



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Presencia de plásmidos de bacterias
degradadoras de hidrocarburos provenientes
del Golfo de México, Golfo de Tehuantepec y la
cuenca hidrotermal de Guaymas, Sonora.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:
FELIPE DE JESÚS MARTÍNEZ ESPINOSA



DIRECTOR DE TESIS:
M. EN C. JORGE MANUEL ROMERO JARERO

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Datos del jurado

1. Datos del alumno

Martinez
Espinosa
Felipe de Jesus
51 20 07 20
Universidad Nacional Autonoma de Mexico
Facultad de Ciencias
Biologia
085040522

2. Datos del tutor

M en C
Jorge Manuel
Romero
Jarero

3. Datos del sinodal 1

Dra
Maria del Pilar
Negrete
Redondo

4. Datos del sinodal 2

M en C
Hector Mauricio
Alexander
Valdes

5. Datos del sinodal 3

M en C
Sara Ernestina
Islas
Graciano

6. Datos del sinodal 4

Dr
Manuel
Jimenez
Estrada

7. Datos del trabajo escrito

Presencia de plasmidos de bacterias degradadoras de hidrocarburos provenientes del Golfo de Mexico, Golfo de Tehuantepec y la cuenca hidrotermal de Guaymas, Sonora.
71 p
2006

DEDICATORIA:

Dedico esta tesis con mucho cariño a las personas que siempre me han apoyado en todo y a quienes les debo gran parte de mis logros: a mis padres y hermanos. Especialmente a mi mamá, a quien admiro mucho, pues con su ejemplo me ha enseñado que se debe seguir adelante ante cualquier circunstancia.

¡GRACIAS!

I did it!

AGRADECIMIENTOS:

Sirvan estas líneas para expresar mi agradecimiento a las siguientes personas:

Al M. en C. Jorge M. Romero Jarero, investigador del Lab. de Microbiología Marina del ICMYL, por haber dirigido mi trabajo de tesis y brindarme la oportunidad de trabajar con él en el área de la investigación.

A la Dra. María del Pilar Negrete por su gran disposición e interés en la elaboración de este trabajo.

AL M. en C. Héctor Mauricio Alexander Valdés por sus observaciones en la realización de esta tesis.

A mis sinodales por sus valiosos comentarios y sugerencias.

A mi compañerita de laboratorio Gabriela Cruz, gracias por tus consejos.

A Carmen, Verónica y Raúl de la UAM, unidad Xochimilco, por sus valiosas sugerencias.

A la futura M. en C. Verónica Borgonio de la UACM por sus valiosas contribuciones para la elaboración de este trabajo.

A la futura M. en C. Juliana del Instituto de Biomédicas de la UNAM, gracias por tu amistad y tus aportaciones a este trabajo.

A la señora Crescenciana Morales Salazar, secretaria de la sala de computo del ICMYL, mil gracias por su amistad y por todas las atenciones prestadas para la elaboración de este trabajo.

INDICE

Lista de abreviaturas	vii
Resumen	viii
1 Introducción:	1
2 Marco teórico	3
2.1 Características generales del petróleo.....	3
Clasificación de los hidrocarburos del petróleo.....	4
Degradación del petróleo en el ambiente marino	6
Principales factores físicos y químicos involucrados en la biodegradación del petróleo	7
2.2 Bacterias degradadoras de hidrocarburos	8
2.3 Plásmidos degradativos en BHDP	10
Rutas metabólicas para la degradación de hidrocarburos por BHDP	12
2.4 Extracción de plásmidos	15
3 Hipótesis	16
4 Objetivos	16
Objetivo general.....	16
Objetivos particulares	16
5 Áreas de estudio	17
Golfo de México	17
Golfo de Tehuantepec	18
Cuenca hidrotermal de Guaymas Sonora	19
6 Material y método	21
6.1 Obtención de muestras.....	21
Agua y sedimento	21
Contenido estomacal.....	22
6.2 Aislamiento y conteo de bacterias degradadoras de petróleo	22
6.3 Purificación de cepas bacterianas	26
Purificación de consorcios bacterianos.....	27
6.4 Extracción de DNA plasmídico	27
Miniprep a través del kit QIAprep Spin Miniprep:	28
Electroforesis	29
6.5 Identificación de cepas bacterianas	30
Pruebas bioquímicas por el sistema Api 20 NE.....	30

7 Resultados	32
7.1 Presencia de bacterias hidrocarbonoclasticas	32
7.2 Bacterias hidrocarbonoclasticas purificadas	39
Elección de muestras	39
Purificación de cepas bacterianas	40
Cepas puras de bacterias degradadoras de hidrocarburos	41
7.3 Presencia de plásmidos en bacterias hidrocarboclasticas	43
Estimación de pesos moleculares	47
Pesos moleculares	48
7.5 Bacterias hidrocarbonoclasticas identificadas	50
8 Discusión	51
Presencia de bacterias hidrocarbonoclasticas	51
Plásmidos asociados a bacterias hidrocarbonoclasticas	55
Bacterias hidrocarbonoclasticas identificadas	57
9 Conclusiones	59
10 Bibliografía	60
Apéndice 1	67
Apéndice 2	70

LISTA DE ABREVIATURAS

ADH: arginina

BHDP: bacterias heterótrofas degradadoras de hidrocarburos

BHV: bacterias heterótrofas viables

CCC: círculo covalentemente cerrado

DNA: ácido desoxirribunocléico

GLU: glucosa

ICMyL: Instituto de Ciencias del Mar y Limnología

Kb: kilobase

LB: Luria Bertani

NMP: número más probable

OC: círculo abierto; del Inglés “open circle”

pb: pares de bases

ppm: partes por millón

PNPG: p-nitrofenil-BD galactopiranosido

RNA: ácido ribonucleico

TRP: triptófano

URE: urea

UV: ultravioleta

RESUMEN

En el presente trabajo se aislaron, purificaron e identificaron bacterias degradadoras de hidrocarburos, a partir de muestras de agua, sedimentos y contenido estomacal de crustáceos de tres zonas marinas del territorio mexicano: Golfo de México, Golfo de Tehuantepec y la cuenca hidrotermal de Guaymas Son., con el objetivo de determinar la presencia de bacterias degradadoras, así como la presencia de plásmidos asociados a estos microorganismos.

