las diferentes actividades industriales que efectúa PEMEX, contamina potencialmente el ambiente por emisión de gases y descargas de aguas residuales generadas durante la perforación de pozos petroleros, la extracción del crudo, la refinación y la producción de petroquímicos. Las instalaciones poseen riesgos inherentes de fugas de petróleo, diesel y gasolina por daños en los ductos y los derrames del agua aceitosa de las presas por inundaciones durante el periodo de lluvias (SEMARNAP, 1996.). Además, la transportación de petróleo crudo y productos refinados en buques tanque y tuberías tiene implícita la posibilidad de derrames que pueden contaminar suelo, agua y atmósfera.

## 2. INTRODUCCION

### Componentes del petróleo

La composición del petróleo es compleja y varía según los reservorios. En general, el petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos y no hidrocarburos que son derivados de la descomposición parcial de material biogénico (Overton, E. *et al.*, 1994.). Los productos resultantes del rompimiento natural de los compuestos son:

- Gases (gas natural)
- Líquidos (aceites y crudo)
- Sólidos

Las diferencias en la composición del crudo resultan en propiedades físicas y químicas únicas para cada tipo de crudo, y estas diferencias son importantes para los procesos de refinación del petróleo y para predecir el impacto ambiental en casos de derrames (Crapes, M. *et al.*, 2000.).

### Características del petróleo.

El elemento más común por peso es el carbono, seguido de hidrógeno y del azufre, la mayoría de los hidrocarburos contienen un porcentaje pequeño de azufre y son llamados “crudos dulces”, mientras que crudos con un porcentaje mayor de azufre se conocen como “crudos amargos”. Los siguientes elementos son el nitrógeno y el oxígeno, pero también se encuentran metales en cantidades mínimas (Overton, E. *et al.*, 1994.).

La nomenclatura de las bases del petróleo se enfoca en los enlaces de carbono y su formación estructural. En la tabla 2.1 se clasifica a los componentes del petróleo en 5 grupos:

**Tabla 2.1 Clasificación según los tipos de enlaces de carbono.**

Grupo	Ejemplo
Saturados	Parafinas normales, isoparafinas y naftalenos.
Aromáticos	Hidrocarburos aromáticos (HA), policíclicos (HAP).
Polares	Compuestos aromáticos azufrados, nitrogenados y con oxígeno.
Porfirinas	Estructuras grandes y complejas de carbono derivadas de la clorofila que contienen en su parte central un átomo de metal.
Resinas y asfaltos	Componentes con peso individual alto que forman agregados y coloides.

(Overton, E. *et al.*, 1994)

El petróleo ligero comercial y/o doméstico, es una mezcla de hidrocarburos alifáticos y aromáticos (benceno y derivados del benceno) que puede contener también elementos como el nitrógeno o azufre. La composición química exacta variará dependiendo del origen y de otros factores (PEMEX, 1999). Otro derivado de las fracciones medias de la refinación del petróleo crudo es el diesel, utilizado como combustible para camiones, barcos y maquinaria industrial.

El diesel es un combustible líquido de suma importancia ya que desde el punto de vista medioambiental los combustibles líquidos son más limpios que los combustibles sólidos como las ceras o parafinas. La tabla 2.2 se muestra la composición química y algunas propiedades físicas y caloríficas del diesel y el diesel centrifugado (PEMEX, 1999).

**Tabla 2.2 Diferencia entre la composición de diesel y diesel centrifugado (Pemex, 1999).**

	<b>Diesel</b>	<b>Diesel centrifugado</b>
Carbono, %	84/87	84/86
Nitrógeno, %	1.0	1.3
Hidrógeno, %	10/14	10/15
Número de Cetanos	40/48	48/52
Azufre, %	1.5/3.0	0.2/0.5
Oxígeno (%en peso)	0	2/2,5
Poder calorífico (BTU/LB)	18.500	17.900
Densidad (g/mL)	0.84/0.86	0.85/0.86

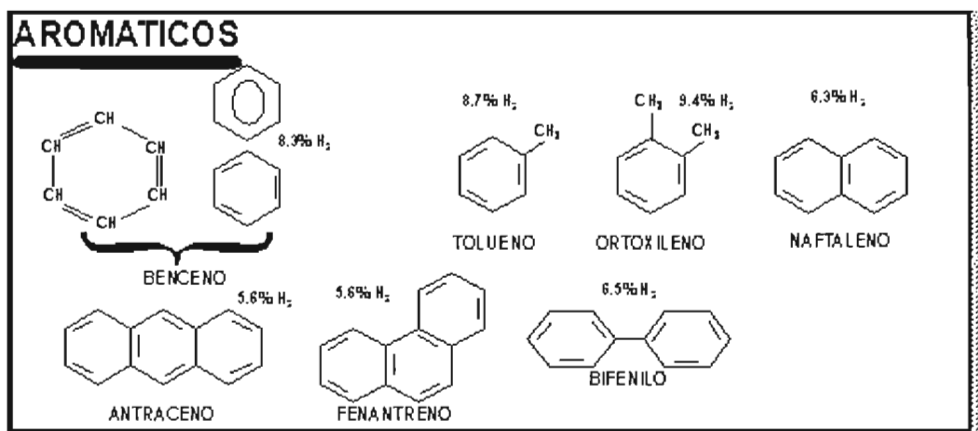
**Nota: Los porcentajes son masa/masa**

El petróleo crudo tienen una proporción de 76 a 86% de carbono y 10 a 14% de hidrógeno, proveniente de los hidrocarburos que lo componen, estos hidrocarburos se clasifican de la siguiente forma:

- Hidrocarburos biogénicos: éstos son sintetizados por casi todas las plantas, animales terrestres y marinos, incluyendo a la microbiota (bacterias, plancton marino, diatomeas y algas) (Bidleman, T. F. *et al.*, 1990).
- Hidrocarburos antrópicos: éstos son introducidos como resultado de la actividad humana. Los procesos de combustión industrial contribuyen con la contaminación debido principalmente al humo generado por la quema del carbón, combustibles fósiles y petróleo refinado, las descargas de aguas municipales, las actividades de transporte y los derrames son algunas de las principales fuentes de estos contaminantes (Bidleman, T. F. *et al.*, 1990).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), producidos por las actividades humanas, están formados por dos o más anillos de benceno fusionados, los cuales difieren en el número y posición del anillo aromático (fig. a). Algunos compuestos como naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno y pireno por mencionar algunos, son considerados como contaminantes prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US Environmental Protection Agency, EPA), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Comunidad Europea (CE) debido a sus efectos carcinogénicos (Menzie, C. A. *et al.*, 1992).

Figura a. Esquema de hidrocarburos aromáticos.



Una vez que los HAP son liberados al ambiente, la degradación a través de microorganismos es a menudo lenta, lo que conduce a su acumulación en los sedimentos, suelos, plantas acuáticas y terrestres, peces e invertebrados expuestos. Los hidrocarburos alifáticos (fig. b y fig. c) como las olefinas, alquil-bencenos y algunas parafinas, detectados en muestras de sedimentos, son también indicativos de contaminación por petróleo (Stephenson, A. y Labunska, I. 1998).

Figura b. Esquema de parafinas.

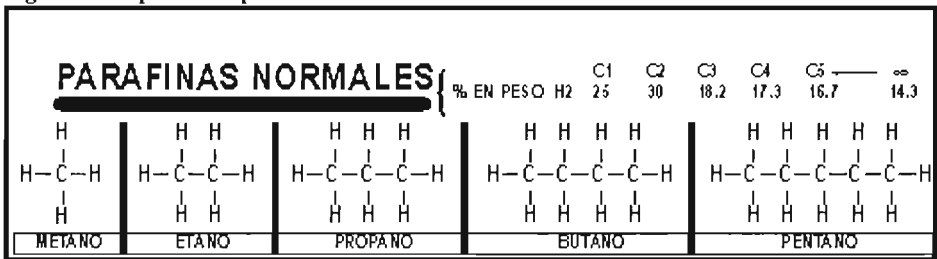
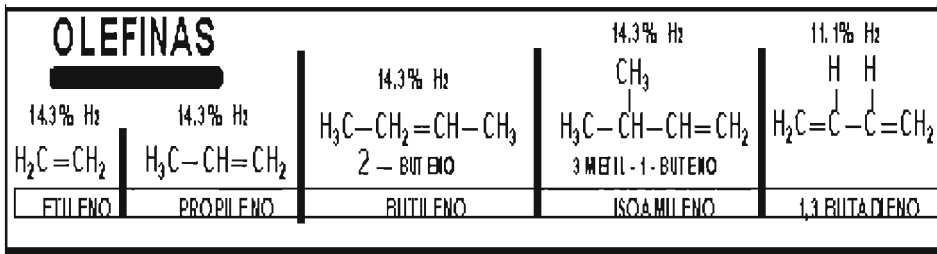


Figura c. Esquema de olefinas.



Las implicaciones toxicológicas del petróleo ocurren por la exposición y el metabolismo de estructuras aromáticas. La toxicología aguda se da por compuestos aromáticos simples incluyendo al benceno, tolueno y xilenos. Los HAP y los hidrocarburos alifáticos pueden afectar la salud humana; los individuos expuestos a mezclas de estos compuestos a través de la inhalación o el contacto dérmico por periodos prolongados han llegado a desarrollar cáncer. La siguiente tabla muestra una comparación entre diferentes compuestos de acuerdo a su Límite de Daño Inmediato a la Vida y Salud (DIVS) y al Límite de Tolerancia (LT) de acuerdo con los manuales del Standard National Institute for Occupational Safety and Health y American Conference of Government Industrial Hygienists.



**Tabla 2.3 Comparación de componentes aromáticos del petróleo**

Compuesto	Punto de fusión (°F)	LT (ppm)	DIVS (ppm)	Solubilidad (mg/l a 25°C)
Benceno	12	10	1,000	1,800
Tolueno	40	10	2,000	470 <sup>a</sup>
Xilenos	63	100	10,000	198 <sup>b</sup>
Naftaleno	174	10	500	31.7

<sup>a</sup> solubilidad a 16° C <sup>b</sup> promedio de 3 compuestos (Overton, E. 1994)

La toxicidad de mezclas complejas como el petróleo y sus refinados es extremadamente difícil de determinar aún cuando la toxicidad de los compuestos individuales sea conocida (Overton, E. *et al.*, 1994.). La composición química del petróleo y sus subproductos tienen diversos efectos en organismos de un mismo ecosistema (Crapes, M. *et al.*, 2000.).

### Propiedades físicas del petróleo.

Generalmente las propiedades físicas, derivan de su composición total, de la mezcla de las propiedades individuales de los compuestos que lo integran y su proporción, algunas características físicas incrementan la toxicidad de los compuestos, como es el caso de la solubilidad, ya que aumenta la exposición de los organismos a los compuestos (tabla 2.4).

**Tabla 2.4 Características físicas asociadas a la toxicidad**

Peso	No. de átomos de carbono	Punto de ebullición (°C)	Velocidad de evaporación	Solubilidad	Toxicidad
Bajo	<12	<150	rápida	alta	Altamente aguda
Medio	10-12	150-400	moderada	baja	Moderadamente aguda
Alto	>20	>400	Muy baja	Muy baja	Crónica

(Overton, E. *et al.*, 1994)

### Propiedades químicas.

Otras propiedades del petróleo que no son fácilmente observables se pueden extrapolar de las características físicas de los compuestos individuales. Las características más importantes son la solubilidad en agua y la presión de vapor, ya que estas son indicadores de la duración del petróleo en el ambiente.

La solubilidad en agua de diferentes compuestos se puede ver afectada por la influencia de diferentes grupos funcionales, a continuación se muestra una tabla con ejemplos:

**Tabla 2.5 Solubilidad en agua de diferentes componentes del petróleo**

Compuesto	Grupo funcional	Solubilidad ( $\mu\text{g/ml}$ )
Benceno		1,800
Fenol	-OH	82,000
Benzaldehído	-COH	3,300
Ácido Benzoico	-COOH	2,900
Metil Benceno	-CH <sub>3</sub>	515
Bifenilo	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	7.5
Benzo(a)pireno		<0.01

(Overton, E. *et al.*, 1994)

Las posibles rutas de exposición de varias clases de compuestos encontradas en el petróleo dependen de sus propiedades físicas y químicas. El petróleo es generalmente desgastado de acuerdo a sus propiedades físicas y químicas pero mientras este proceso sucede, entra en contacto con las especies que habitan en el ecosistema por una o más vías de exposición incluyendo la inhalación, ingestión, contacto dérmico y en mucha menor proporción la bioacumulación en alimentos (Overton, E. *et al.*, 1994.).

### **Contaminación del suelo por hidrocarburos.**

El comportamiento de los contaminantes orgánicos está en función de sus características físicas y químicas (densidad, solubilidad, polaridad, entre otras.), además de las características del suelo como son la permeabilidad, estructura, tamaño de las partículas, contenido de humedad y de materia orgánica, así como la profundidad del manto freático. Todas las variables en su conjunto definen el tamaño y la distribución tridimensional del frente de contaminación en una zona específica (SEMARNAP, 1996).

Para la degradación de hidrocarburos en el suelo se han presentado tiempos de vida media muy variados, que oscilan entre 2 meses y 10 años debido al tipo de suelo, el tipo de microorganismos presentes en el suelo y el grado de contaminación. Los compuestos orgánicos ligeros como las gasolinas, aceites y petróleo crudo tienden a formar una capa en forma de nata en el nivel freático y se mueven horizontalmente en dirección al flujo del agua subterránea.

Probablemente el componente más importante del suelo en relación con la persistencia de sustancias tóxicas es la arcilla. La persistencia aumenta cuanto más pequeñas son las partículas debido a que aportan una gran área superficial para la absorción de los productos químicos (SEMARNAP, 1996).

Las propiedades químicas del suelo más afectadas por un derrame de hidrocarburos son:

- a. Aumento del carbono orgánico ya que el 75 % del carbono del petróleo crudo es oxidable
- b. Disminución del pH, debido a la acumulación del carbono orgánico y generación de ácidos orgánicos.
- c. Aumento del manganeso y hierro intercambiable
- d. Aumento del fósforo disponible (SEMARNAP, 1996.).

Los efectos tóxicos de los hidrocarburos en el ambiente dependerán de:

- a. La cantidad y composición del petróleo
- b. La frecuencia y tiempo de exposición
- c. El estado físico del derrame.
- d. Las características del sitio donde sucedió el derrame.
- e. Variables ambientales como temperatura, humedad y oxígeno.
- f. El uso de dispersantes químicos (su uso está restringido).
- g. La sensibilidad de la biota específica del ecosistema impactado (SEMARNAP, 1996.).

### **Principales funciones del suelo.**

El suelo y subsuelo constituyen un recurso natural difícilmente renovable que desempeña funciones como medio filtrante durante la recarga de los mantos acuíferos y la protección de los mismos, es el lugar donde ocurren los ciclos biogeoquímicos e hidrológicos, además de ser el espacio donde se realizan las actividades agrícolas, ganaderas y ser el soporte de la vegetación (Saval, B. 1995).

### **Naturaleza y propiedades del suelo.**

Los hidrocarburos se pueden encontrar de la siguiente forma: solubles en el agua del suelo, y adsorbidos por el suelo (Lesser, I. 1995). Las propiedades y condiciones que afectan la migración, retención y transformación de compuestos orgánicos en el suelo son:

**Materia Orgánica.** Un efecto inmediato del aumento de este parámetro es el incremento de los sitios de adsorción, que disminuyen la concentración en la fase acuosa y gaseosa del contaminante orgánico como también su transporte y su biodisponibilidad.

La adsorción es afectada por dos factores: la hidrofobicidad del contaminante (es la capacidad para disolverse en agua) y la fracción de la materia orgánica en el suelo (Mackay, M. D. *et al.*, 1985.).

**Contenido de agua.** Tiene gran influencia en la difusión líquida o gaseosa. Para la difusión líquida el transporte aumenta con el contenido de agua debido a su trayectoria en los espacios porosos reemplazando el aire contenido; inversamente, la difusión de vapor disminuye con el contenido de agua (Yong, R. *et al.*, 1992; Fränzle, O. 1993). El agua es un medio de transporte que puede ocurrir en dirección horizontal y vertical principalmente, para sustancias menos adsorbentes y más polares como es el caso de los alcoholes seguido por los aromáticos y finalmente los alifáticos (Tölgyessy, J. 1993).

**Textura del suelo.** En las texturas gruesas (suelos arenosos y grava) es más rápida la migración de algunos hidrocarburos que en texturas finas (suelos arcillosos). Además, otros parámetros dinámicos como permeabilidad, conductividad hidráulica y espacio poroso son dependientes de la textura.

El contenido de arcilla está correlacionado con el área superficial específica y capacidad de intercambio catiónico influyendo en la adsorción de iones. Para compuestos orgánicos no polares, generalmente no existe correlación entre el contenido de arcilla y la adsorción (Jury, W. 1989). Los aspectos específicos de la contaminación pueden presentarse en: a) formación de películas superficiales y emulsiones, y b) solubilidad en el agua de ciertos productos (Testa, M. 1994).

**Estructura del suelo.** Es una característica importante ya que se pueden presentar fisuras, grietas o canales que sirven como vías de transporte, permitiendo corrientes transitorias de grandes volúmenes de contaminantes a las aguas subterráneas (Lesser, I. 1995).. En ocasiones la estructura del suelo favorece la tendencia a concentrarse en corrientes verticales (llamados dedos) que generalmente comienzan en la transición de texturas finas a capas de textura granular (Crouch, S. 1990).

### **Parámetros ambientales que afectan a los contaminantes**

**Temperatura.** La presión de vapor está en función de la temperatura, al tener un valor bajo ( $10^{-4}$  atm) la fracción de un compuesto orgánico pasa rápidamente a la fase de vapor. Por esta razón la difusión gaseosa es mucho más importante que la difusión líquida (Jury, W. 1989).

**Precipitación.** Puede tener una influencia dominante debido al volumen de lluvia, afectando la velocidad de flujo en el suelo. Los suelos en regiones con lluvia intensa y frecuente tienen altos flujos de agua y de dispersión, extendiendo la difusión líquida y disminuyendo la gaseosa (Yong, R. *et al.*, 1992).

**Evaporación y transpiración.** Representa la cantidad de agua aplicada y que es removida por plantas o es perdida en la superficie. Esto puede ser regulado por las condiciones externas como la radiación solar, viento, temperatura y humedad ambiente o por la resistencia del suelo o plantas (Jury, W. 1989). En la tabla 2.6 se observan los parámetros del compuesto químico, suelo y ambiente que influyen en el transporte a través del suelo.

**Tabla 2.6 Parámetros que influyen en el transporte a través del suelo.**

Parámetros del Contaminante	Parámetros del Suelo	Parámetros Ambientales
Solubilidad	Contenido y retención de agua	Temperatura
Presión de vapor	Porosidad, densidad y permeabilidad	Precipitación
Número y tipo de grupos funcionales	Contenido de arcilla	Evaporación y Transpiración
Polaridad	Contenido de materia orgánica	
	Profundidad de agua subterránea	

(Luthy, R. G. *et al.* 1997)

## **Transporte y transformación de los contaminantes en el suelo.**

Los principales transportes y procesos de transformación para los contaminantes orgánicos disueltos en el suelo son: la advección, dispersión, lixiviación, adsorción y la transformación química y biológica. La migración de una fase orgánica líquida inmisible es gobernada, en gran parte, por su densidad, viscosidad y propiedades de superficie húmeda (Bonazountas, M. y Kallidromitou, D. 1993.).

**Dispersión:** La dispersión está en función de la velocidad promedio del agua en el poro (Fränze, O. 1993), donde las máximas concentraciones disminuyen con el incremento de la distancia (Barcelona, M. *et al.*, 1990.).

**Lixiviación:** El movimiento de un químico hacia zonas profundas a través del suelo por medio del agua es llamado lixiviación. Los factores determinantes en la lixiviación incluyen: la solubilidad, biodegradación, disociación, adsorción, volatilidad, lluvias y evaporación (Barcelona, M. *et al.*, 1990.).