Con el método del número más probable (NMP) se evaluó la presencia y concentración de bacterias por cada 100 ml de muestra, a través de cultivos crecidos en medio selectivo para bacterias hidrocarbonoclasticas.

Los resultados obtenidos revelan la presencia de bacterias hidrocarbonoclasticas en los tres tipos de muestra, obtenidos en las tres zonas de estudio, observándose una mayor concentración en las muestras de sedimento del Golfo de México.

Se seleccionaron 12 cepas que fueron sometidas a un proceso de aislamiento de plásmidos, utilizando el método de lisis alcalina propuesto por Birnboim y Doly (1979). Las muestras fueron corridas electroforéticamente en geles de agarosa. Los resultados indicaron la presencia de plásmidos en 11 de las 12 cepas y sus pesos moleculares estuvieron comprendidos entre 12,553 a 16,302 pares de bases (pb).

Se aisló un total de 32 cepas: 19 del Golfo de México, 9 de Guaymas, Son. y 4 del Golfo de Tehuantepec. El 100% de estas cepas resultó ser bacilos Gram negativos y su identificación se hizo a través de pruebas bioquímicas (Api 20 NE). Se identificaron 13 especies, sobresaliendo las especies del género *Pseudomonas*.

1 INTRODUCCIÓN:

Las bacterias constituyen el 80% de la biomasa marina y desempeñan una gran cantidad de funciones biológicas importantes en el lecho marino, algunas de ellas comprenden los procesos de conversión de elementos orgánicos a inorgánicos (mineralización) y la producción y descomposición de materia orgánica, lo que las convierte en uno de los principales agentes responsables del flujo de energía tanto heterotrófica como autotrófica dentro de este sistema (Roos *et al.*, 1996; Dawes, 1986). Algunas de ellas juegan un papel fundamental en la adsorción y degradación de contaminantes cuando éstos son agregados al medio marino, permitiendo la transferencia de estos productos metabolizados a otros organismos, tales como bivalvos, crustáceos y peces entre otros, ayudando así, a mantener el equilibrio ecológico de los ecosistemas costeros (Wong y Barrera, 1996).

Cuando se presentan derrames de petróleo al mar ocurren alteraciones físicas, químicas y biológicas que ponen en peligro la vida de muchos organismos, incluyendo a los organismos de la microbiota nativa, sin embargo; entre ellos, un grupo de bacterias heterótrofas llamadas degradadoras de petróleo (BHDP) o hidrocarbonoclasticas (Lizárraga *et al.*, 1982; Lizárraga 1996), empiezan a desarrollarse y actúan directamente sobre este contaminante. Las BHDP están ampliamente distribuidas en el mar y actualmente se conocen varias de ellas, sobresaliendo las especies del género *Pseudomonas*, sin embargo, esta capacidad no es dependiente de alguna especie como tal, sino que más bien, es específico de cepas. Por otro lado, se ha encontrado que algunos organismos bentónicos, como bivalvos, cangrejos y peces, habitantes de zonas impactadas por hidrocarburos, poseen bacterias hidrocarbonoclasticas en su tracto digestivo (Wong y Barrera, 1996; Botello *et al.*, 1996).

Este tipo de bacterias son capaces de metabolizar a los diferentes componentes que constituyen al petróleo. Los hidrocarburos son degradados por estas bacterias hasta productos intermediarios del ciclo de Krebs. La etapa inicial de la biodegradación de los hidrocarburos generalmente está dirigida por enzimas codificadas por DNA extracromosomal de la bacteria, conocido comúnmente como plásmidos. Estas moléculas degradativas permiten que la bacteria se desarrolle dentro de un ambiente contaminado por petróleo, donde la fuente de carbono son los mismos hidrocarburos. La presencia, así como la variedad de los plásmidos degradativos es muy grande, y

hoy en día se conoce un buen número de ellos, así como las rutas metabólicas y los compuestos que degradan (Van *et al.*, 2003, Shapiro *et al.*, 1980).

La presencia de bacterias hidrocarbonoclásticas en zonas marinas impactadas por el petróleo en todo el mundo pone de manifiesto una intensa degradación de hidrocarburos por parte de estos microorganismos y sus respectivos plásmidos (Al-Hadhrami *et al.*, 1995; Abed *et al.*, 2002; Atlas, 1995). Los trabajos de Lizárraga *et al.* (1983, 1986⁽¹⁾) y Molino (2000) hacen evidente la presencia de bacterias hidrocarbonoclásticas en el Golfo de México, sin embargo, ésta no es la única región marina del territorio mexicano en la que se ha registrado la presencia de hidrocarburos.

Por lo anterior se plantea la necesidad de desarrollar un estudio encaminado a determinar e identificar las bacterias hidrocarbonoclásticas que están presentes en algunas zonas marinas del territorio mexicano, así como el tipo de plásmidos que les confiere esta capacidad. Del mismo modo, el hecho de que estas bacterias se encuentren en el interior de algunos animales que habitan estas zonas plantea las mismas preguntas; esto con la finalidad de comprender mejor las características de estos microorganismos y a la vez las ventajas de poder desarrollar posteriormente líneas de investigación encaminadas a la biorremediación de estos ecosistemas marinos.