**Adsorción:** La adsorción es la adhesión de iones o moléculas a superficies o interfases líquido-sólido, sólido-gas, líquido-gas y líquido-líquido produciendo un incremento en la concentración de químicos en la superficie o interfase sobre la concentración en solución (Fränze, O. 1993). Para la zona superficial de los suelos se han conceptualizado algunas relaciones con respecto a la presencia de contaminantes, a través de observaciones de la acumulación de los contaminantes orgánicos en asociación con adsorbentes naturales (Luthy, R. G. *et al.*, 1997).

**Volatilización:** Un compuesto químico presente en el suelo, agua, plantas o animales puede volatilizarse hacia la atmósfera. La presión de vapor es uno de los factores más importantes que gobiernan la volatilización y provee información acerca de la volatilización bajo condiciones ambientales, por lo tanto, pueden establecerse los siguientes enunciados:

1. Un compuesto químico con una baja presión de vapor tiene una alta capacidad de adsorción o una alta solubilidad al agua siendo menos probable de volatilizarse.
2. Un compuesto químico con una alta presión de vapor tiene una baja capacidad de adsorción o una muy baja solubilidad al agua siendo más probable de volatilizarse.

**Fotólisis:** Un compuesto químico puede ser fototransformado tanto como pueda absorber luz solar; puede ocurrir en el aire, suelo, agua, plantas y animales. Los productos pueden ser compuestos de alto y bajo peso molecular (Ney, R. 1990).

**Degradación:** El comportamiento químico del suelo es fundamental para la degradación de muchos compuestos orgánicos en una o más reacciones químicas (abióticas); en general, cinco reacciones pueden ocurrir en el suelo: hidrólisis, sustitución, eliminación, oxidación y reducción, sin embargo, sólo dos reacciones pueden transformar a los contaminantes orgánicos que se pueden considerar para este caso y son:

- ❖ **Oxidación:** Se presenta en el suelo afectando a muchos compuestos químicos aromáticos, por ejemplo: benceno, naftaleno y fenol. Otro segundo grupo incluye, tetraclorodibenzo-p-dioxina, hexaclorobenceno, hexaclorociclopentadieno, bifenilos polibromados (PBB's) y policlorados (PCB's) y no aromáticos (McBride, M. 1994).
  
- ❖ **Reducción:** Definido en términos de transferencia de electrones, involucra a compuestos orgánicos en diferentes sistemas como el de agua-arcilla. El efecto se acelera con el aumento de agua que sugiere la existencia del mecanismo de transferencia de electrones (Fränzle, O. 1993; Murray, B. 1994).

**Degradación biológica:** La degradación biológica o biodegradación es un proceso natural que se basa en la capacidad metabólica de los microorganismos para transformar los compuestos orgánicos en compuestos químicamente más sencillos. Los microorganismos utilizados en este proceso son seleccionados de manera natural en presencia de los contaminantes y la actividad degradadora puede ser estimulada por la adición de nutrimentos básicos o mejorada mediante tecnología genética (Boopathy, R. 2000).

## **Biorremediación.**

Es una de las soluciones más importantes para los problemas de contaminación por aceites e hidrocarburos que se provocan en nuestro país y que impactan fuertemente en los diferentes ambientes y sectores productivos (Molina, M. y Rochelle, A. 1991.).

La biorremediación es un término que se utiliza para referirse al proceso de degradación microbiológica sobre contaminantes ambientales. Esta puede ser definida como el uso de organismos vivos, componentes celulares o enzimas libres con el fin de realizar una mineralización, una transformación parcial, la humificación de residuos o de agentes contaminantes y una alteración del estado de compuestos orgánicos e inorgánicos (Chappin, R. G. y Summerlin, L. R. 1988.).

Los microorganismos son responsables de muchas reacciones esenciales para el propio funcionamiento de la biosfera. En los medios naturales, la interacción de un microorganismo con los factores físico-químicos del hábitat, además de con otros organismos, determinará el éxito de su crecimiento.

En la biorremediación es importante notar la presencia de microorganismos nativos del suelo que tienen un papel fundamental en la ausencia y/o permanencia de compuestos orgánicos; los compuestos químicos que poseen estructuras diferentes a los azúcares, aminoácidos y ácidos grasos, no pueden entrar inmediatamente dentro del metabolismo microbiano; esos compuestos requieren de una aclimatación definida en horas o meses, durante la cual poco o nada se degrada. El periodo de retraso generalmente es causado por:

- La inducción enzimática, responsable de la degradación para una población.
- La fase inicial de crecimiento exponencial de organismos capaces de degradar el compuesto y la alta solubilidad al agua que puede favorecer una rápida degradación .

Debido a que las condiciones del lugar y los tipos de contaminación varían ampliamente, los microorganismos capaces de sobrevivir y prosperar en situaciones ambientales extremas son aparentemente pocos.



## Métodos de biorremediación

Los métodos de biorremediación dependen fundamentalmente de que los microorganismos se utilicen en el lugar adecuado y con las condiciones ambientales más favorables para la degradación de los contaminantes en cuestión. Las técnicas utilizadas para llevar a cabo la biorremediación se clasifican en *ex situ* en donde hay una remoción física del material contaminado a tratar, e *in situ* donde el tratamiento del material contaminado se encuentra en la ubicación del derrame. En la tabla 2.7 se dan algunos ejemplos de técnicas *in situ* y *ex situ* (Boopathy, R. 2000).

**Tabla 2.7 Técnicas *in situ* y *ex situ* utilizadas en la biorremediación**

<b>METODO</b>	<b>MODO DE ACCION</b>
<i>Tratamiento de tierras (landfarming)</i>	Tratamiento en fase sólida , puede ser <i>in situ</i> o <i>ex situ</i> .
<i>Abonado</i>	Proceso aeróbico de tratamiento termofílico. El material contaminado se mezcla con un agente enriquecedor, se utilizan columnas estáticas o aireadas.
<i>Biorreactores</i>	Biodegradación dentro de un reactor para tratar líquidos y aguas pantanosas.
<i>Bioventilación</i>	Tratamiento de contaminantes sólidos por medio de la inyección de oxígeno a través del material contaminado (estimulación de la actividad microbiana).
<i>Biofiltros</i>	Inmovilización de los microorganismos en columnas para tratar emisiones de aire.
<i>Bioaugmentación</i>	Adición de cultivos de bacterias al medio contaminado, frecuentemente utilizados <i>in situ</i> , también se realiza <i>ex situ</i> .
<i>Bioestimulación</i>	Estimulación del crecimiento de los microorganismos nativos de la región en sólidos o en agua proveyendo de nutrientes.
<i>Biorremediación intrínseca</i>	Replica el crecimiento de los microorganismos originarios de la región.
<i>Bombeo y tratado</i>	Bombeo de agua de la superficie contaminada, tratada y reinyectada.

Hay que considerar que la descomposición de hidrocarburos derivados del petróleo por microorganismos se encuentra en función de la cantidad de biomasa o población microbiana en el suelo, de las características físico-químicas y concentración de los contaminantes y de los factores ambientales tales como el pH, la temperatura, etc.

El pH óptimo para procesos de biorremediación en suelos se encuentra entre 5 y 8; en estos niveles de pH las especies bacterianas más conocidas tienen un mejor rendimiento en la degradación de hidrocarburos (Zaidi, B. *et al.*, 1999).

La temperatura que provee un crecimiento favorable en la mayoría de los estudios de biorremediación es de 27 °C. Por lo tanto, se ha establecido que la velocidad de degradación para desechos de refinerías y petroquímicos aumenta cuando las temperaturas van de 10 a 30 °C, pero disminuye ligeramente cuando las temperaturas aumentan de 30 a 40 °C.

El contenido de oxígeno en el suelo es frecuentemente otro factor importante en la biorremediación, ya que la cantidad de oxígeno determina que cierto tipo de microorganismos puedan llevar a cabo la biodegradación bajo condiciones de aerobiosis o de anaerobiosis.

El metabolismo de los microorganismos en el medio ambiente está limitado por la disponibilidad de donadores y aceptores de electrones y nutrientes esenciales como los nitratos y los fosfatos que son provistos por lo general por las plantas del medio. La cantidad de nitrato y fósforo son cuantificados en función a la biodisponibilidad de carbono en el sistema, en donde la relación C/N/P ideal es de 100/10/1; sin embargo, se han reportado relaciones de 120/10/1 y 100/40/1 (Zaidi, B. *et al.*, 1999; Sklandany, G. J. y Meeting, F. B. 1998.). Finalmente, la combinación de las características del subsuelo, contaminantes y condiciones climatológicas del sitio pueden dar lugar a los diferentes procesos de transporte y distribución de los contaminantes (Saval, B. 1995).

### **Vías metabólicas de degradación de hidrocarburos.**

En la naturaleza existen una gran cantidad de microorganismos capaces de degradar una amplia variedad de compuestos orgánicos como los hidrocarburos. Así mismo, también se han reportado varias vías metabólicas para la degradación de los compuestos más simples como el benceno, hasta los más complejos como los alquilbencenos y los aromáticos polinucleares tales como el naftaleno, fenantreno y antraceno (Atlas, R. M. y Bartha, R. 2002; Cerniglia, C. 1992).

Los estudios de reacciones de oxidación enzimática en fase orgánica se han llevado a cabo utilizando principalmente óxido-reductasas del tipo peroxidasa y mono-oxigenasa de células microbianas.

La ruptura de los anillos aromáticos está asociada a la acción de las enzimas mono-oxigenasas que al atacar al anillo aromático forman un intermediario diol y un ácido orgánico. Así mismo, existen también otras reacciones de oxidación catalizadas por peroxidasas en fase orgánica (Gibson, D. 1971.). Entre estas se destacan el sistema de oxidación por alcohol oxidasa y alcohol deshidrogenasa para oxidar una serie de alcoholes primarios a aldehidos. También se ha descrito la oxidación de fenoles por peroxidasa, fenol oxidasa y haloperoxidasa a dímeros y polímeros de fenol.

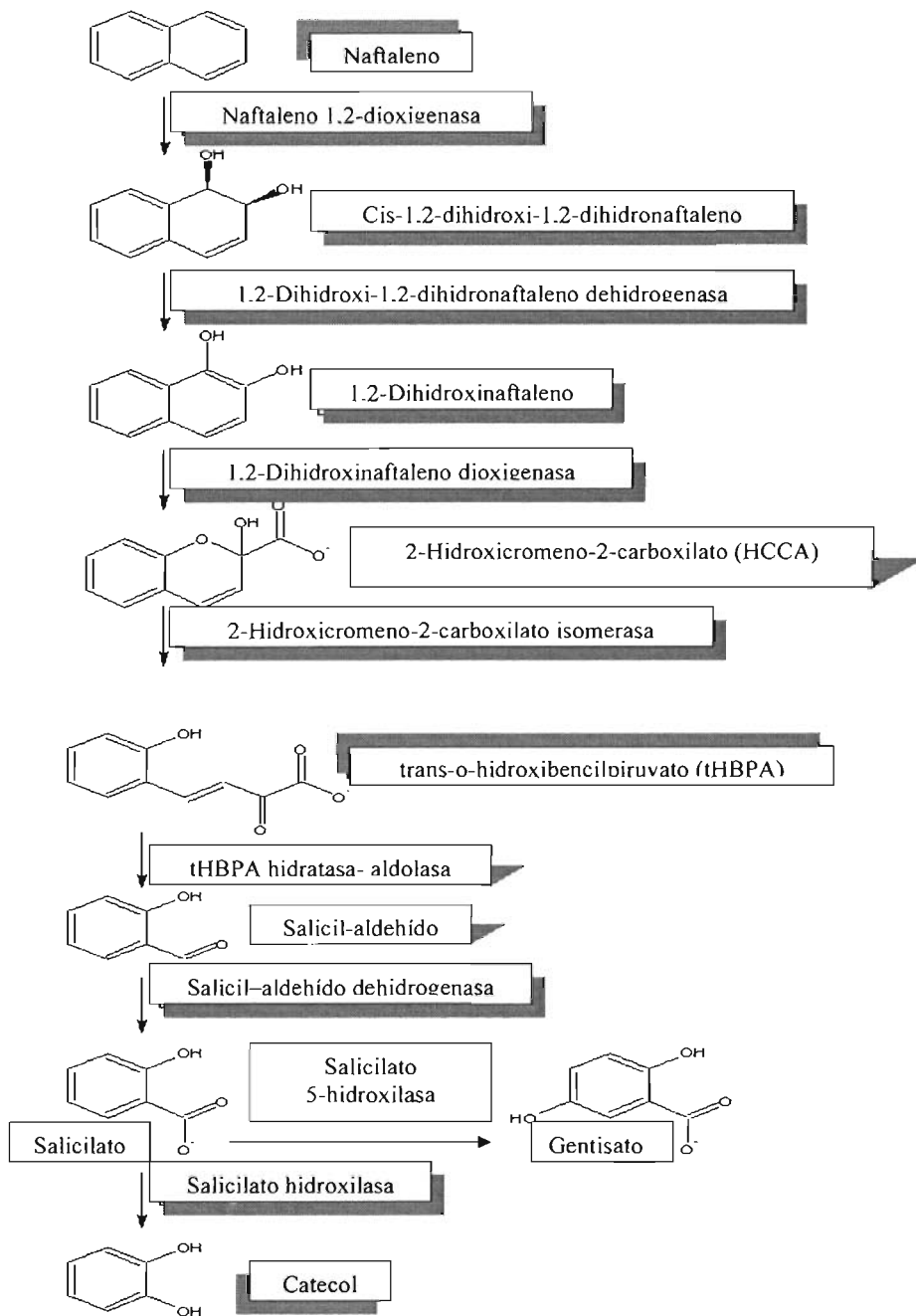
Los hidrocarburos monoaromáticos como el benceno son oxidados hasta catecol en uno o varios pasos. En el caso del catecol se utiliza una ruta metabólica que produce un semialdehído cis generándose posteriormente ácido fórmico, pirúvico y acetaldehído (Evans, P. y Young, L. 1991.).

Entre los hidrocarburos policíclicos más simples como el naftaleno, el mecanismo de biodegradación es a través de una acción enzimática por medio de dioxigenasas que forman parte de la familia de las monoxigenasas (fig.d). Las dioxigenasas catalizan reacciones análogas a las presentadas en hidrocarburos monoaromáticos como el benceno. El producto derivado de estas son los salicilatos, que son degradados vía catecol (Ridway, H., *et al.*, 1990).

Para entender con detalle todas las vías metabólicas utilizadas por los microorganismos para la degradación de hidrocarburos hace falta mucho. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que existen microorganismos que utilizan un sistema enzimático dual para un solo sustrato, el primero se activa cuando el sustrato se encuentra a bajas concentraciones y el segundo cuando éste se encuentra en altas concentraciones; el primero con alta afinidad y el segundo con poca afinidad (Skladany, G. J. y Metting, F. B. 1998.).

Figura d.

### Vía degradativa del Naftaleno.



Diversos estudios han demostrado que hay microorganismos del mismo género y especie con diferente capacidad para degradar hidrocarburos alifáticos. Esta capacidad frecuentemente se encuentra codificada en plásmidos (Chakrabarty, A. *et al.*, 1973). Los plásmidos son fragmentos pequeños de ADN circular, autónomos que se encuentran en bacterias hospederas y poseen tres características principales:

- Usualmente, confieren una ventaja fenotípica como resistencia a antibióticos.
- Con frecuencia hay una transferencia de bacteria a bacteria con alta eficacia.
- Se heredan a las células hijas.

Hoy en día se sabe que los plásmidos confieren a varias especies bacterianas la capacidad de degradar varios hidrocarburos además de otros compuestos orgánicos e inorgánicos, utilizándolos como fuente de carbono (Bingle, L. y Thomas, C. 2001; Farrell, R. y Chakrabarty, A. 1979.).

En los genes de muchos microorganismos se encuentra codificada la información para sintetizar enzimas que participan en el proceso de degradación, los genes que codifican para las dioxigenasas han sido clonados y secuenciados a partir de plásmidos que pertenecen a las familias TOL y NAH, un ejemplo es *Pseudomonas putida* que es el hospedador natural del plásmido TOL pWW0, que codifica una ruta para degradación de tolueno y xilenos, la ruta de biodegradación mejor caracterizada en la actualidad desde el punto de vista bioquímico y genético (Burlage, S. *et al.*, 1989.).

### **Importancia de los microorganismos en la biorremediación**

Un paso crítico en los procesos de biorremediación de compuestos orgánicos como los hidrocarburos es la selección adecuada de los microorganismos biodegradadores. Es importante mencionar que en la biorremediación las bacterias son los microorganismos dominantes en la degradación de hidrocarburos en sistemas acuáticos y terrestres; el papel de los hongos, levaduras y algas como degradadores de hidrocarburos parece ser menos significativo, aunque también se ha demostrado que algunas especies de hongos y algas logran metabolizar eficientemente estos contaminantes y utilizarlos como fuente de energía (Cernigliá, C. 1992; Gleeg, G. *et al.*, 1999; Yamaguchi, T. *et al.*, 1999).

En la tabla 2.8 se presentan algunas de las especies de microorganismos identificadas como degradadoras de hidrocarburos.

**Tabla 2.8 Géneros más frecuentes de microorganismos degradadores de hidrocarburos.**

GENERO Y ESPECIE	SUSTRATO
<i>Acinetobacter</i> sp.	ciclohexanol
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	fenol
<i>Alcaligenes</i> sp.	bi-fenilos
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	benzoato
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	2,4-diclorofenol oxi-acetato
<i>Bacillus brevis</i>	4-hidroxibenzoato
<i>Bacillus cereus</i>	fluorantreno
<i>Bacillus circulans</i>	4-hidroxibenzoato
<i>Bacillus laterosporus</i>	4-hidroxibenzoato
<i>Bacillus sphaericus</i>	4-nitrofenol
<i>Bacteroides fragilis</i>	1-nitropireno
<i>Burkholderia cepacia</i>	benzoato y 4-fluorobenzoato
<i>Caulobacter</i> sp.	2,4,6-triclorofenol
<i>Comamonas testosteroni</i>	4-hidroxibenzoato
<i>Delftia acidovorans</i>	Benzoato y tolueno
<i>Dehalobacter restrictus</i>	tricloroetileno (TCE)
<i>Flavobacterium</i> sp.	2,4-diclorofenol
<i>Halomonas</i> sp.	2,4-diclorofenol
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3-hidroxibenzoato
<i>Mycobacterium</i> sp.	pireno
<i>Mycobacterium gilvum</i>	fenol
<i>Nocardia</i> sp.	metil tert-butil eter (MTBE)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	naftaleno y orto-xileno
<i>Pseudomonas putida</i>	naftaleno y fenol
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Tolueno
<i>Ralstonia</i> sp.	4-fluorobenzoato
<i>Rhodococcus opacus</i>	benzoato
<i>Rhodococcus</i> sp.	Tolueno
<i>Sphingomonas</i> sp.	Diclorofenol
<i>Staphylococcus auriculans</i>	dibenzofurano y fluoreno
<i>Streptomyces</i> sp.	2- dimetilnaftaleno
<i>Terrabacter</i> sp.	Bifenil - dibenzofurano
<i>Xanthobacter</i> sp.	tricloroetileno (TCE)
<i>Zooglea</i> sp.	2,3,4,6-tetraclorofenol

Fuentes; Cerniglia, C. 1992; Glegg, G. *et al.*, 1999 y Yamaguchi, T. *et al.*, 1999.

Los estudios de biorremediación se realizan tanto con cepas nativas como con aquellas mejoradas en el laboratorio. Estas investigaciones van encaminadas primeramente, a identificar las estrategias más efectivas de biorremediación, ya que existen trabajos encaminados en saber cuales tipos de bacterias trabajan mejor, si las nativas o las mejoradas.

El inconveniente del aislamiento de las cepas nativas es que sólo es posible aislar una pequeña fracción de toda la diversidad existente en la zona contaminada. Idealmente, los microorganismos deben degradar los contaminantes y no ser patógenos para el hombre.

Actualmente, la biorremediación como un proceso biológico convencional, en la mayoría de los casos no es suficientemente eficaz para eliminar a niveles aceptables la contaminación por hidrocarburos, a pesar de que su gran ventaja es ser un proceso natural y relativamente bajo en costos; para lograr que sea completamente efectiva es necesario seguir con los estudios de los microorganismos que realizan este proceso y los diferentes tratamientos.

### **Espectroscopia de infrarrojo como método auxiliar en estudios de biorremediación.**

La espectroscopia molecular se basa en la interacción entre la radiación electromagnética y las moléculas. Dependiendo de la región del espectro en la que se trabaje y por tanto de la energía de la radiación utilizada (caracterizada por su longitud o número de onda), esta interacción será de diferente naturaleza: excitación de electrones, vibraciones moleculares y rotaciones moleculares (Schewedt, G. 1997).

La molécula, al absorber la radiación infrarroja, cambia su estado de energía vibracional y rotacional. Las transiciones entre dos estados rotacionales requiere muy poca energía, por lo que solo es posible observarlas específicamente en el caso de muestras gaseosas. En el caso del estudio del espectro infrarrojo (IR) de muestras sólidas y líquidas sólo se tienen en cuenta los cambios entre estados de energía vibracional (Osborne, B. *et al.*, 1993.).

El espectro de infrarrojo se produce como consecuencia de transiciones entre niveles de energía en los que el número cuántico vibracional ( $\nu$ ) cambia en una unidad ( $\nu=\pm 1$ ), denominada banda fundamental, o en más de una unidad ( $\nu=\pm 2, \pm 3, \dots$ ), que se denominan sobretonos (Hollas, J. 1992). Los modos de vibración que se pueden producir incluyen: cambios en la distancia de enlace (elongaciones o stretching, que pueden ser simétricas o asimétricas) y cambios en el ángulo de enlace, o bending (simétricas en el plano, asimétricas en el plano, simétricas fuera del plano y asimétricas fuera del plano) (Silverstein, R. y Webster, F. 1998.).

### Regiones espectrales.

Aunque el espectro infrarrojo se extiende desde 10 a 14300 ondas por  $\text{cm}^{-1}$ , desde un punto de vista funcional se divide en tres zonas o regiones (tabla 2.9): IR lejano, donde se producen las absorciones debidas a cambios rotacionales, el IR medio (MIR o simplemente, IR); donde tienen lugar las vibraciones fundamentales y el IR cercano (near infrared, NIR), donde se producen absorciones debidas a sobretonos y combinaciones de las bandas fundamentales.

**Tabla 2.9 División del espectro IR.**

Región	Transición Característica	Longitud de Onda (nm)	Número de Onda ( $\text{cm}^{-1}$ )
Infrarrojo cercano (NIR)	Sobretonos y combinaciones	700 - 2500	14300 - 4000
Infrarrojo medio (IR)	Vibraciones fundamentales	2500 - $5 \times 10^4$	4000 - 200
Infrarrojo lejano	Rotaciones	$5 \times 10^4 - 10^6$	200 - 10

Cuando la radiación incide en la muestra, ésta puede sufrir diferentes fenómenos: absorción, transmisión y reflexión. La medida más común en el infrarrojo es la que se basa en la absorción (o la intensidad transmitida), aunque también se han desarrollado espectroscopias basadas en el fenómeno de la reflexión como son la reflectancia total atenuada y la reflectancia difusa.



### Absorción/Transmisión.

El espectro por transmisión o transmitancia,  $T$ , se calcula como la fracción de radiación ( $P_T/P_0$ ) transmitida a través de la muestra. La intensidad de absorción de la luz, absorbancia ( $A$ ) se calcula como:

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P_T}$$

La representación de la transmitancia o de la absorbancia como una función de la longitud de onda ( $\lambda$ ), o del número de onda ( $\nu$ ), es lo que conforma el espectro de la muestra. La relación que existe entre la concentración y la absorbancia está descrita por la ley de Lambert-Beer:  $A = \epsilon c l$

### Reflectancia total atenuada (attenuated total reflectance, ATR).

El principio de esta medida se basa en el fenómeno de la reflexión total interna y la transmisión de la luz a través de un cristal con un elevado índice de refracción (Fig. e). La radiación penetra (unos  $\mu\text{m}$ ) más allá de la superficie del cristal donde se produce la reflexión total, en forma de onda evanescente (Rubinson, K. y Rubinson, J. 2001.).

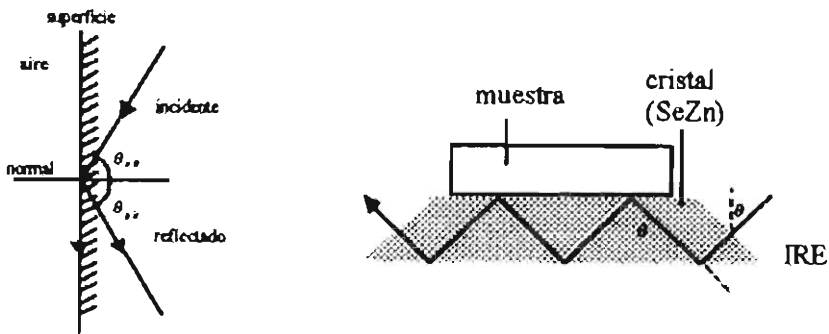


Fig. e. Reflexión total interna y elemento de reflexión interna (IRE) utilizado en el sistema ATR.

Si en el lado exterior del cristal se coloca un material absorbente (muestra), la luz que viaja a través del cristal se verá atenuada (de ahí el nombre de la técnica) y se puede registrar el espectro de la muestra. El ángulo de la luz incidente y la geometría del cristal facilitan que se produzcan sucesivas reflexiones en sus caras internas. El espectro medido tiene una apariencia similar al espectro de transmisión, excepto por ciertas variaciones en la intensidad en función de la longitud de onda que se producen. Esta técnica de muestreo es muy efectiva para el análisis de sólidos y líquidos, especialmente en las regiones del infrarrojo medio y del infrarrojo cercano (Rubinson, K. y Rubinson, J. 2001.).

Para obtener medidas adecuadas es necesario que exista un contacto íntimo entre la muestra y el cristal del ATR, por lo que esta técnica se utiliza sobretodo en líquidos o en sólidos que se puedan compactar contra el cristal aplicando presión (Rubinson, K. y Rubinson, J. 2001.).

### **Interpretación de los Espectros.**

En el espectro infrarrojo medio, entre 4000 y 1300 onda por  $\text{cm}^{-1}$  (región de frecuencias de grupo) se observan una serie de bandas asignadas a vibraciones de sólo dos átomos de la molécula. En este caso la banda de absorción se asocia únicamente a un grupo funcional y a la estructura molecular completa, aunque hay influencias estructurales que provocan desplazamientos significativos en la frecuencia de la vibración (Cross, A. 1992).

Estas vibraciones derivan de grupos que contienen hidrógeno (C-H, O-H, y N-H) o grupos con dobles y triples enlaces aislados. Entre 1300 y 400  $\text{cm}^{-1}$  la asignación a grupos funcionales determinados es más difícil debido a la multiplicidad de bandas, pero es una zona de espectro muy útil para la identificación de compuestos específicos (Keller, R. *et al.*, 1998.). La Fig. f muestra un cuadro resumen de las frecuencias de absorción de los grupos funcionales más comunes en el IR medio.

En el espectro de infrarrojo cercano, predominan las bandas debidas a sobretonos y combinaciones de enlaces en los que participa el hidrógeno ( debido a que aumenta el grado de an-armonicidad de la vibración). La Fig. g, muestra un cuadro resumen de las absorciones más habituales en el infrarrojo cercano (Cross, A. 1992).

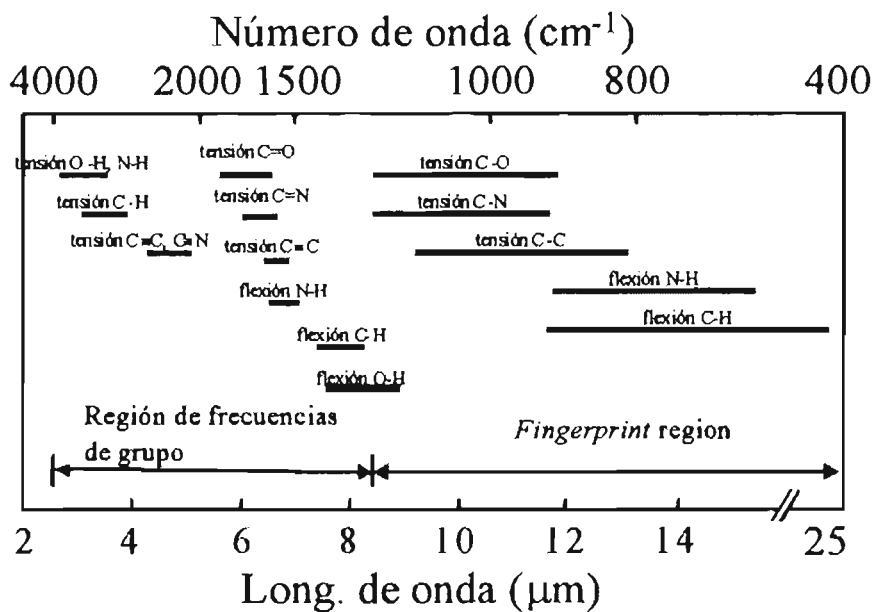


Fig. f. Frecuencias de vibración en el infrarrojo medio.

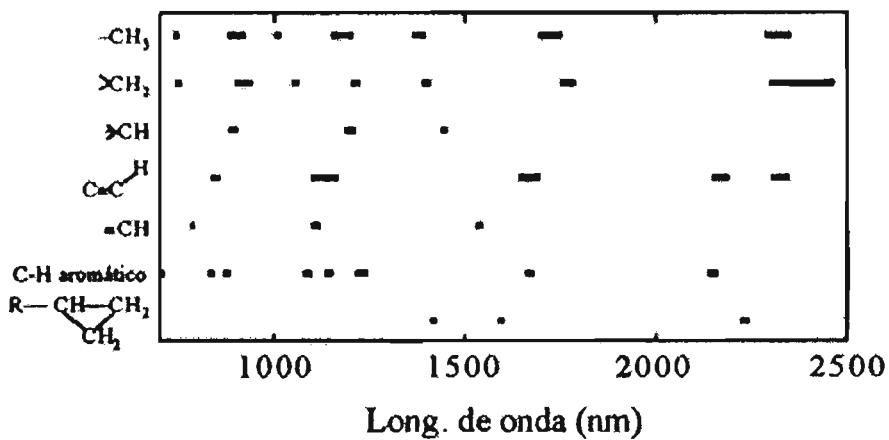


Fig. g. Frecuencias de vibración en el infrarrojo cercano.

En el NIR las bandas de absorción no están tan bien definidas como en el infrarrojo medio, apareciendo en forma de bandas ancha y solapadas entre sí, por lo que es más difícil realizar una asignación a un componente o grupo funcional concreto de la muestra. Las bandas tienen una menor intensidad (la absorptividad de la muestra es menor), por lo que se debe trabajar con caminos ópticos más largos, de 0.5 a 10 mm, frente a los 10-50  $\mu\text{m}$  utilizados en el infrarrojo medio.

## **Justificación.**

Actualmente, existe un creciente interés en la biorremediación como una herramienta importante para mitigar los problemas ambientales causados por la contaminación con hidrocarburos en nuestro país. Sin embargo, en México, las investigaciones encaminadas a identificar y evaluar microorganismos que degraden eficazmente el petróleo crudo y sus derivados son pocas, y los recursos para su estudio insuficientes.

Por tal motivo, con base en lo descrito anteriormente y con el fin de que esta investigación aporte más información acerca de microorganismos nativos capaces de degradar hidrocarburos, y teniendo la seguridad de que este proceso natural tendrá una mayor eficacia con una mejor utilización a corto plazo, el desarrollo de este trabajo está enfocado hacia la investigación de bacterias aisladas de suelo contaminado por petróleo crudo, a través del estudio de su crecimiento en un medio líquido conteniendo hidrocarburos como única fuente de carbono, de la determinación de sus preferencias hacia cierto tipo de hidrocarburos mediante el método de espectroscopia de infrarrojo con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR) y la relación de su capacidad degradadora con las proteínas expresadas y la presencia de plásmidos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **Objetivo General**

Aislar y caracterizar bacterias de una muestra de suelo contaminado por petróleo crudo en la planta de PEMEX en Poza Rica, Veracruz, y comprobar y comparar su capacidad de degradación de dos mezclas de hidrocarburos como única fuente de carbono en un medio líquido.

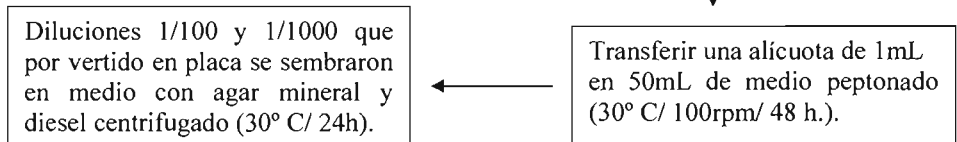
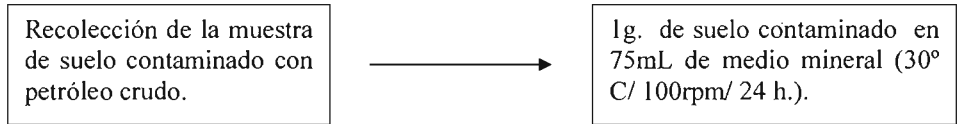
#### **Objetivos Particulares**

- Aislar las bacterias presentes en la muestra de suelo contaminado capaces de utilizar petróleo ligero y diesel centrifugado como única fuente de carbono.
- Caracterizar bioquímicamente las bacterias aisladas.
- Comprobar y comparar su capacidad de degradación individualmente y en conjunto por métodos espectrofotométricos (UV-Vis y FTIR-ATR).
- Analizar el patrón electroforético de las proteínas de las bacterias aisladas.
- Determinar si las bacterias aisladas son portadoras de un plásmido, el cual pudiera conferirles la capacidad de degradación.

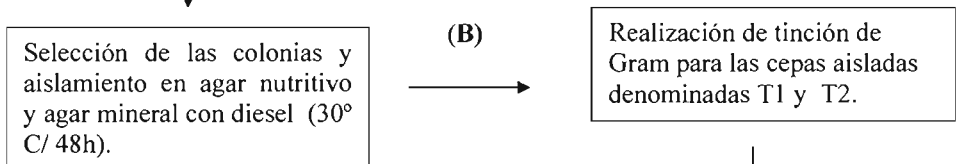
#### 4. MATERIAL Y MÉTODO

##### Diagrama de Flujo

(A)



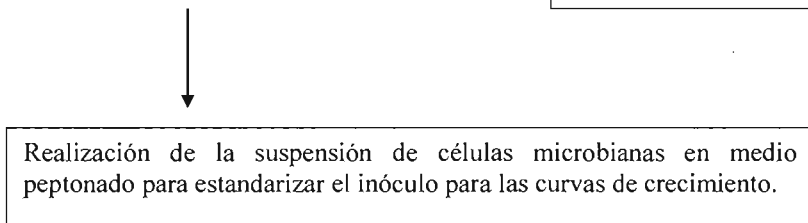
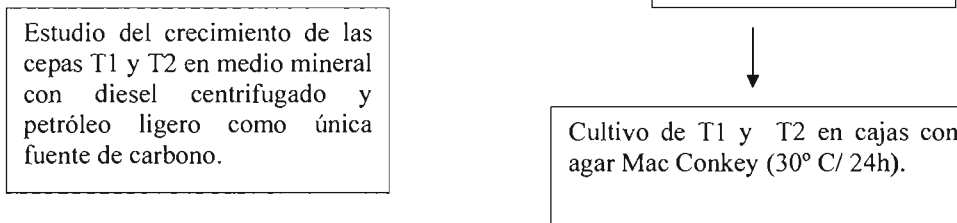
**Aislamiento**

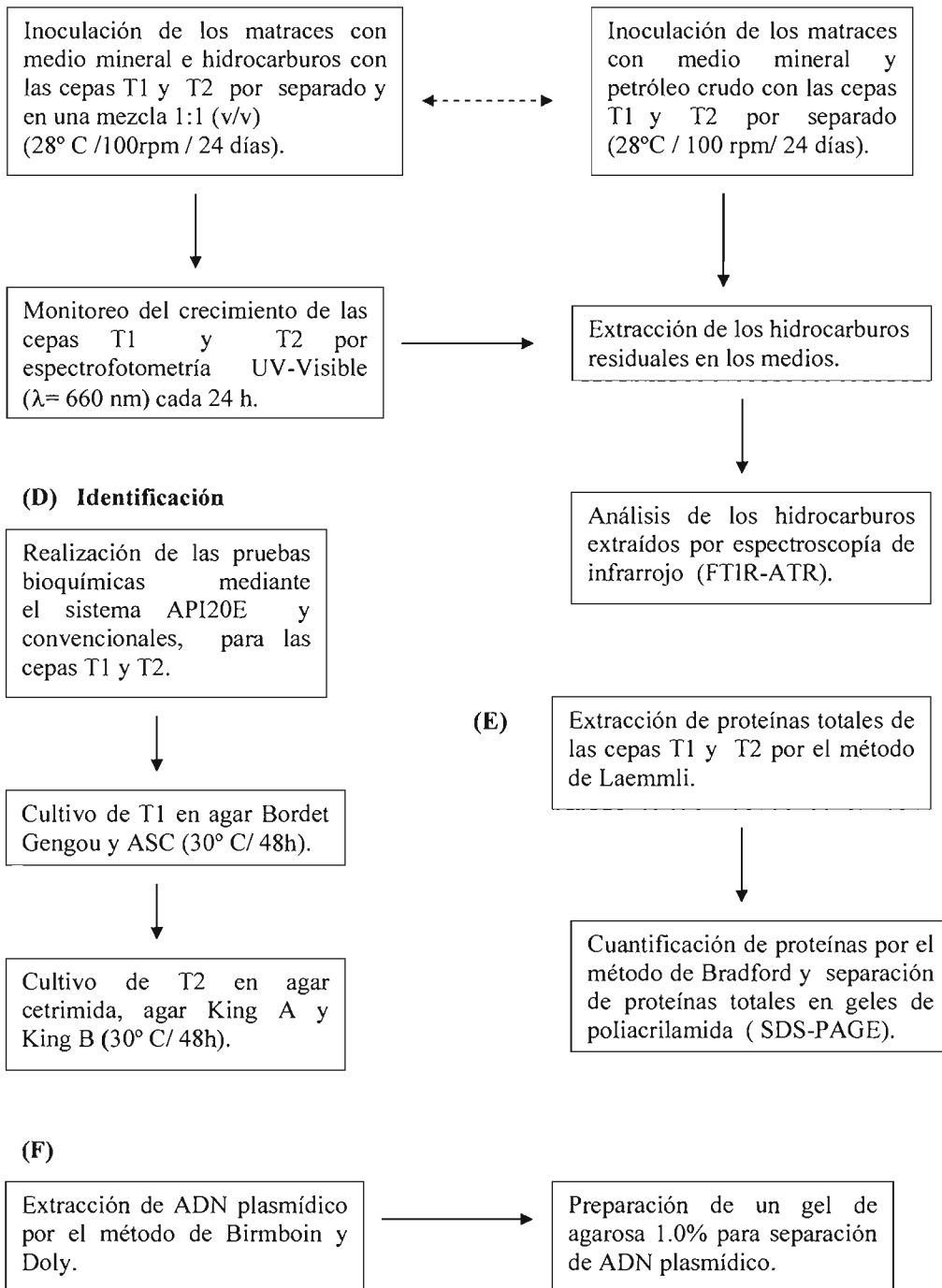


**Caracterización primaria**



(C)







### **Obtención de la muestra de suelo.**

El aislamiento de las bacterias se realizó a partir de una muestra de suelo contaminado con petróleo crudo. La muestra provino de la planta de PEMEX de Poza Rica, Veracruz.

El suelo contaminado tiene aspecto de arcilla húmeda, de color oscuro y con fuerte olor a hidrocarburos. La recolección de la muestra del suelo contaminado se realizó en un área que presenta vegetación a sus alrededores, a una profundidad de 15 a 20 cm, en donde las poblaciones microbianas asociadas a las raíces de las plantas son muchas y muy variadas (Atlas, R. y Bartha, R. 2002). Posteriormente la muestra se guardó en un recipiente estéril y se conservó en refrigeración hasta su tratamiento.