En el presente estudio se aislaron e identificaron cepas de bacterias hidrocarbonoclásticas de muestras de agua y/o sedimento del Golfo de México y Golfo de Tehuantepec, por ser dos zonas de gran importancia en la explotación e industrialización del petróleo. De igual forma ocurrió con muestras de contenido estomacal de macrocrustáceos que viven alrededor de las chimeneas hidrotermales que se encuentran en el fondo marino de la cuenca de Guaymas, Son., cuyo fondo está cubierto por hidrocarburos.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL PETRÓLEO

El petróleo actualmente sirve como la principal fuente de energía para el mundo. Su producción a alta escala, transporte, uso y venta global, lo han hecho un contaminante destacado tanto en persistencia como en cantidad en el ambiente.

En términos cuantitativos el petróleo crudo es uno de los contaminantes orgánicos más importantes en el ecosistema marino, ya que se estima entre 1.7 y 8.8 millones de toneladas métricas anuales los aportes totales de hidrocarburos petrolíferos al medio marino (Latha y Lalithakumari, 2001). La más grande contribución proviene de fuentes terrestres, principalmente de las descargas de desechos industriales y municipales, así como los derrames accidentales ocurridos en varios pozos de explotación petrolera y los provocados por barcos-tanques (México, Ixtoc-I: 1979 y Abkatum 91: 1986; Canal Inglés, *Torrey Canyon*: 1967, etc.), sin embargo, no hay que subestimar el aporte natural provocado por chapopoterías, erosión o por la productividad primaria, ya que de acuerdo con Botello (1995), representan el mismo orden de magnitud que los aportes antropogénicos.

El petróleo crudo convencional se puede describir cualitativamente como un líquido que varía del verde oscuro al negro y con un intervalo de ebullición de 24 a 370 °C. Sus principales fracciones de hidrocarburos contienen desde 0 a 35% o más de gasolina, y proporciones variables de keroseno y otros componentes de punto de ebullición más elevado (Gruse y Stevens, 1964; Linstromber, 1979) (Tabla 1).

Tabla1. Principales fracciones del petróleo (tomado y modificado de Linstromber, 1979).

Fracción	Limite de punto de ebullición (°C)	Usos
Gas	- 160 a 50	Combustible gaseoso, producción de H ₂
Gasolina	30 a 200	Combustible para motores, disolvente
Keroseno, aceite combustible	180 a 400	Combustibles diesel, para hornos y reactores
Lubricantes (vaselina)	550 y más	Lubricación, aceites minerales
Parafinas	--	Velas, cerillas
Residuo (asfalto)	--	Superficie de carreteras, combustible

CLASIFICACIÓN DE LOS HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO

El petróleo es esencialmente una mezcla compleja de hidrocarburos. Los hidrocarburos son compuestos químicos formados únicamente por hidrógeno (11.5 a 14%) y carbono (83.5 a 87%), representando aproximadamente el 98% de la composición total del petróleo.

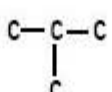
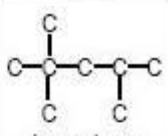
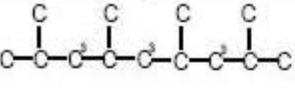


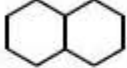

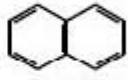
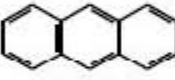
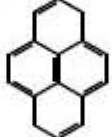
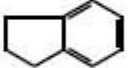

Los hidrocarburos presentes en el petróleo se agrupan en las siguientes clases (Érij *et al.*, 1985; Botello, 1996):

Alcanos : Compuestos saturados de cadena lineal o ramificada, con la fórmula general $C_nH_{2n + 2}$ y con átomos desde C₁ hasta C₄₀ (Figura 1). Están presentes en todos los petróleos y su distribución se concentra principalmente en los gases del petróleo y en las fracciones de gasolina y keroseno.

Cicloalcanos: Compuestos saturados en los cuales todos o algunos de los átomos de carbono están arreglados molecularmente formando anillos. Con fórmula general C_nH_{2n} . Por su composición total predominan sobre las demás clases de hidrocarburos (Figura 1). Están presentes en todos los petróleos y en todas sus fracciones.

Aromáticos : Compuestos cíclicos insaturados, conteniendo uno o más anillos bencénicos íntimamente ligados o conectados en su estructura molecular (Figura 1). Su contenido total en diferentes petróleos es menor que el de alcanos y cicloalcanos.

Figura 1. Estructura química de los principales grupos de hidrocarburos del petróleo (tomado y modificado de Botello, 1996).

Componente			Porcentaje
Alcanos			
CH ₄ metano	CH ₃ —CH ₃ etano	CH ₃ —(CH ₂) _n —CH ₃ propano	30 %
 iso-butano	 iso-octano	 pristano	
Cicloalcanos			
 ciclopentano	 ciclohexano	 decalina	50 %
Aromáticos			
 benceno	 naftaleno	 antraceno	15 %
 pireno	 indano	 fluoreno	

Una parte considerable de los hidrocarburos del petróleo tiene estructura mixta (hibrida). Esto significa que en las moléculas de estos hidrocarburos existen distintos elementos estructurales, a saber: anillos aromáticos, anillos de cicloalcanos pentagonales y hexagonales y cadenas de alcanos. Está claro que la combinación de estos elementos puede ser extraordinariamente variada, y el número de isómeros, enorme (Érij *et al.*, 1985).