### **Aislamiento y caracterización de bacterias a partir de una muestra ambiental de suelo contaminado por hidrocarburos .**

Se pesó 1g de la muestra de suelo contaminado, se suspendió en 75ml de medio mineral\* y se incubó a 30° C con agitación de 100 rpm por 24 horas en una incubadora con agitación orbital New Brunswick Scientific Co., Inc. modelo G25. De la muestra resuspendida en el medio se transfirió una alícuota de 1mL. a 50 mL. de medio peptonado y se incubó a 30° C a 100 rpm por 48 horas para tener un crecimiento abundante. Posteriormente, se realizaron diluciones 1/100 y 1/1000 en medio mineral y se realizó la siembra en agar con medio mineral y diesel centrifugado por el método de vertido en placa. Las placas se incubaron a 30° C por 24.

Dos colonias diferentes que presentaron predominancia y por sus características microscópicas fueron seleccionadas y cultivadas por separado en agar nutritivo y agar mineral\* con diesel centrifugado por la técnica de cuadrante radial incubándolas a 30° C durante 48 horas.

\* Ver Anexo

A las cepas seleccionadas se les denominó para fines prácticos T1 y T2. Para su caracterización se realizó la tinción de Gram a cada una y a la cepa T1 se le realizó la tinción de cápsula debido a la dificultad que presentó para retener el colorante de contraste en la tinción de Gram. Posteriormente, se cultivaron en agar Mac Conkey incubándolas a 30° C por 24 horas.

#### **Determinación del crecimiento de las bacterias en medio líquido con hidrocarburos.**

Para el estudio del crecimiento se realizó una suspensión de las células microbianas en un medio peptonado\*, la concentración microbiana de cada muestra fue estimada tomando 10  $\mu$ L de la suspensión bacteriana y transfiriéndolos a 990  $\mu$ L de medio mineral realizando lecturas mediante espectrofotometría ( $\lambda = 660$  nm) utilizando como blanco medio mineral, esto con el fin de estandarizar el inóculo para las curvas de crecimiento, de manera que al tiempo cero todos los matraces tuvieran una concentración inicial de 0.05 de absorbancia en cada 100 mL de medio mineral\*. Una vez inoculados los matraces, a cada uno se les adicionó la cantidad necesaria de diesel centrifugado tratado con peróxido de hidrógeno, o de petróleo ligero, para tener una concentración final de 1%, 1.5% y 2.5% (v/v) respectivamente (Zaidi, B. e Imam, S. 1999).

Posteriormente, se evaluó el crecimiento de las cepas bacterianas en los diferentes tratamientos tomando lecturas de absorbancias a 660 nm, por triplicado cada 24 horas en un espectrofotómetro UV-Vis Pharmacia LKB, utilizando como blanco medio mineral. Se evaluaron características culturales como motilidad y uniformidad celular por observación bajo el microscopio de campo oscuro y se realizaron controles de pureza a los cultivos mediante tinción de Gram y siembra en agar nutritivo y agar Mac Conkey.

\* Ver Anexo

Se sabe que el diesel es un compuesto hidrófobo que se disuelve poco en agua por lo que se decidió tratarlo previamente con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Este es comúnmente utilizado en sistemas de biorremediación ya que el oxígeno molecular es ligeramente soluble en agua (8mg/l a 20° C), lo que limita su uso como aceptor de electrones (Chapelle, F. H. 1999). Por consiguiente, el uso de peróxido de hidrógeno ayuda en el rompimiento de enlaces durante el proceso de degradación de diesel (Zaidi, B. e Imam, S. 1999.).

Utilizando la suspensión estandarizada de cada una de las cepas bacterianas se realizó una mezcla 1:1 (v/v) que también fue evaluada de igual manera y bajo las mismas condiciones que los matraces con las cepas por separado.

Los matraces se incubaron a 28° C a 100 rpm en una incubadora con agitación orbital New Brunswick Scientific Co., Inc. modelo G25, se muestrearon cada 24 horas durante un periodo de 30 días. Se compararon las curvas de crecimiento y se evaluó el efecto de la concentración de la fuente de carbono en el crecimiento de las cepas bacterianas aisladas.

Se realizaron curvas control en medio mineral utilizando peptona al 0.5% como fuente de carbono y bajo las mismas condiciones de cultivo que los matraces con diesel centrifugado y petróleo ligero. Estas muestras se leyeron a 660 nm utilizando como blanco medio peptonado\* fresco.

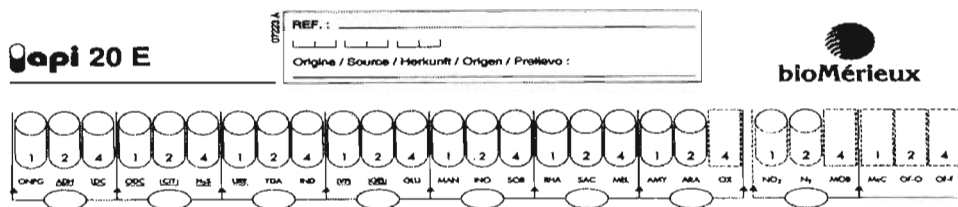
### **Identificación de las bacterias.**

Las cepas aisladas se identificaron mediante el sistema API 20E (BioMérieux) para bacilos no fermentadores. Este sistema consta de 20 pruebas bioquímicas estandarizadas y miniaturizadas para la identificación de bacilos Gram negativos, además se realizaron las pruebas bioquímicas convencionales, con el fin de complementar los resultados del sistema API 20E.

Los microorganismos a identificar fueron inoculados en placas con agar Mac Conkey, de donde se tomó una colonia aislada de cada una de las placas, se suspendió cada una en 5mL de solución salina al 0.85% y se homogeneizó cuidadosamente.

El sistema que contiene 20 cápsulas con los substratos deshidratados fue inoculado con la suspensión bacteriana, la cual hidrata el medio y durante la incubación a 37° C por 24 horas se producen cambios de coloración en cada una de las cápsulas por la acción microbiana sobre los sustratos que contienen. Estas pruebas se realizaron por triplicado.

Después del periodo de incubación se procede a leer el resultado de las reacciones efectuadas en las cápsulas con ayuda de la tabla de lectura, la identificación se obtiene a partir del perfil numérico de la hoja de resultados donde las pruebas están separadas en grupos de tres con valores de 1, 2 y 4 para cada uno (fig. h). Mediante un programa informático (versión 4.0) incluido en este sistema se registran los resultados positivos o negativos en cada prueba y mediante un análisis estadístico automatizado se realiza la identificación de los microorganismos en estudio.



**Figura h.** Esquema de la tabla de lectura del sistema API 20E.

La identificación de las cepas aisladas se confirmó utilizando medios selectivos y diferenciales. Para el caso de la cepa T1 se realizaron cultivos en agar Bordet Gengou y agar sangre de carnero (ASC) y se incubaron a 30° C por 48 horas. Para la cepa T2 se realizaron cultivos en agar cetrimida y en los medios para pseudomonas King A y King B, se incubaron a 30° C por 48 horas.

### **Espectroscopía de infrarrojo con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR).**

Las muestras para el análisis de espectroscopía de infrarrojo con reflectancia total atenuada fueron tratadas de igual manera que para el monitoreo del crecimiento descrito anteriormente, es decir, previa realización de una suspensión de las células microbianas en medio peptonado\*, estandarizando el inóculo realizando una curva patrón mediante espectrofotometría ( $\lambda = 660 \text{ nm}$ ) utilizando como blanco medio mineral, de tal manera que al tiempo cero todos los matraces tuvieran una concentración inicial de 0.05 de absorbancia en cada 100 mL de medio mineral\* con petróleo ligero, diesel centrifugado y crudo al 1.5% (v/v) respectivamente. Los matraces inoculados se incubaron a 28° C y con agitación constante. Posteriormente, a los 21 días de ser inoculados se realizó una extracción de los hidrocarburos residuales contenidos en el medio de cada uno de los matraces.

Los hidrocarburos en cada uno de los medios fueron extraídos utilizando cloroformo como extractante, se tomaron 3 mL de cada uno de los medios y se les agregó 1.5 mL de cloroformo agitándolos vigorosamente por 3 min, esta operación se realizó por duplicado para cada muestra y por cada matraz se tomaron tres muestras.

Los extractos de las tres muestras de cada matraz fueron colectados en un mismo matraz volumétrico de 10 mL. Los matraces se aforaron con cloroformo y se almacenaron en refrigeración a -20° C para un análisis posterior. Así mismo, se realizó el análisis de espectroscopía de infrarrojo para el diesel centrifugado, el petróleo ligero y crudo (controles) con el mismo tratamiento que se les dio a los matraces inoculados con las cepas aisladas, es decir, a matraces con 100 mL de medio mineral se les adicionó la cantidad necesaria de hidrocarburos para tener una concentración de 1.5% (v/v). Posteriormente, fueron incubados por 21 días a 28° C con agitación constante, al término de éste periodo los hidrocarburos fueron extraídos utilizando cloroformo, como se describe en el párrafo anterior.

\* Ver Anexo

El análisis de infrarrojo con reflectancia total atenuada se realizó con una resolución de  $4\text{cm}^{-1}$  y 20 scans por punto en un equipo Spectrum GX FT-IR System de Perkin Elmer y un ATR DuraSampIR II SensIR Technologies, en el Laboratorio de Métodos de Separación del Departamento de Química Analítica a cargo del Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel en la división de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM.

#### **Extracción de Proteínas Totales por el método de Laemmli.**

De los matraces con medio mineral\* con diesel centrifugado o petróleo ligero se tomaron alícuotas de 1.5 mL y se centrifugaron a 10 000 rpm por 4 min. desechando el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 1 mL de agua destilada y se centrifugó a 10 000 rpm por 1 min. eliminando el sobrenadante para posteriormente resuspender el pellet en 4 mL de buffer de muestra\*, después se colocó en baño maría a ebullición durante 3 min. y se centrifugó por 5 min. a 10 000 rpm recuperando el sobrenadante.

Para cada una de las cepas bacterianas se realizó un control cultivando las cepas en medio peptonado tratadas de igual manera que la de las muestras con hidrocarburo. Una vez obtenidas las proteínas de cada uno de los cultivos en medio mineral y medio peptonado, se evaluó el patrón electroforético de las proteínas expresadas en la degradación del diesel y del petróleo comparando dicho patrón.

#### **Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.**

Se cuantificó la cantidad de proteínas contenidas en  $1\mu\text{L}$  de la muestra por el método de Bradford, basado en la preparación de una curva de albúmina, la cual con el reactivo de Bradford realiza una reacción colorimétrica, que se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. Para la calibración del aparato se utilizó un blanco que contenía todos los reactivos excepto la albúmina, el procedimiento para preparar la curva patrón se muestra en la tabla 4.1 y los resultados de la curva patrón se muestran en la tabla 4.2.

**Tabla 4.1 Método de preparación de la curva patrón Bradford.**

Muestra	Albúmina (μL)	Tris-HCl 50mM (pH 7.8)	Reactivo Bradford (μL)	Total (μL)
1	2	798	200	1000
2	4	796	200	1000
3	6	794	200	1000
5	8	792	200	1000
6	10	790	200	1000
7	15	785	200	1000
8	20	780	200	1000
Blanco	0	800	200	1000

**Tabla 4.2 Curva patrón Bradford por triplicado.**

Muestra (μL)	Absorbancias	Absorbancias	Absorbancias	Promedio
2	0.008	0.025	0.029	0.0206
4	0.039	0.078	0.038	0.0516
6	0.043	0.100	0.085	0.0760
8	0.069	0.108	0.119	0.0986
10	0.087	0.127	0.124	0.1126
15	0.146	0.138	0.133	0.1390
20	0.198	0.143	0.201	0.1806
Blanco	0	0	0	0

**Separación de proteínas totales en geles de poliacrilamida (PAGE).**

Para el análisis electroforético de las proteínas se utilizaron geles desnaturizantes de poliacrilamida, al 12.5% para el gel separador y de 6.0% para el gel concentrador.\* Una vez preparados los geles y montados en la cámara de electroforesis se cargaron de 10 a 15 μL de muestra con una décima parte del buffer de carga, la corrida se realizó a 150 volts para el gel concentrador y 180 volts para el gel separador\*.

### **Extracción de ADN plasmídico.**

La extracción de ADN plasmídico se realizó utilizando la técnica de Birnboim y Doly (1979). Se cultivaron las cepas en 5 mL de medio Luria\* durante 24 hrs. a 30° C, se tomó una alícuota de 1.5 mL del cultivo y se centrifugó a 10,000rpm a 4° C durante 1min decantando para dejar lo más seco posible el pellet y repitiendo esta operación tres veces más hasta obtener un pellet grande para obtener la mayor cantidad de ADN plasmídico.

El pellet se resuspendió en 100 µL de solución I\* fría mezclando e incubando las muestras por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 200 µL de solución II\* fresca mezclando por inversión e incubando 10 min en hielo, después se agregó 150 µL de solución III\* fría mezclando por inversión e incubando por 15 min en hielo. Se centrifugó por 5 min. a 10 000 rpm recuperando el sobrenadante, a éste se le agregó un volumen igual de fenol/cloroformo (1:1) saturado con buffer TE\* mezclando vigorosamente para posteriormente centrifugar la mezcla 30 s.

Se recuperó la fase acuosa y se agregó 2.5 veces el volumen de etanol absoluto, se incubó a -70° C por 5 min y se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min. Se decantó la muestra y el pellet se lavó con 100 µL de etanol al 70% para después centrifugar 3 min a 10,000 rpm. Se secó el pellet y se resuspendió con 20µL de agua destilada estéril. Se utilizó como control la cepa 49766 de *E. coli* la cual posee un plásmido y a la cual se le aplicó el mismo tratamiento que a las cepas T1 y T2.

Se preparó un gel de agarosa (1%) que se cargó con 8µL de ADN plasmídico de cada muestra, 1µL de buffer de carga y 1µL de H<sub>2</sub>O destilada estéril. El gel se corrió a 120 volts en buffer Tris – Boratos (0.5x).

\* Ver Anexo



## 5. RESULTADOS Y DISCUSION

La muestra de suelo contaminada despedía un fuerte olor a hidrocarburo, sus características más notables eran su color oscuro, casi negro y una textura arcillosa, como se menciona en la metodología.

La selección de bacilos Gram negativos para desarrollar este trabajo de investigación se basó en el crecimiento predominante y morfología colonial además de que en la mayor parte de las referencias bibliográficas encontradas mencionan la gran eficacia de este tipo de microorganismos en la degradación de hidrocarburos (Watanabe, K. 2001; Hamman, C. *et al.*, 1999; Shields, M. *et al.*, 1985).

### **Aislamiento de bacterias que degradan hidrocarburos.**

De las diluciones 1/100 y 1/1000 efectuadas a partir de la suspensión de la muestra de suelo en medio mineral, se realizó un vertido en placa en agar con medio mineral y diesel centrifugado como única fuente de carbono. De éstas placas se seleccionaron dos colonias diferentes entre sí, que presentaron mayor predominancia y se aislaron en agar nutritivo y agar con medio mineral y diesel centrifugado. Se realizó la tinción de Gram\* a las colonias seleccionadas y se les denominó T1 y T2 para fines prácticos, posteriormente fueron crecidas en agar Mac Conkey. Las tablas 5.1 y 5.2 muestran los resultados obtenidos de los análisis realizados a las colonias seleccionadas en los diferentes medios de cultivo.

**Tabla 5.1. Características microscópicas y de crecimiento.**

<b>Colonia</b>	<b>Crecimiento de las bacterias en diferentes medios de cultivo</b>	<b>Características microscópicas</b>
T1	Agar mineral diesel: Crecimiento abundante. Agar nutritivo: Crecimiento moderado. Agar Mac Conkey: Crecimiento escaso.	Bacilos cortos (cocobacilos) Gram negativos solos y en pares
T2	Agar mineral diesel: Crecimiento abundante. Agar nutritivo: Crecimiento abundante Agar Mac Conkey: Crecimiento abundante.	Bacilos medianos a largos Gram negativos agrupados irregularmente y en cadenas.

**Tabla 5.2. Morfología colonial de las cepas T1 y T2 en agar nutritivo.**

Cepa	Morfología Colonial
T1	Colonias pequeñas de 1mm de diámetro, redondas, con bordes regulares de color blanco traslúcido.
T2	Colonias planas, medianas y presentan márgenes lacerados, color gris-tornasol con pigmento amarillo verdoso y un olor a tortilla húmeda

El método de aislamiento dio resultados importantes para la caracterización primaria de las colonias aisladas. Posteriormente se procedió a la identificación de las cepas por medio de las pruebas bioquímicas y a estudiar su crecimiento en medio mineral con hidrocarburos.

#### **Identificación de bacterias degradadoras de hidrocarburos.**

Hoy en día existen métodos muy eficientes para la identificación de microorganismos, los cuales tienen las características de ser rápidos, con mayor sensibilidad y exactitud en los resultados y más fáciles de utilizar. Un ejemplo de estos métodos es el sistema API 20E empleado en este trabajo para la identificación de los microorganismos seleccionados. Adicionalmente, pruebas bioquímicas convencionales también fueron realizadas y los resultados de ambos sistemas se muestran en la tabla 5.3.

Para la identificación de la cepa T1 se tomaron en cuenta la morfología colonial, las observaciones microscópicas, la movilidad y los resultados de las pruebas bioquímicas convencionales y el sistema API 20E. Sin embargo, los resultados confirmativos para el género se obtuvieron al cultivar la cepa en agar Bordet Gengou\* y en agar sangre de cordero\* (Tabla 5.4), lo que sugiere que la cepa T1 corresponde al género *Bordetella*.

La cepa T2 se identificó con base a los resultados de las observaciones microscópicas, su morfología colonial, la producción de pigmentos, su olor característico y su movilidad. Todo lo anterior aunado al resultado de las pruebas bioquímicas convencionales, el sistema API 20E y las pruebas confirmativas obtenidas en los cultivos de la cepa en agar cetrinida, agar King A y agar King B (Tabla 5.4), concluimos que se trata de *Pseudomonas aeruginosa*.

**Tabla 5.3. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas por triplicado con las tiras API 20E a las cepas aisladas.**

<b>Prueba</b>	<b>Colonia T1</b>	<b>Colonia T2</b>
<b>Bioquímica</b>		
ONPG	-	-
Arginina	-	+
Lisina	-	-
Ortinina	-	-
Citrato	+	+
Sulfuro de hidrógeno	-	-
Ureasa	+*	v
Triptofano desaminasa	-	-
Indol	-	-
Voges Proskauer	-	-
Gelatina	-	+
Glucosa	-	+
Manitol	-	v
Inositol	-	-
Sorbitol	-	-
Ramnosa	-	-
Sacarosa	-	-
Melibiosa	-	-
Amigdalina	-	-
Arabinosa	-	-
Oxidasa	+	+
OF- O	+	+
McC	+	+
Movilidad	+	+
Aerobios estrictos	+	+
Catalasa	+	+

(+) Positivo, (-) Negativo, (V) Variable. \* Resultado rápido.

**Tabla 5.4. Características culturales en medios de cultivo selectivos y diferenciales.**

Medios de Cultivo	<i>Bordetella sp.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Agar sangre de cordero	Colonias de un color blanco grisáceo, un tanto mate y hemólisis.	-----
Agar Bordet Gengou	Colonias de un color gris brillante y hemólisis.	-----
Agar cetrimida	-----	Colonias de color verdosas fluorescentes grades y rugosas.
Agar King A	-----	Producción de pigmento azul verdoso (piocianina) en el agar.
Agar King B	-----	Pigmento amarillo verdoso fluorescente en el agar. cuando es expuesto a la luz UV.



Fotografía del cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* en agar cetrimida.



Fotografía del cultivo de *Bordetella sp.* en agar Bordet Gengou.

### Curvas de crecimiento de las bacterias en medio mineral con hidrocarburos.

La biorremediación como una tecnología en desarrollo ha demostrado que muchos de los contaminantes más susceptibles a la biodegradación por bacterias son los hidrocarburos (Bidleman, T. *et al.*, 1990.).

Sin embargo, para que las bacterias puedan utilizar los hidrocarburos como fuente de carbono es necesario que exista la cantidad necesaria de sales minerales y micronutrientes para llevar a cabo sus procesos metabólicos. Se han reportado estudios acerca de las concentraciones de sales minerales y micronutrientes utilizadas para bacterias Gram negativas degradadoras de hidrocarburos (Zaidi, B. e Imam, S. 1999.).

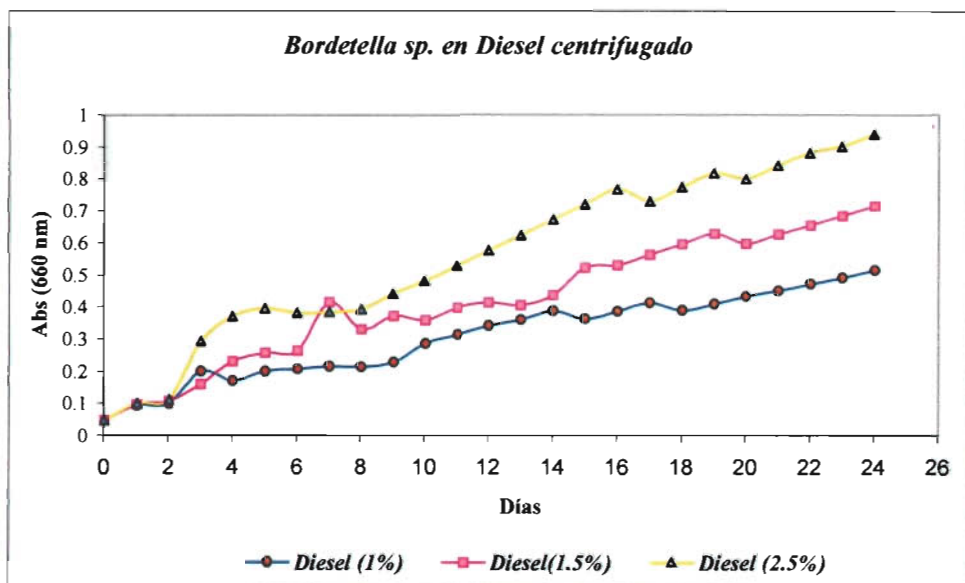
Para corroborar que las colonias aisladas presentaban la capacidad de degradar el diesel centrifugado y el petróleo ligero, se realizaron curvas de crecimiento con éstos hidrocarburos como única fuente de carbono en el medio y se utilizaron los mismos compuestos reportados en la publicación de Zaidi e Imam (1999) para la preparación del medio mineral, pero se modificaron las concentraciones de algunas de las sales y micronutrientes\* .

Como primer paso se determinó la velocidad de crecimiento de la cepa T1 identificada como *Bordetella sp.* en medio mineral con diesel centrifugado y petróleo ligero como única fuente de carbono a las concentraciones de 1.0%, 1.5% y 2.0% (v/v) respectivamente como se muestra en las figuras 1 y 2.

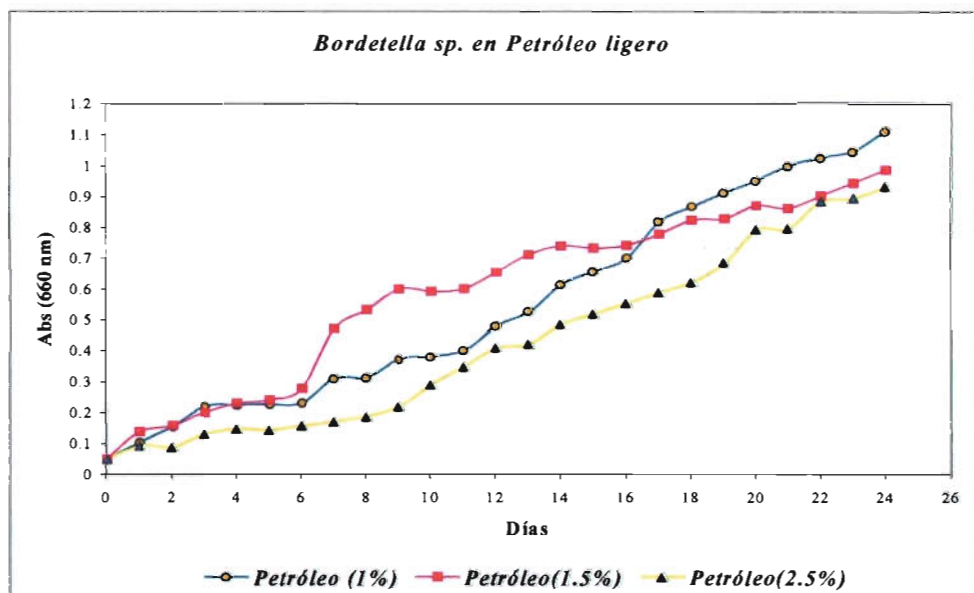
En las figuras 1 y 2 se observa que la cepa T1 mostró un buen crecimiento a las diferentes concentraciones de diesel centrifugado, es claro que a la concentración de 2.5% (v/v) del hidrocarburo la cepa tiene un mejor crecimiento. Sin embargo, en el medio con petróleo ligero se observa que el crecimiento aumenta cuando el hidrocarburo se encuentra a una concentración menor al 1.5% (v/v).

Como segundo paso se determinó la velocidad de crecimiento de la cepa T2 identificada como *Pseudomonas aeruginosa* en medio mineral con diesel centrifugado y petróleo ligero a las concentraciones de 1.0%, 1.5% y 2.0% (v/v) respectivamente como se muestra en las figuras 3 y 4.

\* Ver Anexo.

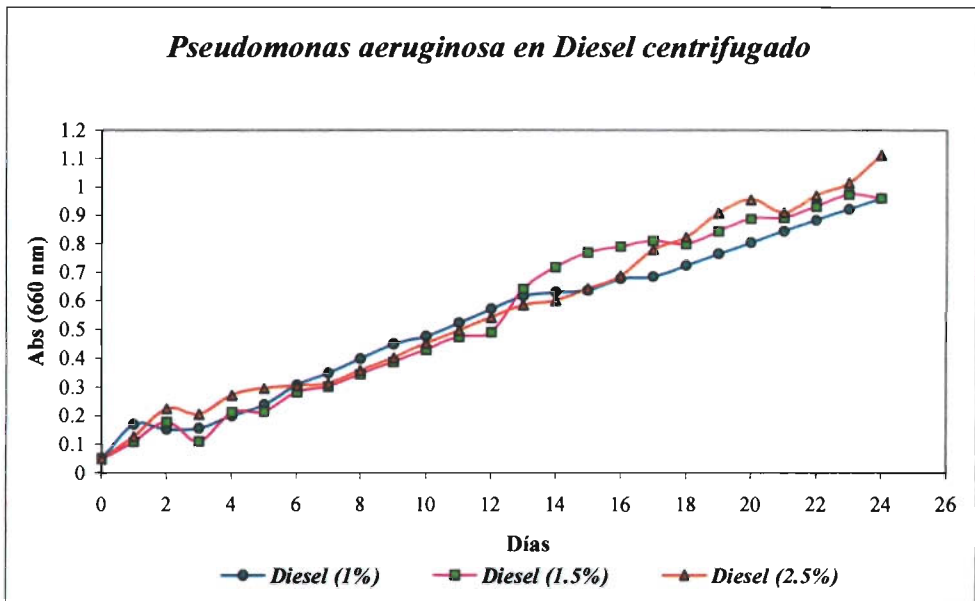


**Figura 1<sup>\*</sup>.** Crecimiento de *Bordetella sp.* en medio mineral comparando el tratamiento con diesel centrifugado a diferentes concentraciones.

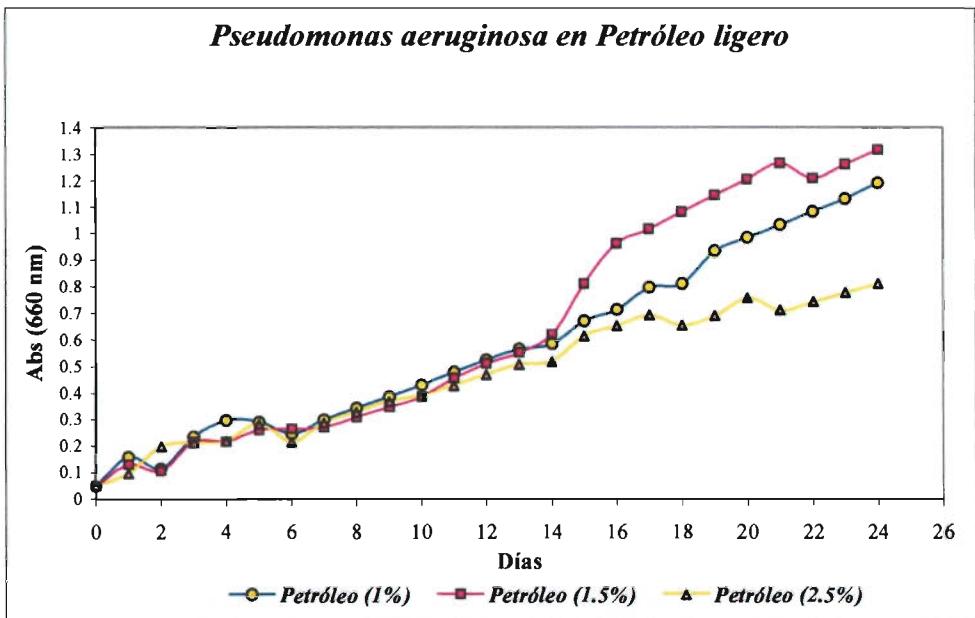


**Figura 2<sup>\*</sup>.** Crecimiento de *Bordetella sp.* en medio mineral comparando el tratamiento con petróleo ligero a diferentes concentraciones.

<sup>\*</sup> Todos los datos de las gráficas se encuentran en el anexo.



**Figura 3\***. Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*. en medio mineral comparando el tratamiento con diesel centrifugado a diferentes concentraciones.

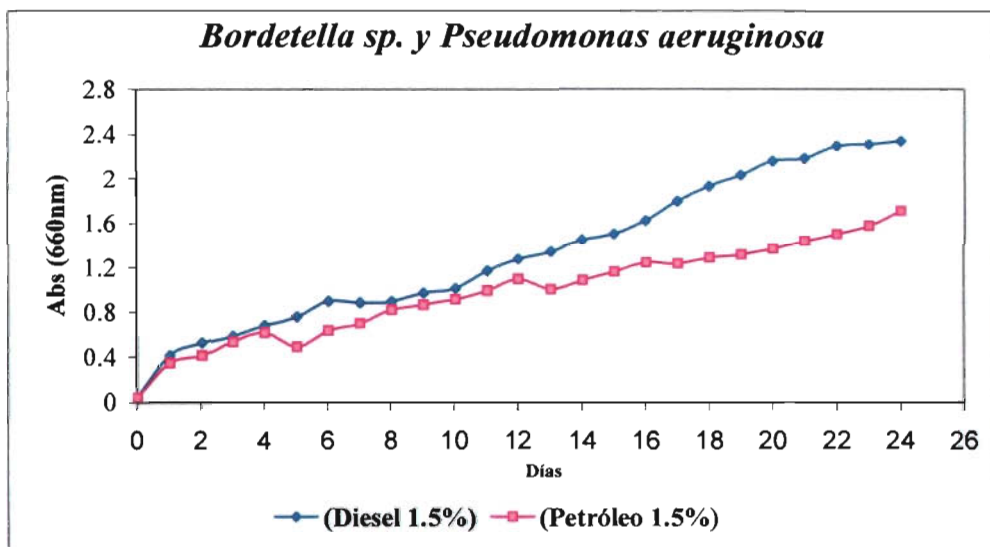


**Figura 4\***. Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en medio mineral comparando el tratamiento con petróleo ligero a diferentes concentraciones.

\* Todos los datos de las gráficas se encuentran en el anexo.

En las figuras 3 y 4 se observó que la cepa T2 mostró un buen crecimiento en las tres concentraciones de diesel centrifugado, sin presentar gran diferenciación entre cada una de las curvas en la fase exponencial; cuando está en medio con petróleo ligero se observa que el crecimiento mejora a la concentración de 1.5% (v/v) y que al aumentar la concentración del hidrocarburo la pendiente decrece.

Como tercer paso se realizó el experimento con la mezcla reconstituida de las dos cepas aisladas, donde se colocaron cantidades iguales de los microorganismos aislados para obtener una mezcla microbiana, ya que no todos los hidrocarburos son degradados por la misma bacteria con la misma eficacia y en algunos casos son requeridos consorcios microbianos para completar su degradación (Jansson, J. *et al.*, 2000.). Por lo tanto, se determinó el crecimiento de la mezcla de las dos cepas aisladas en medio mineral con diesel centrifugado y petróleo ligero al 1.5% (v/v) respectivamente. Se realizaron controles\* donde se cultivó cada cepa por separado en medio mineral con los hidrocarburos mencionados. La Figura 5, muestra el crecimiento de la mezcla de las dos cepas (T1 y T2) en medio mineral con los hidrocarburos.



**Figura 5**. Crecimiento de la mezcla bacteriana en medio mineral comparando el tratamiento con petróleo ligero y diesel centrifugado.

\* Los datos y los controles para esta gráfica se encuentran en el anexo.



Como es posible observar en la figura 5, la mezcla de las dos cepas bacterianas mostró un mayor desarrollo a diferencia de los matracas que contenían las colonias aisladas (fig. 1, 2, 3 y 4), lo que nos hace suponer un posible sinergismo entre estas dos cepas. Por otro lado, analizando el crecimiento de las colonias aisladas claramente se observa que la cepa identificada como *Pseudomonas aeruginosa* tiene un mejor crecimiento a diferencia de la cepa *Bordetella sp.* cuyo crecimiento es más lento.

#### **Análisis de Infrarrojo con Reflectancia Total Atenuada.**

Las cepas aisladas se cultivaron en medio mineral con diesel, petróleo ligero y crudo como única fuente de carbono. La utilización de crudo fue debido a los resultados obtenidos en el estudio del crecimiento de las dos cepas aisladas, ya que se comprobó que ambas tienen la capacidad de utilizar diesel y petróleo ligero como fuente de carbono. Se realizaron las extracciones de cada uno de los medios inoculados con las bacterias aisladas y posteriormente se dio inicio al análisis infrarrojo.

A continuación se presentan los espectros de infrarrojo de las muestras de crudo (fig. 6), petróleo ligero (fig. 7) y diesel centrifugado (fig. 8) extraídas con cloroformo después de 24 días de incubación en contacto con la cepa de *Bordetella sp.* Posteriormente, se presentan las muestras de crudo (fig. 9), de petróleo ligero (fig. 10) y de diesel centrifugado (fig. 11) en contacto con la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*.

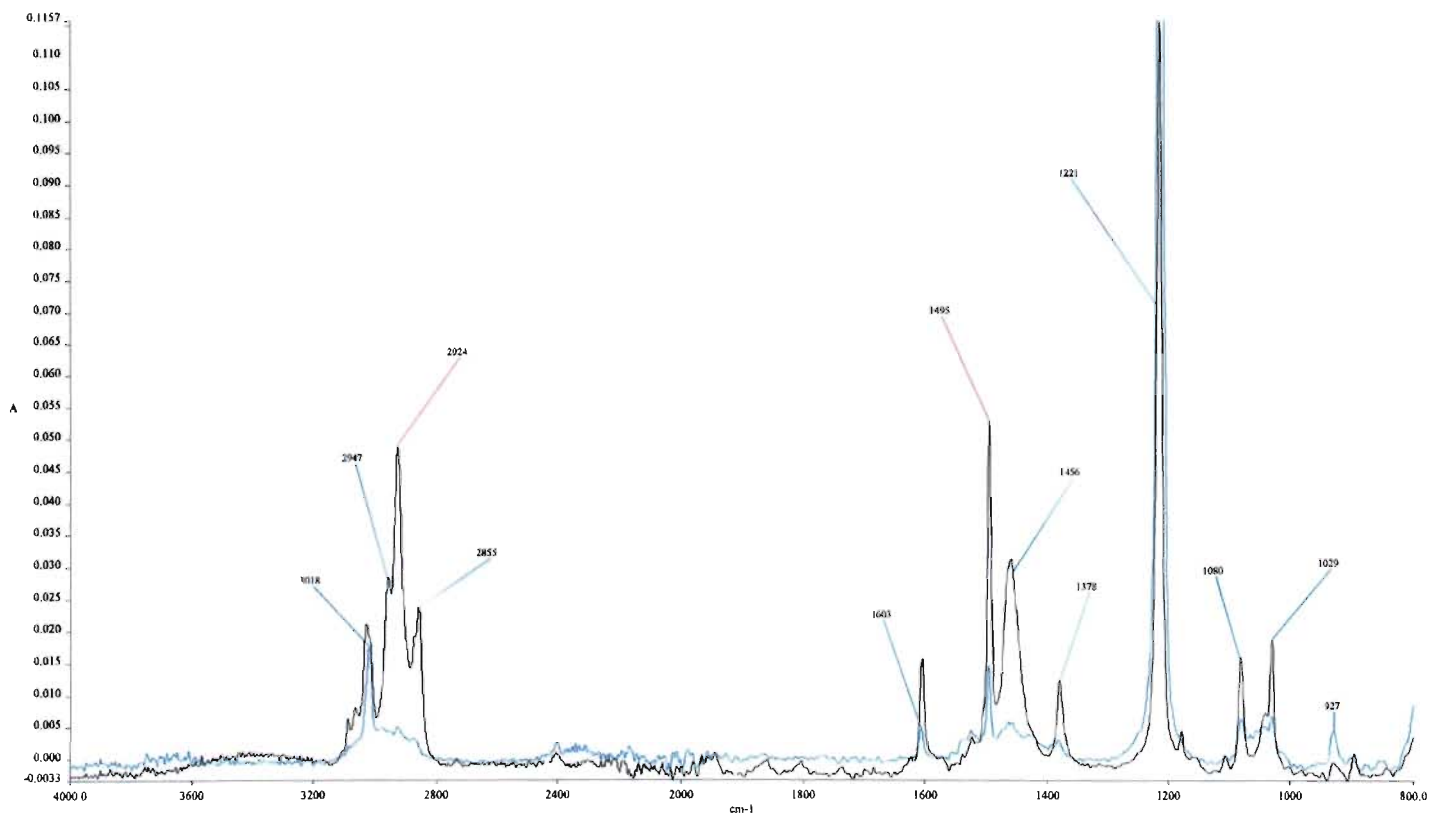


Fig. 6. Espectro de IR con reflectancia total atenuada en donde se muestra de color negro la muestra de crudo y de color azul la muestra de crudo en contacto con la cepa *Bordetella sp.* después de 24 días de incubación a 28° C en medio mineral.

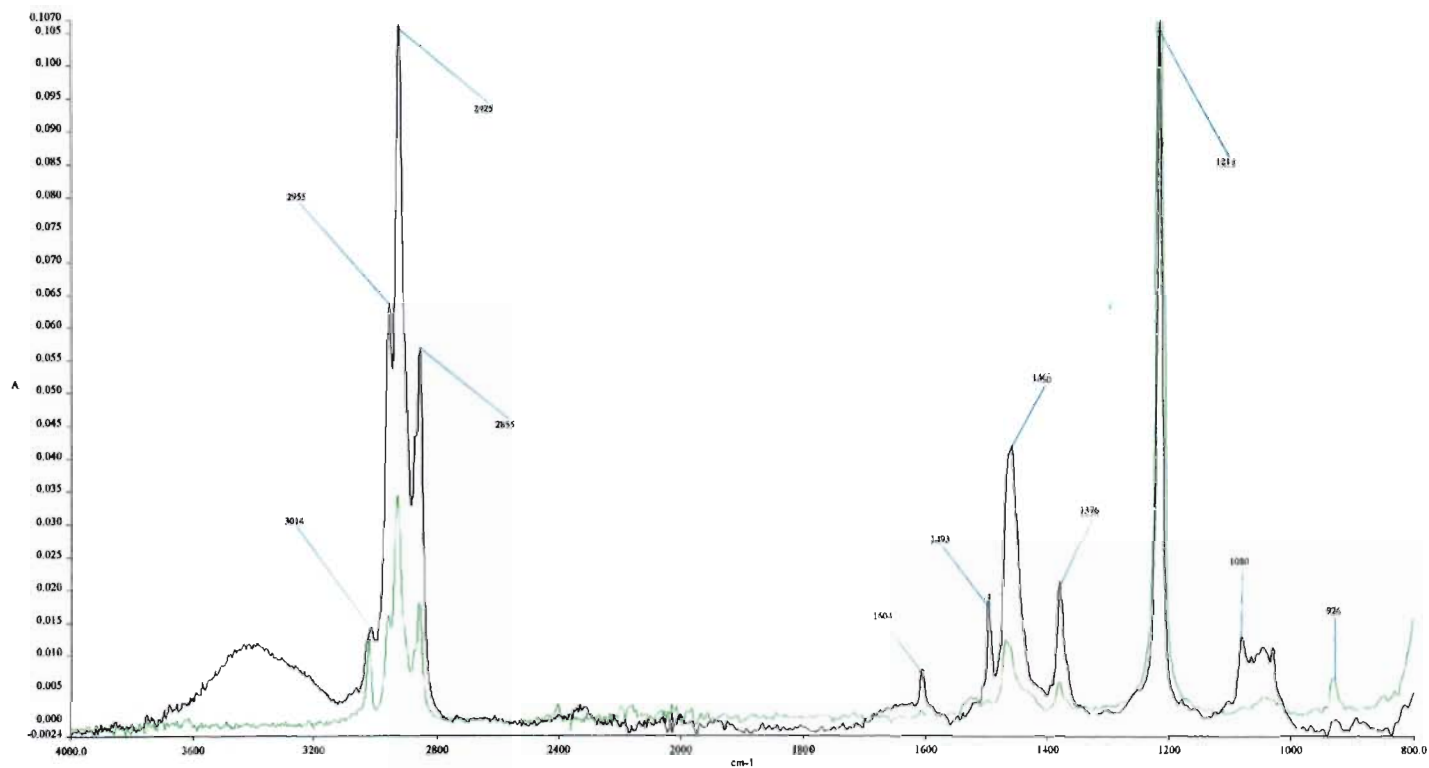


Fig. 7. Espectro de IR con reflectancia total atenuada en donde se muestra de color negro la muestra de petróleo ligero y de color verde la muestra de petróleo ligero en contacto con la cepa *Bordetella sp.* después de 24 días de incubación a 28° C en medio mineral.