El azufre (0-10%), el nitrógeno (0-1%) y el oxígeno (0-5%) generalmente están presentes en cantidades menores, ya sea en su forma elemental o bien como constituyentes heterocíclicos y grupos funcionales. También están presentes algunos metales como el vanadio, níquel, hierro, aluminio, cobalto, cobre y otros, cuya concentración viene expresado por fracciones insignificantes de uno por ciento, dependiendo del tipo de petróleo crudo y la región en donde se formó (Botello, 1996; Érij *et al.*, 1985).

DEGRADACIÓN DEL PETRÓLEO EN EL AMBIENTE MARINO

Cuando el petróleo es derramado o introducido al ambiente marino sufre un conjunto de cambios originados por la acción conjunta de factores físicos, químicos y biológicos, que permiten la transformación estructural de los hidrocarburos (Tabla 2). Dentro de los factores biológicos se encuentra la participación de microorganismos, tales como hongos, levaduras y bacterias, capaces de degradar estas moléculas en compuestos menos tóxicos, minorizando sus efectos en los ecosistemas costeros (Botello, 1995; Lizárraga, 1996).

Tabla 2. Factores que intervienen en la transformación del petróleo derramado en el mar (Botello, 1995).

Factores	
Físicos	Temperatura Luz Viento Corrientes Mareas
Químicos	Disolución Evaporación Emulsificación Foto-oxidación Nutrientes minerales (N y P)
Biológicos	Acción biológica

PRINCIPALES FACTORES FÍSICOS Y QUÍMICOS INVOLUCRADOS EN LA BIODEGRADACIÓN DEL PETRÓLEO

La acción biológica ocurre solamente después de un período de tiempo significativamente largo, típicamente del orden de 2-4 semanas, tiempo en que los factores físicos y químicos preceden al factor biológico, el cual determina en gran parte el destino del petróleo derramado.

Temperatura

La degradación de los hidrocarburos por parte de bacterias puede ocurrir en un amplio intervalo de temperaturas, viéndose favorecida en zonas tropicales, donde la temperatura (25-37 °C) facilita la evaporación de hidrocarburos tóxicos para las bacterias (hidrocarburos ligeros no mayores a 9 carbonos), contrariamente a las bajas temperaturas de las regiones cercanas a los polos, donde la intensidad y extensión de la biodegradación se reduce principalmente por la acumulación de estos hidrocarburos y no tanto a la reducción de la actividad enzimática (Floodgate, 1984; Lizárraga, 1996).

Oxígeno

La mayoría de los microorganismos hidrocarbonoclasticos necesitan de oxígeno disuelto en el agua para degradar completamente el petróleo, por lo que esta acción es preponderantemente una reacción aeróbica. Las condiciones anaeróbicas de los sedimentos se traduce en una disminución de la tasa de degradación, debido a que el oxígeno molecular es requerido por la mayoría de estos organismos para los pasos iniciales en el metabolismo de los hidrocarburos (Lizárraga, 1996; Botello, 1995; Dinkla, *et al.*, 2001). La concentración de O₂ en el agua de mar generalmente oscila entre los 6 y 8.5 mg/l. Para degradar el petróleo, los microorganismos necesitan grandes cantidades de oxígeno; por ejemplo, para 4,000 litros de hidrocarburo derramado en el ambiente marino, se necesitan 5,000 Kg de O₂ (Alexander 1994).

Nutrientes minerales: fósforo y nitrógeno

Los bajos niveles de fosfato y nitrógeno (amonio, nitrato y nitrógeno orgánico) son a menudo los factores que reducen la degradación del petróleo en ambientes marinos, debido a que su ausencia limita el crecimiento y la actividad de la población microbiana (Atlas, 1981; Fuentes, 1994).

Profundidad

La utilización de materia orgánica por bacterias en mar profundo es muy restringida y al parecer sucede lo mismo con los hidrocarburos (Seyfried y Mottl, 1995; Jannasch *et al.*, 1971). Se ha reportado que la tasa de degradación de hidrocarburos bajo presiones altas es significativamente menos que a presión atmosférica. Esto indica que el petróleo presente en el fondo del océano puede permanecer por largo tiempo (Schwarz *et al.*, 1974).

La mayoría de los hidrocarburos son biodegradables, por ejemplo, los n-alcenos en el rango de C₁₀ a C₂₆ son los hidrocarburos más rápidos en degradar. Alcanos de cadena corta resultan tóxicos para muchos microorganismos, pero generalmente estos hidrocarburos se evaporan rápidamente, y los alcanos de cadena muy larga presentan una mayor resistencia a la biodegradación. Por otro lado los hidrocarburos aromáticos de bajo peso molecular, tales como el benceno, tolueno y xilenos (compuestos altamente tóxicos y carcinogénicos) son rápidamente degradados por muchos microorganismos, (Guo *et al.*, 2005).

2.2 BACTERIAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS

En 1946, ZoBell reportó que más de 100 especies, representadas por 30 géneros microbianos, aisladas de muestras de suelos, agua de mar y sedimentos contaminados con desechos industriales, demostraron utilizar hidrocarburos como única fuente de carbono y energía. En el caso de las bacterias, hoy en día se conocen varios géneros y ciertas especies cuya capacidad catabólica hacia los hidrocarburos les permite adaptarse en zonas impactadas por ellos, sin que hasta el momento se haya encontrado una sola especie capaz de metabolizar a todas las fracciones y componentes que constituyen a los hidrocarburos fósiles (Van *et al.*, 2003). Entre éstos géneros destacan: *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Brevibacterium*, *Corinebacterium* y *Pseudomonas*; éste último representado por varias especies como *P. putida* y *P. aeruginosa* principalmente (Al-Hadhrami *et al.*, 1995; Atlas, 1981, Bartha y Atlas, 1977).