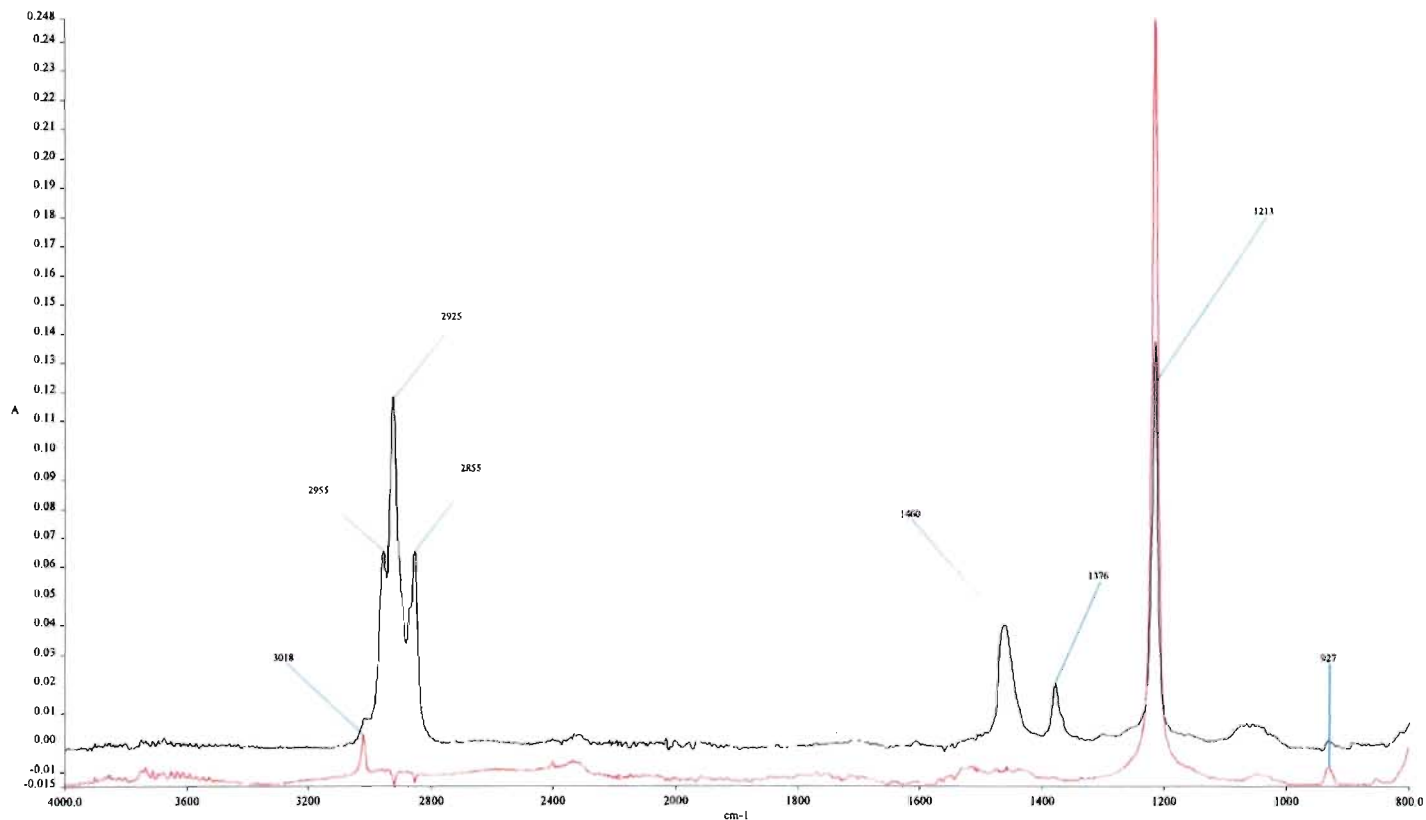


Fig. 8. Espectro de IR con reflectancia total atenuada en donde se muestra de color negro la muestra de diesel centrifugado y de color rojo la muestra de diesel en contacto con la cepa *Bordetella sp.* después de 24 días de incubación a 28° C en medio mineral.

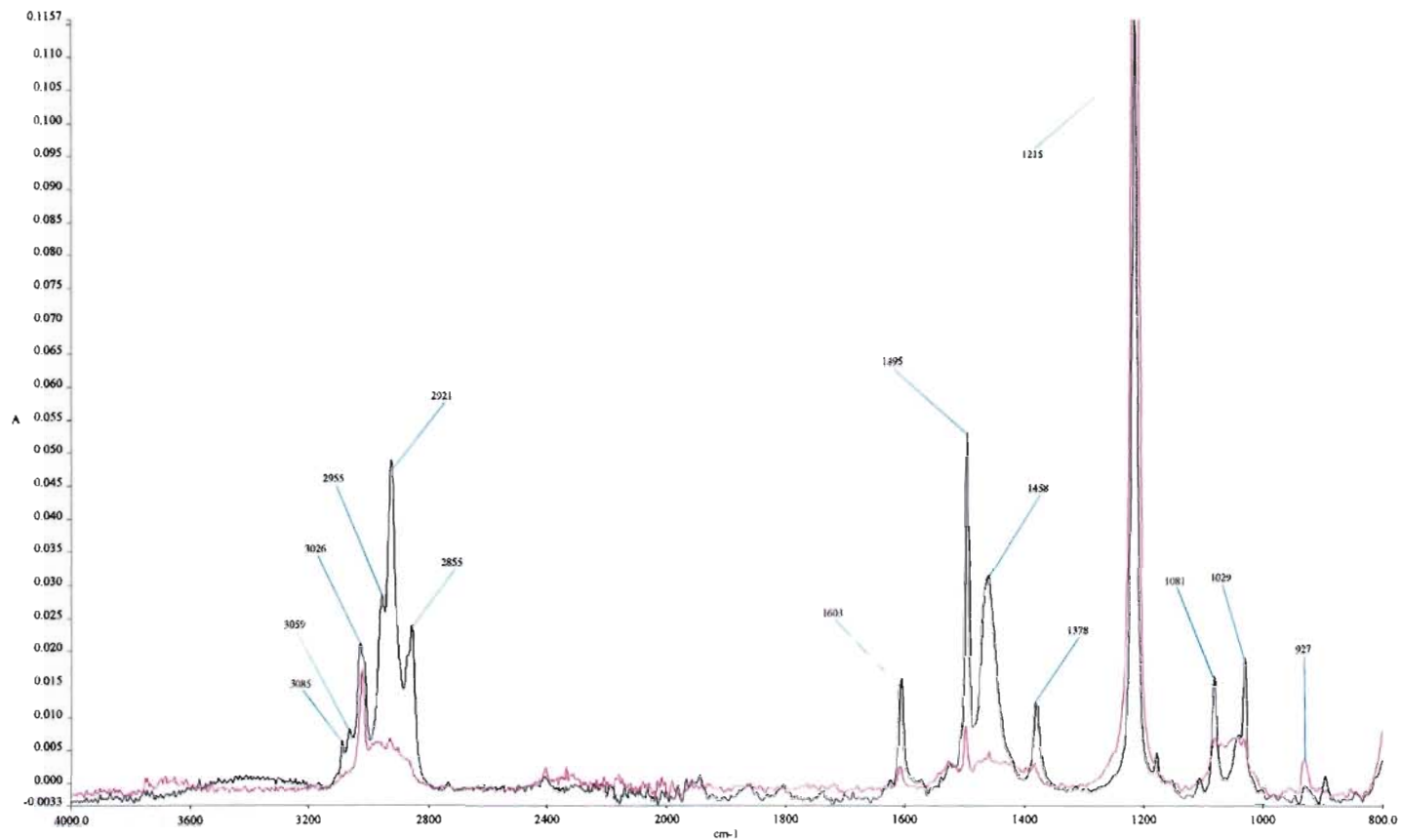


Fig. 9. Espectro de IR con reflectancia total atenuada en donde se muestra de color negro la muestra de crudo y de color morado la muestra de crudo en contacto con la cepa *Pseudomonas aeruginosa* después de 24 días de incubación a 28° C en medio mineral.

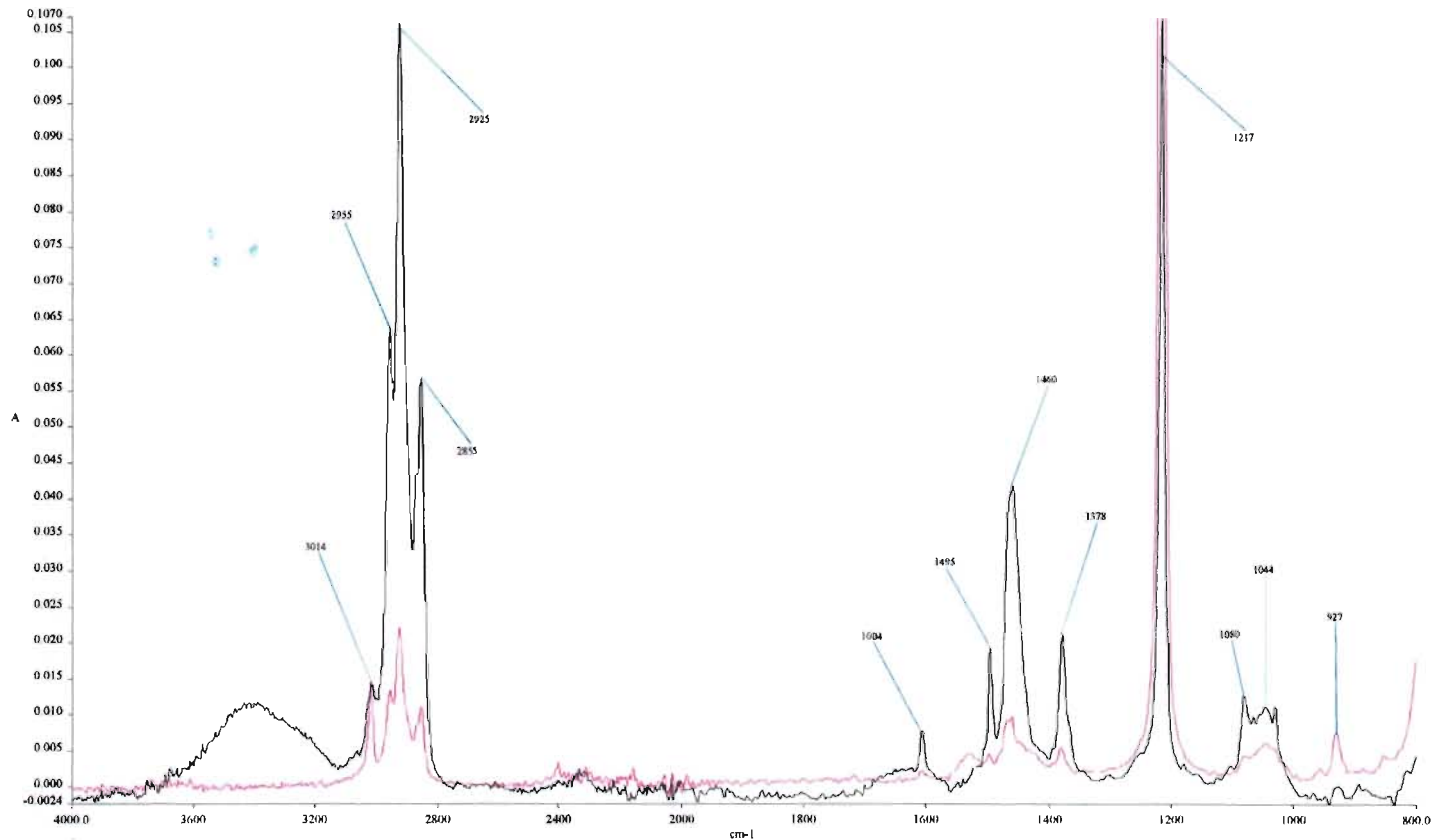


Fig. 10. Espectro de IR con reflectancia total atenuada en donde se muestra de color negro la muestra de petróleo ligero y de color rosa la muestra de petróleo ligero en contacto con la cepa *Pseudomonas aeruginosa* después de 24 días de incubación a 28° C en medio mineral.

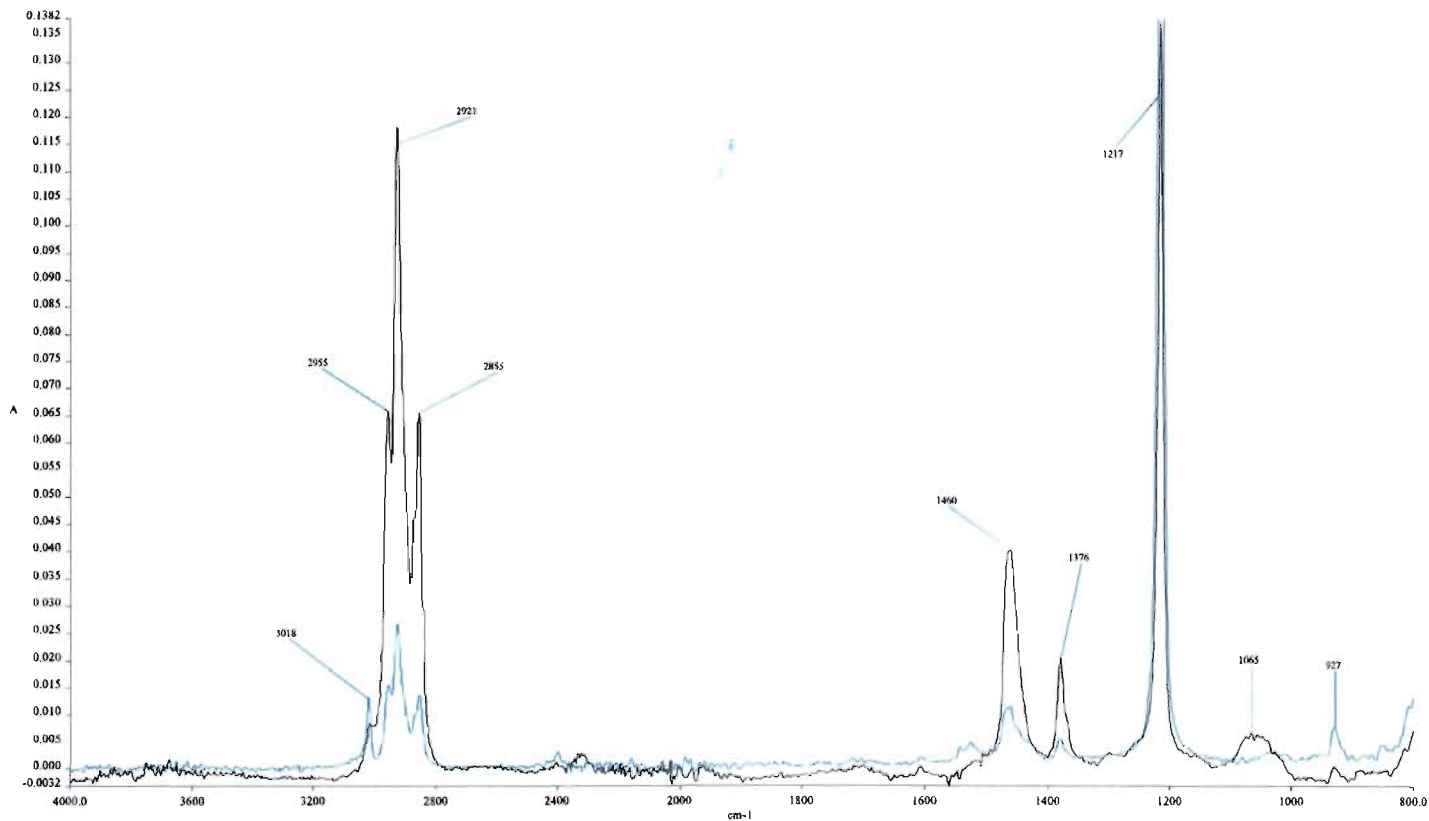


Fig. 11. Espectro de IR con reflectancia total atenuada en donde se muestra de color negro la muestra de diesel centrifugado y de color azul la muestra de diesel en contacto con la cepa *Pseudomonas aeruginosa* después de 24 días de incubación a 28° C en medio mineral.

Los espectros de IR medios de las muestras con crudo (figuras 6 y 9), petróleo ligero (figuras 7 y 10) y diesel centrifugado (figuras 8 y 11), muestran bandas de absorción características de la tensión de los enlaces C-H en los metilos (-CH<sub>3</sub>) y los enlaces C-H en los metilenos (-CH<sub>2</sub>) alrededor de los 3000cm<sup>-1</sup>; lo que indica la presencia de grandes cadenas hidrocarbonadas (tabla 5.5).

**Tabla 5.5. Señales de los componentes alifáticos de los espectros de infrarrojo en las muestras.**

Número de onda cm <sup>-1</sup>	Vibraciones
2955	Estiramiento asimétrica de CH <sub>3</sub>
2925	Estiramiento asimétrica de CH <sub>2</sub>
2855	Estiramiento simétrica de CH <sub>2</sub>
1458	Flexión asimétrica C- CH <sub>3</sub> y vibración de tijera de C- CH <sub>2</sub>
1378	Flexión de CH <sub>3</sub>

También se muestran bandas que tienen una intensidad importante por encima de los 1600cm<sup>-1</sup> que corresponden a los enlaces C=C; alrededor de los 1400cm<sup>-1</sup> se observan bandas que confirman la presencia de CH<sub>2</sub> y CH. En regiones menos energéticas (1080cm<sup>-1</sup> y 800cm<sup>-1</sup>) se encuentran otras bandas con asignación más compleja similares a las que presentan deformaciones de C-H y C=C en aromáticos (figuras 6, 7, 9 y 10), específicamente se observa (tabla 5.6):

**Tabla 5.6. Señales de los componentes aromáticos de los espectros de infrarrojo en las muestras.**

Número de onda cm <sup>-1</sup>	Vibraciones
3014	Estiramiento de CH-
1604 y 1495	Modos de anillo
1044	Flexión de CH- en el plano
927	Flexión de CH- fuera del plano



Las muestras de crudo (fig.6), petróleo ligero (fig. 7) y diesel centrifugado (fig. 8), que fueron inoculados con la cepa *Bordetella sp.* muestran una disminución en las absorbencias de los espectros de infrarrojo cuando se comparan contra los controles de dichos hidrocarburos . De igual manera se observa una disminución en las absorbencias de los espectros de infrarrojo de las muestras de crudo (fig. 9), de petróleo ligero (fig.10) y de diesel centrifugado (fig. 11) inoculados con la cepa *Pseudomonas aeruginosa*.

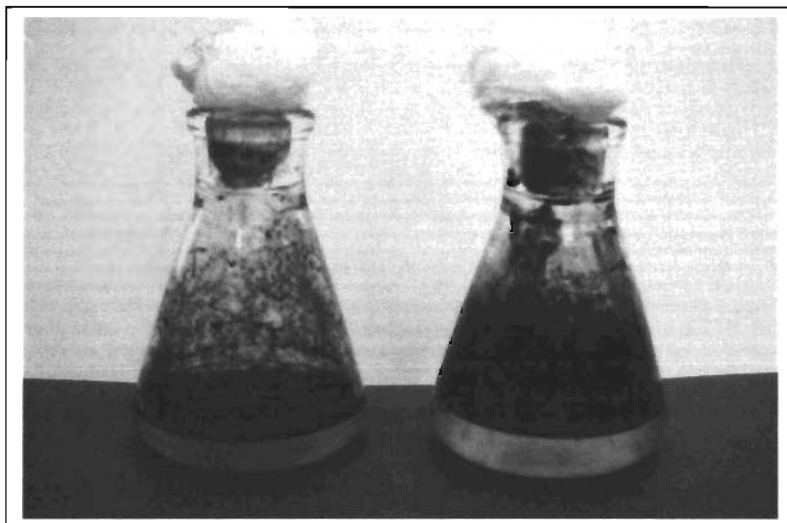
Los controles de los hidrocarburos utilizados recibieron el mismo tratamiento que las muestras inoculadas con las cepas aisladas, de tal manera que se pueda descartar el factor de la evaporación en los hidrocarburos. Con base en los resultados de infrarrojo se deduce que la cepas *Bordetella sp.* y *Pseudomonas aeruginosa*, están utilizando el petróleo crudo, el petróleo ligero y el diesel centrifugado como fuente de carbono.

Al parecer cualitativamente se observa una preferencia por los hidrocarburo alifáticos. Sin embargo, para ambas cepas se aprecia que en el caso del petróleo ligero hay una mayor disminución en el contenido de aromáticos respecto a el caso de petróleo crudo, lo cual puede deberse a la poca complejidad de las especies aromáticas contenidas en el petróleo ligero.

Otro resultado notable se observa al comparar los espectros de las muestras con diesel centrifugado para ambas cepas puesto que las absorbencias en el espectro de la figura 8, son mucho menores a los de la figura 11. Esto indica un mayor consumo de diesel centrifugado por parte de la cepa *Bordetella sp.* respecto a *Pseudomonas aeruginosa*.

El análisis de infrarrojo con reflectancia total atenuada demostró que las cepas aisladas son capaces de utilizar el crudo, petróleo ligero y diesel centrifugado como fuente de carbono, que definitivamente hay más preferencia hacia la utilización de hidrocarburos alifáticos que por los aromáticos, a pesar de que los aromáticos son mejor degradados en el petróleo ligero y que hay una relación directamente proporcional entre la disminución de las absorbencias en los espectros de los hidrocarburos utilizados y el crecimiento bacteriano.

En la siguiente figura se muestra la apariencia de los matraces con los microorganismos aislados que se cultivaron en medio mineral con crudo después de 24 días de incubación

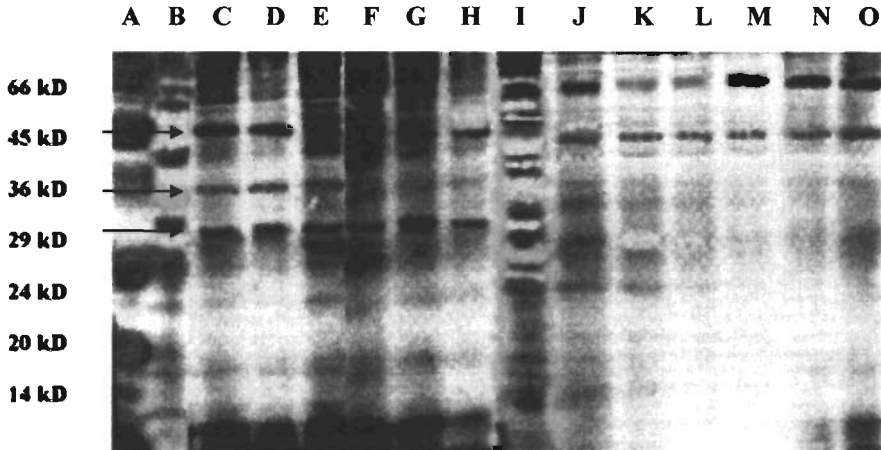


**Fig. 12.** Fotografía de los medios con crudo inoculados con las bacterias aisladas después de 24 días de incubación a 28° C. El matraz de la izquierda inoculado con la cepa *Pseudomonas aeruginosa* con una notoria disminución en la cantidad de crudo en el medio respecto a la cepa *Bordetella sp.* en el matraz de la derecha.

### **Análisis de la separación electroforética de proteínas totales en bacterias que degradan hidrocarburos.**

En la figura 13 se muestra el patrón electroforético de proteínas de las diferentes bacterias encontradas en la muestra de suelo contaminado. En el se observó que los patrones en las muestras de las cepas cultivadas en medio mineral con hidrocarburo y las cultivadas en medio peptonado utilizadas como controles difieren en varias bandas.

En la tabla 5.7 se muestran los resultados del análisis electroforético realizado en un gel de poliacrilamida. El análisis se realizó calculando la movilidad relativa de las proteínas (Rf), esta es la relación que existe entre la distancia de migración de la proteína y la distancia recorrida por el frente.



**Fig. 13.** Gel de poliacrilamida .Carril A, marcador de peso molecular, carril B, control de *P. aeruginosa* , carril C, D y E, el mismo microorganismo en medio con diesel a concentraciones de 2.5%; 1.5% y 1.0% respectivamente, carril F, G y H, el mismo microorganismo en medio con petróleo ligero a las concentraciones anteriores, carril I, control de *Bordetella sp.*, carril J,K y L, el mismo microorganismo en medio con diesel a concentraciones de 2.5%; 1.5% y 1.0% respectivamente, carril M, N y O, el mismo microorganismo en medio con petróleo ligero a las concentraciones anteriores.

Es clara la diferencia de las muestras de los medios tratados con diesel centrifugado y petróleo ligero inoculados con *Pseudomonas aeruginosa*, donde se observó difusamente una banda cercana a los 45 kD. Esta banda se observó notoriamente en las muestras de la cepa *Bordetella sp.*. Sin embargo, no se observó en ninguno de los controles, por lo que posiblemente esté involucrada en el proceso de degradación de los hidrocarburos.

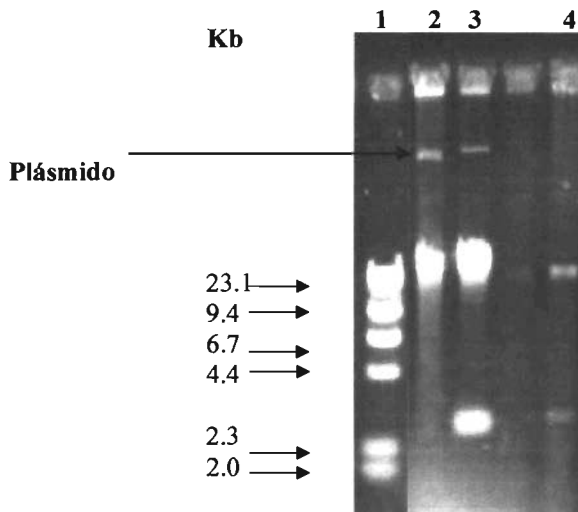
Otras bandas se observaron aproximadamente entre los 29kD y 36kD, únicamente para las muestras con *Pseudomonas aeruginosa*. En esta región se encuentra proteínas como la catecol 2,3-dioxigenasa y otras pertenecientes a la misma familia de dioxigenasas, reportadas e identificadas en trabajos realizados con bacterias degradadoras de hidrocarburos (Tsirogianni, E. *et al.*, 2005).

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
	**	**	**	**	**	**	**	***	*	*	*			
66kD	***	***	***	***	***	***	***	***	*	*	*		*	*
	*							***	**	**	**	**	**	**
	**	*	*	*				**						
45kD		***	*	*					***	***	***	***	***	***
	***	*	*	**	**	*	*		*	*	*	*	*	*
	**	*	*	*	*	*	*	***						
	*							***	**	**	**			
36kD		***	**	***	**	**	**	***	***	***	***	***	***	***
	***	**	**	**	**	**	**	**						
	*							**						
29kD		**	*	***	**	**		*						
	**	*	*	*	*	*	*	**	*	*	*	*	*	*
24kD	***							***	**	**	**	***	***	***
	*								**	**	**	*	*	*
20kD	***	**	**	**	**	**	*	*						
		***	***	***	***	***	**	**						
14kD	**	***	***	***	***	***	***					*	*	*

**Tabla 5.7.** Análisis del patrón electroforético de las proteínas. Los asteriscos (\*) representan la intensidad relativa de las bandas expresadas en función del peso molecular. Columna A, marcador de peso molecular, B control de *P. aeruginosa*, C, D y E, el mismo microorganismo en medio con diesel a concentraciones de 2.5%; 1.5% y 1.0% respectivamente, F, G y H, el mismo microorganismo en medio con petróleo ligero a las concentraciones anteriores, I control de *Bordetella sp.*, J, K y L, el mismo microorganismo en medio con diesel a concentraciones de 2.5%; 1.5% y 1.0% respectivamente, M, N y O, el mismo microorganismo en medio con petróleo ligero a las concentraciones anteriores.

### Análisis de ADN plasmídico.

El objetivo de la extracción del ADN plasmídico fue poder identificar un plásmido que pudiera encontrarse en las cepas bacterianas aisladas para este trabajo. Varios autores han demostrado que los plásmidos proporcionan a varias especies de bacterias la capacidad de catabolizar una gran variedad de compuestos orgánicos incluyendo hidrocarburos (Furukawa, K. y Chakrabarty, A. 1982).



**Fig. 14.** Gel de agarosa para electroforesis de ADN plasmídico. Carril 1, marcador de peso molecular de ADN, carril 2, *E. coli* 49766 (control), carril 3, *Pseudomonas aeruginosa* y carril 4 *Bordetella sp.*

La figura 14 muestra los resultados obtenidos en la extracción. En el gel se identificó una banda de alto peso molecular, presumiblemente de un plásmido, contenido en la muestra de la cepa *Pseudomonas aeruginosa*, que se comparó contra un control realizado con la cepa 49766 de *E. coli*. En la muestra de la cepa de *Bordetella sp.* no se observó ninguna banda que indicara la presencia de algún plásmido.

## 6. CONCLUSIONES

El avance de la microbiología molecular y de técnicas analíticas ha permitido desarrollar nuevas metodologías para el análisis de microorganismos que han desarrollado la capacidad de utilizar contaminantes ambientales orgánicos como fuente de carbono, de tal manera que benefician al medio ambiente y a la población de seres vivos a su alrededor. Sin embargo, no hay que olvidar que existen factores ambientales como la evaporación, la adsorción y la lixiviación que ayudan en el proceso de limpieza de estos medios contaminados.

En este trabajo se aislaron bacilos Gram negativos identificados como *Pseudomonas aeruginosa* y *Bordetella sp.*

Estos microorganismos son capaces de utilizar mezclas de hidrocarburos como fuente de carbono individualmente y en conjunto.

Utilizando la espectroscopia de infrarrojo con reflectancia total atenuada se comprobó que el desarrollo de las bacterias es proporcional a la disminución en la concentración de hidrocarburos presentes en el medio de cultivo.

Las cepas expresaron bandas en la región de 45 kD, 36kD y 29 kD en el análisis proteico que sugiere la existencia de enzimas involucradas en la utilización de los hidrocarburos. Si bien *Pseudomonas aeruginosa* porta un plásmido de alto peso molecular nuestros resultados no permite afirmar que en éste se encuentra codificada la información para la síntesis de proteínas involucradas en el proceso de degradación de hidrocarburos.

Las bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* y *Bordetella sp.*, pueden encontrarse en medios ambientes contaminados por hidrocarburos y tienen una amplia capacidad de utilizar compuestos derivados del petróleo crudo como fuente de carbono y energía. Adicionalmente, son poco exigentes en cuanto a condiciones ambientales y de nutrimentos, razón por la cual han podido desarrollarse en el laboratorio y prosperar en ambientes contaminados.

## 7. PERSPECTIVAS

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, futuras investigaciones podrían realizarse considerando los siguientes puntos:

- Realización de un estudio comparativo de la capacidad de degradación de hidrocarburos que tienen las cepas aisladas con respecto a otras cepas bacterianas utilizadas para dicho propósito.
- Evaluar el comportamiento de las cepas aisladas respecto a la utilización de diferentes compuestos (orgánicos e inorgánicos) como fuente de energía.
- Estudio del plásmido encontrado en la cepa *Pseudomonas aeruginosa* con el fin de conocer si en éste se encuentra codificada la información necesaria para la degradación de los hidrocarburos.
- Estudio cuantitativo de los hidrocarburos degradados por las cepas aisladas por medio de un análisis de infrarrojo con reflectancia total atenuada (FTIR ATR).
- Validación de la metodología empleada para la cuantificación de los hidrocarburos utilizando otras técnicas analíticas.

## 8. REFERENCIAS

- Atlas, R.M. & R. Bartha. 2002. Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. Pearson Educación, S.A., Madrid. 553.
- Barcelona, M; A. Wehrmann; J. F. Keely y W. A. Pettyjohn. 1990. Contamination of Groundwater Prevention Assessment, Restoration. Noyes Data Corporation. New Jersey.
- Bidleman, T. F; A. A. Castleberry; W. T. Foreman; M. T. Zaransk y D. W. Wall. 1990. Petroleum Hydrocarbons in the Surface Water of Two Studies in the Southeastern United States. Est. Coast Shelf Science. 30:91-109.
- Bingle, L.E.H. y C.T. Thomas. 2001. Regulatory circuits for plasmid survival. Current Opinion in Microbiology. 4: 194-200.
- Birnboim H C, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res 7:1513-1523.
- Bonazountas, M. y D. Kallidromitou. 1993. Mathematical Hydrocarbon Fate Modelling in Soil Systems. Principles and Practices for Petroleum Contaminated Soils. Lewis Publishers. USA.
- Boopathy, R. 2000. Factors limiting bioremediation technologies. Bioresource Technology. 74: 63-67.
- Botello, A., Tesis Doctoral. Presencia de hidrocarburos fósiles en sistemas costeros y estuarinos del Golfo de México. UACPyP-CCH, Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México. 1998. 155 P.
- Burlage, S; Hooper, S.W. y G. S. Sayler. 1989. The TOL (pWWO) catabolic plasmid. Applied and Environmental Microbiology. 55: 1323-1328.
- Cerniglia, C. E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation. 3: 3351-368.
- Chakrabarty, A. M; Chou, G y I. C. Gunsalus. 1973. Genetic regulation of octane dissimilation plasmid in *Pseudomonas*. Proceedings of the National Academic of Science. 70: 1137-1140.
- Chappelle, F. H. 1999. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated ground water: The perspectives of history and hidrology. 27: 122-132.
- Chappin, R. G. y Summerlin, L. R.. 1988. Química. Publicaciones Cultural. México.
- Crapes, M. Tosta, Z. Pereira, D. 2000. Acute and chronic impacts caused by aromatic hydrocarbons on bacterial communities at Boa Viagem and Forte do Rio Branco beaches, Buanabara Bay, Brazil. Environmental Pollution. 108, 291 – 295.



- Crouch, S. M. 1990. Check Soil Contamination Easily. *Chemical Engineering Progress*. 9: 41-45.
- Cross, A. D. *Practical Infrared Spectroscopy*. Imperial Collage of Science and Technology. Butterworths Publications Limited., London 1992.
- Evans, P. y L. Young. 1991. Degradation of toluene and m-xylene and transformation of o-xylene by denitrifying enrichment cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. 2: 450-454.
- Farrell, R. y Chakrabarty, A. M. 1979. Degradative plasmids. Molecular nature and mode of evolution. 97-109. En K. N. Timmis and A. Puhler (ed.) *Plasmids of medical, environmental and commercial importance*. Elsevier/ North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
- Fränzle, O. 1993. *Contaminants in Terrestrial Environments*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. Germany.
- Furukawa, K. y A. M. Chakrabarty. 1982. Involvement of plasmids in total degradatodion of chlorinated biphenyls. *Applied and Environmental Microbiology*. 44: 619-626.
- Gibson, D. T. 1971. The microbial oxidation of aromatic hydrocarbons. *Critical Reviews in Microbiology*. 1: 199-223.
- Glegg, G., Hickman, L. y J. Rowland. 1999. Contamination of limpets (*Patella vulgata*) following the sea empress. *Marine Pollution. Bull.* 32: 119-125.
- Hamann, C., Hegemann, J. y A. Hildebrandt. 1999. Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation genes in different soil bacteria by polymerase chain reaction and DNA hybridization. *FEMS Microbiology Letters*. 173: 255-263.
- Hollas, J. M. 1992. *Modern Spectroscopy*. John Wiley & Sons, Chichester. England. 248.
- Jansson, J. K., Björklöf, K., Elvang, A.M. y K.S. Jorgensen. 2000. Biomarkers for monitoring efficacy of bioremediation by microbial inoculants. *Environmental Pollution*. 107: 217-223.
- Jury, W. A. 1989. *Chemical Movement through Soil. Vadose Zone Modeling of Organic Pollutants*. Stephen C. Hern, Susan M. Melancon. Lewis Publishers Inc. USA.
- Keller, R., Mermet, J. M. y M. Otto. 1998. *Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Chichester. New York. 231.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680.

- Lesser, I. J. M. 1995. Prospección de Contaminación de Acuíferos por Hidrocarburos. *Geólogos*. 1(6):5-8.
- Luna-Pabello, V.M; Alandro Lubel, M.A. & C. Durán de Bazúa. 1994. Efecto del sustrato sobre poblaciones de ciliados en un reactor de biodiscos. *Serie Química Ambiental*. Vol. 2. Facultad de Química , UNAM. México. pp.227.
- Luthy, R. G., G. R. Aiken, M. L. Brusseau, S. D. Cunningham, P. M. Gschwend, J. J. Pignatello, M. Reinhard, S. J. Traina, W. J. Weber Jr. y J. C. Westall. 1997. Sequestration of Hydrophobic Organic Contaminants by Geosorbents. *Environmental Science & Technology*. 31:3341-3347.
- Mackay, M. D.; P. V. Roberts y J. A. Cherry. 1985. Transport of Organic Contaminants in Groundwater. *Environmental Science & Technology*. 19(5): 384-392.
- McBride, M. B. 1994. *Environmental Chemistry of Soils*. G. S. Omen, New York, USA: Plenum Press. 214.
- Menzie, C. A., Potocki B. y J. Santodonato. 1992. *Exposure to Carcinogenic Polycyclic Hydrocarbons in the Environment* . *Environmental Science & Technology*. 26:1278-1284.
- Molina M. y A. Rochelle. 1991. Effect of Biorremediation Products and Some Environmental Parameters. *Journal of General Microbiology*. **213**: 229-242.
- Murray, B. McB. 1994. *Environmental Chemistry of Soils*. Oxford University Press. USA.
- Ney, R. 1990. *Fate and Transport of Organic Chemicals in the Environment*. Govern. Inst. Maryland.
- Osborne, B. G., Fearn, T. y P. H. Hindle. 1993. *Practical NIR spectroscopy with applications in analysis*. Longman Scientific & Technical. Harlow, England. 322-331.
- Overton, E.B., Sharp, W. y P. Roberts. 1994. Toxicity of Petroleum. En *Basic Environmental Toxicology*. USA. 133- 153.
- PEMEX 1988. *El Petróleo* . Gerencia de Información y Relaciones Públicas. México.
- PEMEX. 1999. Informe 1999: Seguridad, Salud y Medio Ambiente. Dirección Corporativa de Seguridad Industrial y Protección Ambiental. México.
- Ridway, H., Safarik, J. y D. Phipps. 1990. Identification and catabolic activity of well derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer. *Applied Environmental Microbiology*. 12: 3565-3575.