Generalmente en ecosistemas no contaminados por hidrocarburos, las BHDP constituyen menos del 1% del total de la población bacteriana, pero con el aporte de hidrocarburos al ecosistema, esta comunidad se incrementa rápidamente hasta en un 10% o más del total de esta población, tanto en aguas como en sedimentos (Atlas, 1995; Lizárraga, 1996; Lizárraga *et al.*, 1982).

Algunos organismos habitantes de zonas impactadas por hidrocarburos, como bivalvos, crustáceos y peces, entre otros, poseen bacterias hidrocarbonoclasticas en su tracto digestivo, sin que presenten acumulación de hidrocarburos en su interior (Lizárraga, *et al.*, 1983; Wong y Barrera, 1996). Botello (1981) reporta concentraciones de hidrocarburos muy bajas tanto para camarones (86-30 ppm) como para peces demersales (42-26 ppm) en la Sonda de Campeche, por lo que se ha sugerido que los organismos bentónicos pueden ser un factor muy importante para la remoción de hidrocarburos fósiles en sedimento.

Los trabajos de Atlas (1981; 1995), Atlas y Atlas (1991) señalan que bajo condiciones favorables las bacterias hidrocarbonoclasticas degradan prácticamente cualquier hidrocarburo, algunas de ellas desde alcanos (normales, parafinas cíclicas y ramificadas), otras aromáticos, y algunas más, tanto hidrocarburos parafínicos como aromáticos. Al crecer en un hidrocarburo puro, cerca de una tercera parte del carbono se usa para diferentes funciones metabólicas y celulares y el resto sirve para la obtención de energía. El bióxido de carbono y la biomasa celular producidos constituyen los productos finales de los procesos de degradación biológica y pueden ser aprovechados por consumidores de detritos.

2.3 PLÁSMIDOS DEGRADATIVOS EN BHDP

Los plásmidos son pequeñas moléculas de DNA extracromosomal distribuidas ampliamente en muchas células bacterianas. Son moléculas súper enrolladas, normalmente circulares, covalentemente cerradas y se replican independientemente del cromosoma bacteriano (Johnson y Woodford, 1998). Su tamaño varía entre los 2.2 (plásmido puc8) y 210 kb (plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*) (Nicklin *et al.*, 1998). En general, poseen genes que no son indispensables para las funciones bacterianas, pero bajo ciertas condiciones ambientales, como la presencia de antibióticos, metales pesados, hidrocarburos, etc., estos genes permiten que la bacteria se adapte, jugando un papel esencial en su crecimiento y ciclo de vida (Hartl y Jones, 2001; Dale, 1989).

Los plásmidos que le confieren a las bacterias la habilidad para degradar hidrocarburos, llamados comúnmente catabólicos o degradativos, han sido aislados de varias especies bacterianas marinas, especialmente del género *Pseudomonas* (Bull y Meadow, 1978; Shapiro, *et al.*, 1980) (Tabla 3).

Tabla 3. Plásmidos que determinan la degradación de hidrocarburos en bacterias hidrocarbonoclasticas (Bull y Meadow, 1978; Sakaguchi y Okanishi, 1980; Parsek *et al.*, 1996).

Plásmido	Sustrato	Especie
CAM	D y L-Alcanfor	<i>P. putida</i>
OCT	n-alcanos	<i>P. putida</i>
SAL	Salicilato	<i>Pseudomonas spp</i>
NAH	Naftaleno	<i>Pseudomonas putida</i>
TOL	Tolueno, m- y p-xilenos m-etiltolueno 1,2,4-trimetilbenzeno	<i>P. putida</i> (arvilla)
pAC25	3-clorobenzoato p-cresol	<i>P. putida</i> <i>P. putida</i>
pac27	3-clorocatecol	<i>P. putida</i>
pjp4	2-4- diclorofenoxiacetato	<i>Alcaligenes eutropus</i>
pp51	1,2,4- triclorobenzeno	<i>Pseudomonas spp</i>
pWW	fenilacetato	<i>Pseudomonas spp</i>

Los plásmidos degradadores de hidrocarburos, codifican para un número determinado de enzimas, encargadas de oxidar estos sustratos hasta intermediarios cercanos al metabolismo central de la bacteria. Su peso molecular (entre 8 y 117 kb aprox.), así como el hidrocarburo que degradan difiere notablemente entre uno y otro (Van *et al.*, 2003; Bull y Meadow 1978); sin embargo, algunos de ellos presentan rutas metabólicas muy similares, por lo que algunos autores han sugerido un origen común entre ellos (Bull y Meadow 1978; Shapiro *et al.*, 1980). Por ejemplo, en el caso de los plásmidos que codifican para la degradación del naftaleno (NAH), salicilato (SAL) y tolueno (TOL), los tres codifican para una secuencia metabólica en común; la conversión de catecol a un intermediario: acetaldehído y piruvato (Shapiro *et al.*, 1980; Parsek *et al.*, 1996) (Tabla 4).

Tabla 4. Rutas metabólicas para la degradación de hidrocarburos por plásmidos.

Plásmido	Sustrato primario	Vía degradativa
CAM	Alcanfor	Alcanfor \Rightarrow acetato + isobutirato
OCT	n-Alcano	Octano \Rightarrow octanoato
SAL	Salicilato	Salicilato \Rightarrow catecol
NAH	Naftaleno	Naftaleno \Rightarrow salicilato \Rightarrow catecol
TOL	Tolueno m-xileno p-xileno 1,2,4-	Tolueno \Rightarrow benzoato \Rightarrow catecol

} acetaldehído
+
piruvato

RUTAS METABÓLICAS PARA LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS POR BHPD

La degradación de hidrocarburos por bacterias se lleva a cabo, generalmente, a través de un proceso aeróbico mediado por un grupo de enzimas oxigenasas, donde el aceptor de electrones es el oxígeno molecular y los sustratos son oxidados hasta intermediarios del ciclo de Krebs, con la remoción sucesiva de pares de H^+ y electrones.

Existen varias rutas metabólicas para la degradación de los distintos hidrocarburos del petróleo. Una de las rutas más comunes para la degradación de alcanos es a través de una oxidación subterminal, dando lugar a dos ácidos grasos que se procesarán por β -oxidación (Figura 2). En esta ruta se incorpora el oxígeno en un carbono no terminal del hidrocarburo, obteniéndose un alcohol secundario, el cual es oxidado para dar una cetona, después un acetilester y finalmente un alcohol primario más ácido acético, que terminará por ser degradado por β -oxidación. Del mismo modo, el alcohol primario terminará por ser degradado a un grupo aldehído y finalmente a un grupo carboxilo, obteniéndose un ácido graso correspondiente, para ser degradado a acetil-CoA por β -oxidación (Benson, *et al.*, 1979; Morgan y Watkinson, 1994).

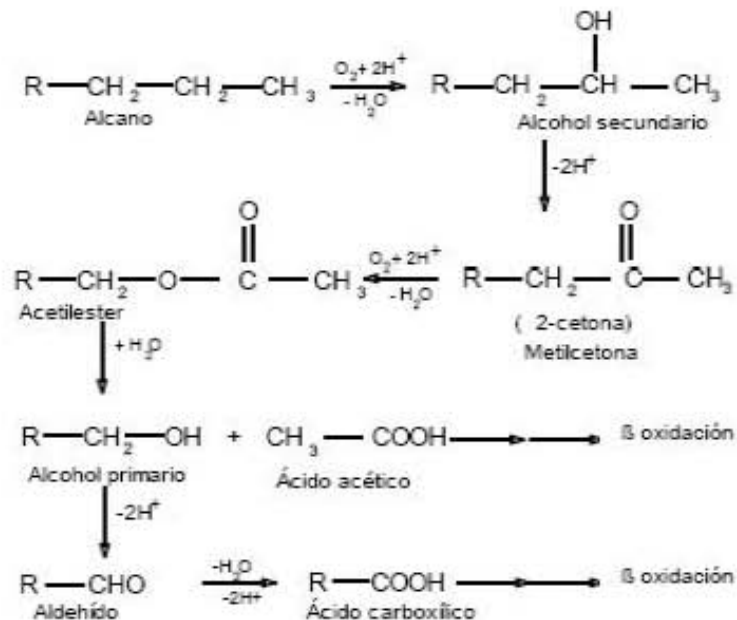


Figura 2. Ruta metabólica degradativa de un alcano.

En el caso de los hidrocarburos aromáticos, el principal problema al que se enfrentan las bacterias para degradarlos es romper su anillo aromático, el cual es muy variado. Para esto, la mayoría de las bacterias hidrocarbonoclasticas utilizan en forma sucesiva dos vías bioquímicas que permiten degradar estos compuestos hasta intermediarios del ciclo de Krebs. La primera, llamada *vía alta* o *superior* consiste en modificar los diferentes anillos aromáticos a un compuesto intermediario; comúnmente a catecol. Es decir, una gran variedad de hidrocarburos aromáticos que se pueden encontrar son modificados y convertidos a este compuesto. A partir de él se puede llevar a cabo el rompimiento del anillo mediante enzimas específicas. Esta segunda fase en la degradación es lo que se conoce como *vía baja* (Smith, 1994; Shapiro, et al., 1980).

Las enzimas que intervienen en las *vías altas* son codificadas por genes que se encuentran en el plásmido; no obstante, las que intervienen en las *vías bajas* suelen ser codificadas tanto por el plásmido como por el cromosoma bacteriano. La Figura 3 ilustra la ruta de oxidación de un hidrocarburo aromático: el tolueno; a través de estas vías expresadas en cepas de *P. putida* conteniendo el plásmido TOL (Shapiro et al., 1980; Ramos et al., 1997).