- Rubinson, K. A. y J. F. Rubinson. 2001. Análisis Instrumental. Prentice Hall. Madrid. 364.
- Saval, B. S. 1995. Acciones para la Remediación de Suelos en México. Segundo Minisimposio Internacional sobre Contaminantes del Agua y Suelo. Instituto de Ingeniería. UNAM.
- Schwedt, G. 1997. The essential guide to analytical chemistry. John Wiley & Sons, Chichester. pp. 534.
- SEMARNAP. 1996. Los Suelos de Tabasco Restauración, Conservación y Uso. Gobierno Constitucional del Estado de Tabasco.
- Shields, M. S., Hooper, S.W. y G. S. Sayler. 1985. Plasmid mediated mineralization of 4-chlorobiphenyl. Journal of Bacteriology. 3: 882-889.
- Silverstein, R. M. y F. Webster. 1998. Spectrometric Identification of Organic Compounds. 6a Ed. John Wiley & Sons, Chichester. New York. 297.
- Skladany, G. J. y F. B. Metting. 1998. Bioremediation of Contaminated Soil. Journal of Bacteriology. 483-509.
- Stephenson, A. y Labunska, I. 1998. Identification and environmental significance of organic pollutants and heavy metal contaminants found in industrial wastewaters and sediments collected from the Matanza-Riachuelo Basin, Argentina 1997-1998. Greenpeace Research Laboratories Technical Note September 1998. 31pp. + appendices.
- Testa, M. S. 1994. Geological Aspects of Hazardous Waste Management. Lewis Publishers. USA.
- Tsirogiani, E., Aivaliotis, M., Karas, M. y G. Tsiotis. 2005. Detection and characterization of catechol 2,3- dioxygenase in an indigenous soil *Pseudomonad* by MALDI-TOF MS using a column separation. Biodegradation. 16: 181-186.
- Tölgyessy, J. 1993. Chemistry and Biology of Water, Air and Soil Environmental Aspects. Elsevier Science Publishers. Czechoslovakia.
- Watanabe, K. 2001. Microorganisms relevant to bioremediation. Current Opinion in Biotechnology. 12: 237-241.
- Yamaguchi, T., Ishida, M. y T. Suzuki. 1999. Biodegradation of hidrocarbons by *Prochecha zopfii* in rotating biological contactors. Process Biochem. 35: 403-409.
- Yong, R. Mohamed, A. y B. Warkentin. 1992. Principles of Contaminant Transport in Soils. Elsevier Science Publishers. Netherlands.
- Zaidi, B. R. y S. H. Imam. 1999. Factors affecting microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene in Caribbean coastal water. Marine Pollution Bulletin. 8: 737-742.

## 9. ANEXO

### Medio mineral.

Para 1 L. de agua destilada estéril.

Compuesto	Concentración (g/L)
NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	2.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.039
MgSO <sub>4</sub>	0.075
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.020
EDTA	0.010
Citrato de sodio	0.060
Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.030

Micronutrientes.

Compuesto	Concentración (g/L)
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	2.86 x10 <sup>-3</sup>
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	1.81 x10 <sup>-4</sup>
NaMoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	1.91 x10 <sup>-4</sup>
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	2.22 x10 <sup>-4</sup>
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	7.9 x10 <sup>-5</sup>
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	4.94 x10 <sup>-5</sup>

### Medio Luria

NaCl	0.5g
Triptona	1g
Extracto de levadura	0.5g
H <sub>2</sub> O destilada	100mL

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos..

### Medio peptonado

Para 1000 ml de medio mineral  
Pesar 5 g de peptona.

### Medio para Pseudomonas

King A	g/L	King B	g/L
Peptona	20	Proteosa de peptona	20
Glicerol	10	Glicerol	10
Sulfato de potasio	10	Fosfato monoácido de potasio	1.5
Cloruro de magnesio	1.4	Sulfato de magnesio hepta hidratado	1.5
Agar	15	Agar	15

El medio King A ( Pseudomonas Agar P) potencia la elaboración de piocianina mientras que el King B ( Pseudomonas Agar F) potencia la elaboración de fluoresceína e inhibe la de piocianina. Los medios se esterilizan a 121°C durante 15 minutos.

### **Agar de Bordet-Gengou**

Sangre de carnero	150/ 200mL.
Glicerina	10mL.
Infusión de papa	4.5g.
Cloruro de sodio	5.5g.
Agar	12g.
Penicilina	250 U.I.

Para 1 L. de agua destilada. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Adicionado con penicilina reprime el crecimiento de Gram positivos y se utiliza para el aislamiento del Género *Bordetella*.

### **Agar cetrimida (Bromuro de cetil trimetil amonio)**

Peptona de gelatina	20g.
Cloruro de magnesio	1.4g.
Sulfato de potasio	10g.
Bromuro de N-cetil-NNN-trimetil amonio	0.3g.
Agar	13.6g.
Glicerina	10mL.

Para 1 L. de agua destilada. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Se utiliza para aislar *Pseudomonas* y favorece la pigmentación de *P. aeruginosa*.

### **Agar MacConkey**

Peptona de caseína	10g.
Peptona de carne	3.0g.
Cloruro de sodio	5.0g.
Lactosa	10g.
Sales biliares	1.5g.
Rojo neutro	0.03g.
Cristal violeta	0.001g.
Agar	13.5g.

Para 1 L. de agua destilada. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

**Agar nutritivo**

Peptona de carne	7.8g.
Peptona de caseína	7.8g.
Extracto de levadura	2.8g.
Cloruro de sodio	5.6g.
D (+) glucosa	1.0g.
Agar	12g.

Para 1 L. de agua destilada. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

**Agar sangre**

Extracto de corazón	10g.
Triptosa	10g.
Cloruro de sodio	5.0g.
Agar	15g.
Sangre de carnero	50/ 80mL.

Para 1 L. de agua destilada. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Se utiliza para el cultivo de microorganismos exigentes y para poner de manifiesto reacciones hemolíticas

### **Extracción de proteínas.**

- Tris – HCl (pH 6.8)  
0.5M Tris – HCl (4X)  
Pesar 15.1g disolver en 150 ml de agua destilada, ajustar el pH con HCl 0.1N y aforar a 250 ml y filtrar por Millipore 0.45µm.
  
- Tris – HCl (pH 8.8)  
3M Tris - HCl (8X)  
Pesar 90.85g disolver en 150 ml de agua destilada, ajustar el pH con HCl y aforar a 250 ml y filtrar por Millipore 0.45µm.
  
- SDS 10%  
Pesar 20g de SDS y disolver en 100 ml de agua destilada, ajustar el volumen a 200 ml a temperatura ambiente.
  
- Persulfato de Amonio 10%  
Pesar 0.5g de persulfato de amonio ajustar a un volumen final de 5ml con agua destilada y guardar a 4° C por no mas de dos semanas.
  
- Buffer de Muestra  
Tris – HCl 0.125 M (pH 6.8)  
SDS 4.0%  
Glicerol 20%  
β-Mercaptoetanol 10%  
Azul de Bromofenol 2 mg/ml  
Ajustar a un volumen final de 10 ml con agua destilada y almacenar en tubos ependorf en alicuotas de 1 ml, guardar a -20° C.

- Solución Teñidora
  - 0.125 (w/v) Azul de Coomassie
  - 50 % (v/v) Metanol
  - 10 % (v/v) Acido Acético Glacial
  - Ajustar a un volumen final de 1000ml con agua destilada.
  - Filtrar a través de filtro Whatman #1.
  
- Solución Desteñidora
  - 40% (v/v) Metanol
  - 7 % (v/v) Acido Acético Glacial
  - Ajustar a volumen final de 10 litros con agua destilada.
  
- Buffer de Muestra (extracción de proteínas).
  - Tris – HCl 0.125 M (pH 6.8)
  - SDS 4.0%
  - Glicerol 20%
  - β-Mercaptoetanol 10%
  - Ajustar a un volumen final de 250ml con agua destilada estéril y almacenar a 4°C.
  
- Solucion stock de poliacrilamida (30:08)
 

30% (w/v) Acrilamida	29.2g
0.08% (w/v) Bis-acrilamida	0.8g

  - Llevar a 100ml con agua destilada y filtrar con Millipore 0.45µm, guardar en obscuridad.
  
- Buffer de electrodos 5x (pH 8.3)
 

Tris base	9g
SDS	3g
Glicerina	43.2ml

  - Aforar a 600ml y ajustar el pH, llevar a un volumen final de 3000ml.



- Reactivo Bradford
 

Azul de coomassie	100mg (G-250)
Etanol 95%	50ml
Ácido fosfórico 85%	100ml
Agua destilada	1000ml

### **Geles de poliacrilamida**

- Gel separador 12.5%
  - 16.66ml. Sol. Stock de acrilamida – bis (30:08)
  - 5.0ml. Buffer Tris –HCl pH 8.8 (8x) 3M
  - 320µl SDS 10%
  - 18.02ml. Agua destilada
  
  - 300µl de Persulfato de Amonio (APS) 10%
  - 20µl de TEMED recién preparado
  
- Gel concentrador 6.0%
  - 4.0ml. Sol. Stock de acrilamida – bis (30:08)
  - 5.0ml. Buffer Tris –HCl pH 8.8 (8x) 3M
  - 200µl SDS 10%
  - 10.80ml Agua destilada
  
  - 250µl de Persulfato de Amonio (APS) 10%
  - 20µl de TEMED recién preparado

El gel concentrador se corre a 150 volts constantes, se aumenta el voltaje a 180 volts al entrar las muestras al gel separador.

## Extracción de ADN plasmídico.

- Solución I

Sacarosa 15%	3.75g
Tris-HCl pH 8.0 (1M)	1.25mL
EDTA (0.5M)	1mL

- Solución II

NaOH (0.2N)	0.3mL
SDS 1.0%	0.3mL
H <sub>2</sub> O estéril destilada	2.4mL

- Solución III

Acetato de Potasio	30mL
Ácido Acético	5.75mL
H <sub>2</sub> O estéril destilada	14.24mL

- Tris (1M) pH 8.0

Pesar 24.2g de Tris (sal de sodio) y disolver en H<sub>2</sub>O ajustar el pH a 8.0 con HCl 1M, aforar a 200 mL y esterilizar en la autoclave.

- EDTA (0.5M) pH 8.

Pesar 18.6g de EDTA y disolver en H<sub>2</sub>O destilada, ajustar el pH 8.5 con NaOH aforando a 100mL y esterilizar en autoclave.

- Buffer TE

Tris - HCl pH 7.5 (0.01M)
EDTA (0.01M)

- Fenol hidratado  
Tomar 50ml de fenol líquido y agregar la misma cantidad de Buffer TE, agitar suavemente para hidratarlo, descartar la fase acuosa restante. La operación se repite de dos a tres veces. Se agrega Tris 0.1M hasta alcanzar un pH 7.0-8.0.
  
- Solución fenol- cloroformo
 

Fenol previamente hidratado	50 ml
Cloroformo	50 ml
  
- Buffer Tris-Boratos (5x)
 

Tris base pH 8.0	5g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.75g
EDTA	0.37g
H <sub>2</sub> O destilada	100mL
  
- NaOH (2N)  
Pesar 16g de NaOH y llevar a 200mL con H<sub>2</sub>O destilada y esterilizar en autoclave.
  
- Buffer de carga (10x)
 

Sacarosa	
EDTA 50mM	
SDS 0.1%	
Azul de bromofenol 0.1%	
  
- Gel de agarosa (1x)
 

Agarosa	0.5g
Tris Boratos (5x)	10mL
H <sub>2</sub> O destilada estéril	40mL

## ▪ **Tinción de Gram**

Esta técnica se basa en la tinción diferencial de la pared celular de las bacterias, debido a la presencia de los polisacáridos que la constituyen. Consiste en aplicar 4 reactivos que son:

- I. Cristal violeta: Funciona como colorante primario; imparte color a todos los microorganismos.
- II. Lugol: Actúa como mordente, por lo tanto aumenta o refuerza la unión entre el colorante y el sustrato, formando un complejo cristal violeta – yodo – ribonucleato de magnesio.
- III. Alcohol –acetona: Actúa como decolorante disolviendo y arrastrando el colorante primario de las células. En este paso, las bacterias Gram positivas, cuya pared celular es relativamente gruesa, con mayor contenido de peptidoglucano y numerosos enlaces transversales entre las cadenas de N-acetil glucosamina y N-cetil murámico son deshidratadas, por lo que conservan el complejo de cristal violeta – yodo; mientras que las bacterias Gram negativas se vuelven invisibles, ya que el decolorante disuelve los lípidos de la pared celular facilitando la salida del complejo cristal violeta – yodo.
- IV. Safranina: Actúa como colorante de contraste, por lo que las bacterias Gram negativas toman una coloración rojiza después de su adición.

## • **Tinción de cápsula o negativa**

Reactivo: nigrosina, tinta china, etc.

- I. Poner una gota del colorante en el portaobjetos .
- II. Extensión del microorganismo sobre la gota del colorante, que debe formar al final una capa fina, pero no transparente.
- III. Desecación al aire, sin pasar por la llama del mechero.
- IV. Observación con objetivo de inmersión.

- Tablas de resultados.

**Tabla 9.1. Crecimiento de *Bordetella sp.* en medio con petróleo ligero a diferentes concentraciones a 660nm de absorbancia.**

Tiempo (días)	Petróleo (1%)	Petróleo (1.5%)	Petróleo (2.5%)
0	0.05	0.05	0.05
3	0.219	0.2	0.129
6	0.23	0.279	0.157
9	0.371	0.601	0.219
12	0.48	0.656	0.408
15	0.657	0.736	0.52
18	0.867	0.826	0.622
21	0.998	0.864	0.797
24	1.109	0.987	0.932

**Tabla 9.2. Crecimiento de *Bordetella sp.* en medio con diesel centrifugado a diferentes concentraciones a 660nm de absorbancia.**

Tiempo (días)	Diesel (1%)	Diesel (1.5%)	Diesel (2.5%)
0	0.05	0.05	0.05
3	0.201	0.159	0.293
6	0.207	0.263	0.381
9	0.229	0.37	0.441
12	0.342	0.413	0.577
15	0.364	0.523	0.721
18	0.39	0.597	0.776
21	0.451	0.627	0.843
24	0.515	0.716	0.941

**Tabla 9.3. Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en medio con petróleo ligero a diferentes concentraciones a 660nm de absorbancia.**

Día	Petróleo (1%)	Petróleo (1.5%)	Petróleo (2.5%)
0	0.05	0.05	0.05
3	0.236	0.219	0.214
6	0.248	0.266	0.216
9	0.387	0.349	0.37
12	0.523	0.512	0.469
15	0.671	0.812	0.614
18	0.813	1.086	0.655
21	1.035	1.267	0.712
24	1.193	1.317	0.813

**Tabla 9.4. Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en medio con diesel centrifugado diferentes concentraciones a 660nm de absorbancia.**

Día	Diesel (1%)	Diesel (1.5%)	Diesel (2.5%)
0	0.05	0.05	0.05
3	0.158	0.113	0.206
6	0.308	0.283	0.305
9	0.451	0.388	0.402
12	0.572	0.491	0.542
15	0.638	0.769	0.645
18	0.726	0.799	0.823
21	0.845	0.891	0.911
24	0.962	0.962	1.113

**Tabla 9.5. Crecimiento de la mezcla de *Pseudomonas aeruginosa* y *Bordetella sp.* en medio con diesel centrifugado y en medio con petróleo ligero a concentración de 1.5% a 660nm de absorbancia.**

Tiempo (días)	Diesel 1.5% Abs.	Petróleo 1.5% Abs.
0	0.05	0.049
3	0.591	0.547
6	0.901	0.648
9	0.975	0.873
12	1.277	1.107
15	1.508	1.174
18	1.935	1.298
21	2.189	1.449
24	2.34	1.722

**Tabla 9.6. Control de *Pseudomonas aeruginosa* en medio peptonado**

Tiempo (horas)	Abs.
0	0.051
2	0.154
4	0.298
6	0.385
8	0.567
10	0.92
12	1.021

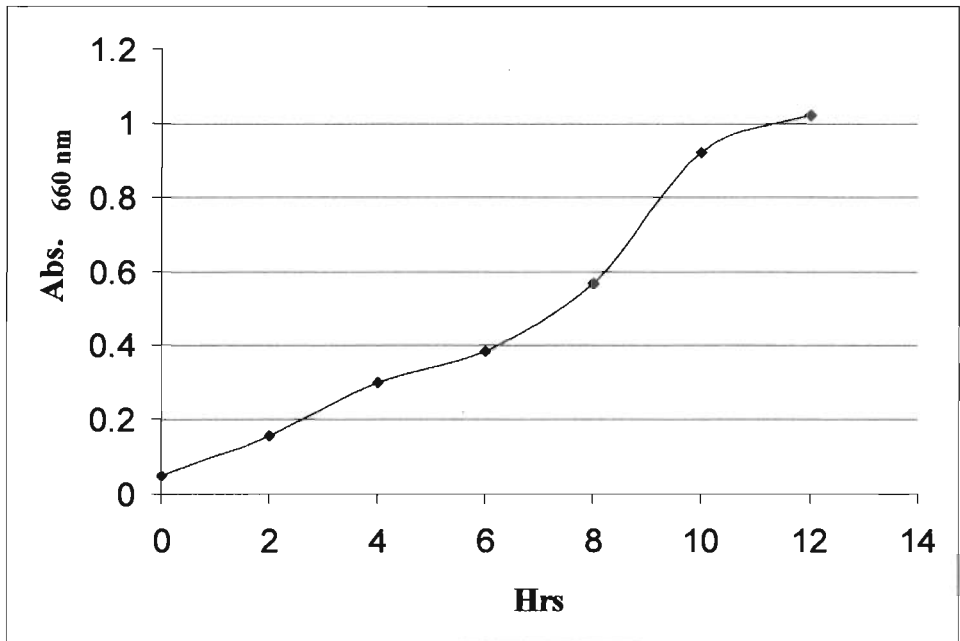
**Tabla 9.7. Control de *Bordetella sp.* en medio peptonado**

Tiempo (horas)	Abs.
0	0.049
2	0.114
4	0.259
6	0.345
8	0.515
10	0.874
12	0.999

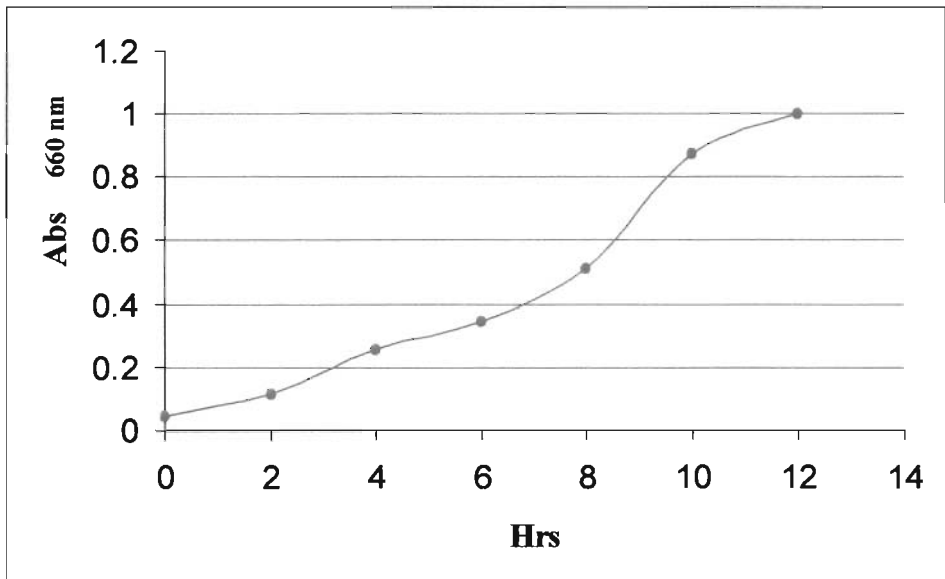
**Tabla 9.8. Control de *Bordetella sp.* y *Pseudomonas aeruginosa* en medio peptonado**

Tiempo (horas)	Abs.
0	0.063
2	0.104
4	0.337
6	0.585
8	0.769
10	1.092
12	1.123

**Curva control de *Pseudomonas aeruginosa***



**Curva control de *Bordetella* sp.**





**Curva control de *Bordetella sp.* y *Pseudomonas aeruginosa***