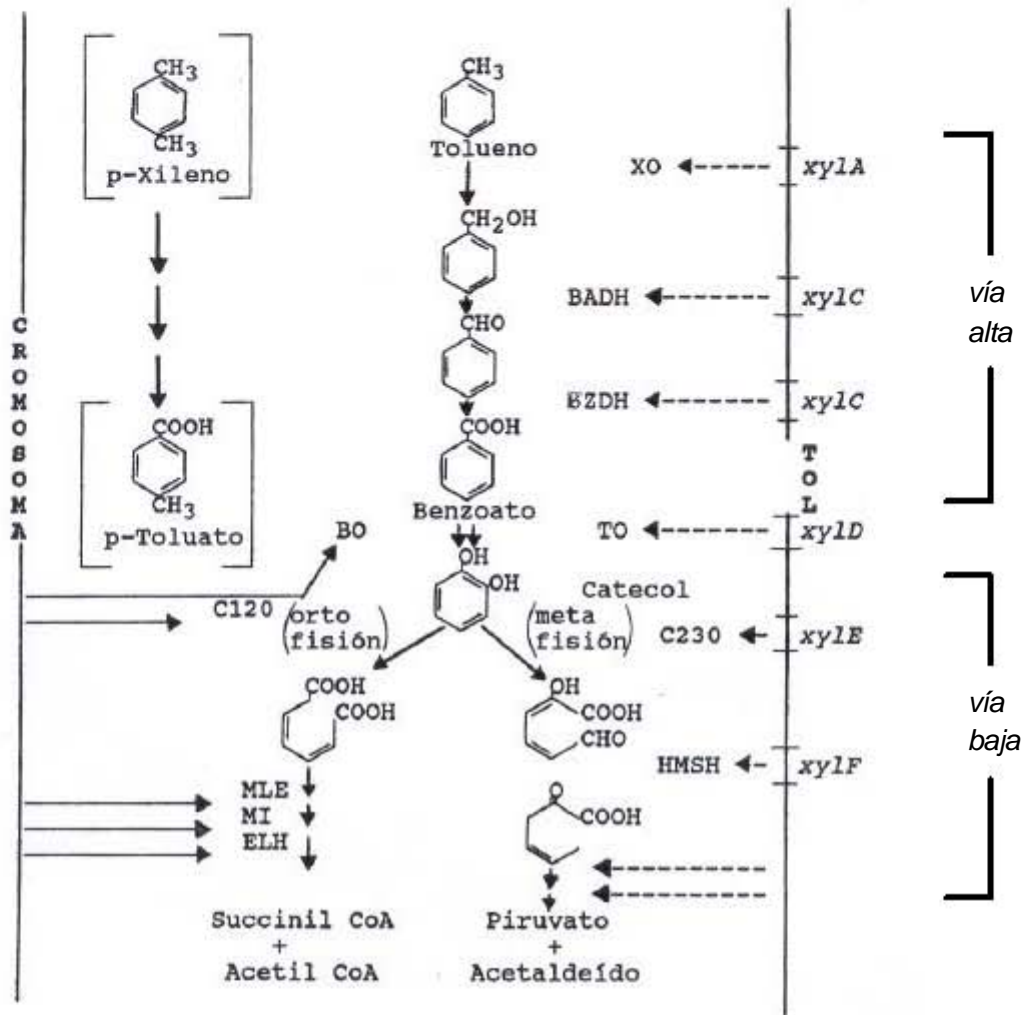


Figura 3. Ruta de oxidación para el tolueno. La línea vertical del lado izquierdo representa el cromosoma bacteriano de *P. putida* y la línea vertical del lado derecho representa el plásmido TOL (pWWO) (Shapiro *et al.*, 1980).

Enzimas codificadas por el cromosoma:

- BO= Benzoato oxidasa
- C120= Catecol 1,2-oxigenasa
- MLE= Enzima muconato lactolizante
- MI= Muconolactona isomerasa
- ELH= Lactona enol hidrolasa

Enzimas codificadas por el plásmido:

- XO= xileno oxidasa
- BADH= Benzil alcohol deshidrogenasa
- BZDH= Benzaldehido deshidrogenasa
- TO= Toluato oxidasa
- C230= Catecol 2,3-oxigenasa
- HMSH= 2 semialdehido hidromucónico hidrolasa

2.4 EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDOS: (Johnson y Woodford, 1998; Dale, 1989)

Para la extracción de plásmidos han sido desarrollados varios métodos, especialmente para plásmidos encontrados en *Escherichia coli* y enterobacterias relacionadas. Los métodos varían en cuanto a pureza, velocidad y facilidad para obtener el producto final en cantidades pequeñas o grandes.

Los métodos han sido desarrollados específicamente para el aislamiento de plásmidos de forma circular covalentemente cerrada (CCC); ya que la mayoría de los plásmidos que se encuentran en las bacterias existen como moléculas de este tipo; aunque existen métodos, en menor número, para aislar plásmidos lineales (OC), dímeros y otros multímeros.

De los diferentes métodos utilizados para el aislamiento de plásmidos, el desarrollado por Birnboim y Doly (1979) es generalmente el más útil, tanto para pequeñas como grandes cantidades de muestra. Este método se basa en una desnaturalización alcalina del DNA cromosomal, el cual se precipita junto con el RNA y proteínas de la bacteria, permaneciendo los plásmidos de forma CCC inalterados en el sobrenadante. Este método se utiliza comúnmente para desarrollar "Minipreps" (minipreparaciones) con plásmidos de DNA de hasta 1 ml de muestra.

Hoy día existen numerosos kits comerciales para la extracción de plásmidos basados en los principios de extracción por lisis alcalina.

3 HIPÓTESIS

Siendo el petróleo uno de los contaminantes más conspicuos en el mar y su biodegradación una actividad efectuada por microorganismos especializados, se propone el hecho de que puedan aislarse bacterias degradadoras y sus respectivos plásmidos en muestras de agua y sedimentos marinos impactados por hidrocarburos, así como en el tracto digestivo de organismos bentónicos que habitan estas zonas.

4 OBJETIVOS

Objetivo general:

- Determinar la presencia de plásmidos en bacterias degradadoras de hidrocarburos provenientes del Golfo de México, Golfo de Tehuantepec y la cuenca hidrotermal de Guaymas, Sonora, empleando muestras bacterianas de agua, sedimento y contenido estomacal de crustáceos.

Objetivos particulares:

- ◆ Obtener cepas puras de bacterias degradadoras de hidrocarburos aisladas de las muestras bacterianas provenientes de las tres zonas marinas en estudio.
- ◆ Obtener y estimar el peso molecular de plásmidos extraídos de las diferentes cepas bacterianas obtenidas.
- ◆ Determinar el tipo de bacterias presentes en las muestras de las tres zonas en estudio.

5 ÁREAS DE ESTUDIO

Golfo de México

El área de estudio se localiza en la región Sur y Suroeste del Golfo de México, frente a las costas de Tabasco y Campeche, en las coordenadas 18°00'-22°00' latitud Norte y 96°00'-88°00' longitud Oeste (Figura 4).

El Golfo de México es una cuenca de forma oval y profunda, rodeada al noreste por los litorales de la isla de Cuba y los Estados Unidos, y al sureste por la península de Yucatán; tiene una longitud aproximada de 1,600 km de Este a Oeste y 800 km de Norte a Sur, cubriendo un área total de 1,778,000 km², con regiones muy profundas mayores a los 3,400 m.

Su clima está considerado como una zona de transición entre subtropical y templado, con temperaturas, por lo general, entre los 19 a 26 °C (Patillo y Nelson, 2000; De la Lanza, 1991). Se observa una temporada de “nortes” considerada durante el período de Octubre a Abril, principalmente en Noviembre – Diciembre, donde alcanzan velocidades de 50 a 100 km/h.

En el presente los usos más importantes que se desarrollan en el golfo son la pesca en escala macroscópica, el transporte de materiales pesados y la industria del petróleo.

En el Golfo de México están localizadas las principales plataformas petroleras de todo el hemisferio Oeste. Al sur del Golfo de México, en la Sonda de Campeche, están localizadas las principales plataformas petroleras del territorio mexicano, produciendo el 75% del total del petróleo crudo en México (Botello, 1996 y Lizárraga *et al.*, 1982). En general, la contaminación por petróleo en la zona está asociada con su producción, transporte, explotación y desarrollo; la limpieza de los buques, rupturas de líneas de pipas y accidentes tanto de buque-transportadores como de pozos petroleros. Cuatro grandes derramen de petróleo han ocurrido en al Sonda de Campeche, siendo el del Ixtoc-I el más importante hasta el momento (06/03/1979; 3,100,000 barriles de petróleo crudo derramados; Botello, 1996; Vázquez *et al.*, 2000).

Golfo de Tehuantepec

El Golfo de Tehuantepec se localiza en la porción tropical-oriental del Pacífico, al sureste de la República Mexicana, delimitado por las coordenadas 14° 22´-16° 12´ latitud Norte y 92° 17´-96° 30´ longitud Oeste, frente a los estados de Oaxaca y Chiapas (Carranza *et al.*, 1998; Tapia 1998) (Figura 4). Es una región de aproximadamente 125,000 km², con una plataforma continental muy estrecha en la porción occidental, mientras que la parte oriental es muy extensa (Monreal y Salas 1998).

El clima es cálido subhúmedo con abundantes lluvias en verano, presentándose la mayor precipitación en el mes de Junio y hacia finales de otoño, variando desde 800 hasta 1600 mm anuales (Turner, 1992).

Las ondas frías del norte que pasan a través del Istmo de Tehuantepec llegan a una atmósfera más cálida, produciendo “vientos de descenso” de fuerte intensidad conocidos como “Tehuano” o “Tehuantepecanos” y son frecuentes de Octubre a Marzo (Vázquez *et al.*, 1998; De la Lanza 1991).

La zona costera de la subregión oaxaqueña ha experimentado un importante desarrollo petrolero e industrial a partir de 1975, principalmente con el inicio de la construcción de la Refinería “Ing. Antonio Dovalí Jaime” ubicado a 5 km al norte de la ciudad portuaria de Salina Cruz. Esta actividad ha provocado un aumento en los derrames accidentales de hidrocarburos a los ecosistemas en donde se realizan dichas actividades, registrándose hasta 1995, seis derrames en el estuario La Ventosa (Tapia, 1998).

Cuenca hidrotermal de Guaymas Sonora

La cuenca de Guaymas, Son., se localiza entre los 27° latitud Norte y los 111° longitud Oeste, está situada en la parte central del Golfo de California y comprendida dentro de la Provincia Costera del Golfo de California. Es una zona hidrotermal activa, asociada a un proceso de separación de la corteza oceánica (Figura 4).

El clima es semicálido y las costas son semidesérticas, con una evaporación de al menos 240-1,600 mm, mientras que la evaporación es alta en la boca del Golfo (1,400-2,000 mm). La precipitación es de 200-1,200 mientras que en la boca es de sólo 160 mm por año. La placa del Este del pacífico y su sistema de fallas geológicas dominan su tectonismo. (De la Lanza, 1991).

Su fondo marino se encuentra a 2,000 m de profundidad y está cubierto por una densa capa de sedimentos de origen terrígeno y pelágico estimado entre 300 y 500 m de espesor. Estos sedimentos, acumulados a lo largo de 150 mil años, presentan una tasa de sedimentación muy elevada, evaluada entre 1 a 2 mm por año (Calvert, 1966). Las bajas concentraciones de oxígeno disuelto en las capas más profundas del agua son de 0.6 a 0.7 ml/l (Campbell *et al.*, 1988) y las condiciones reductoras del medio sedimentario explican el fuerte porcentaje de carbono orgánico medido en los sedimentos, variando entre 3 y 4%. La temperatura registrada en el fondo es de 2.8 °C. La composición química del fluido hidrotermal de la cuenca de Guaymas presenta una formación de hidrocarburos de petróleo.

La transformación, así como la alteración química de la materia orgánica sedimentaria en petróleo, es la particularidad más significativa del sitio hidrotermal y está ligado a las condiciones de este tipo de sistema. La cantidad de petróleo formado en la depresión sur de la cuenca se estima en alrededor de 40 millones de toneladas (Didyk y Simoneit, 1989). De acuerdo con Marchand *et al.* (1994), la composición general de los hidrocarburos producidos por el sistema hidrotermal, parece ser muy similar a la de los petróleos crudos.

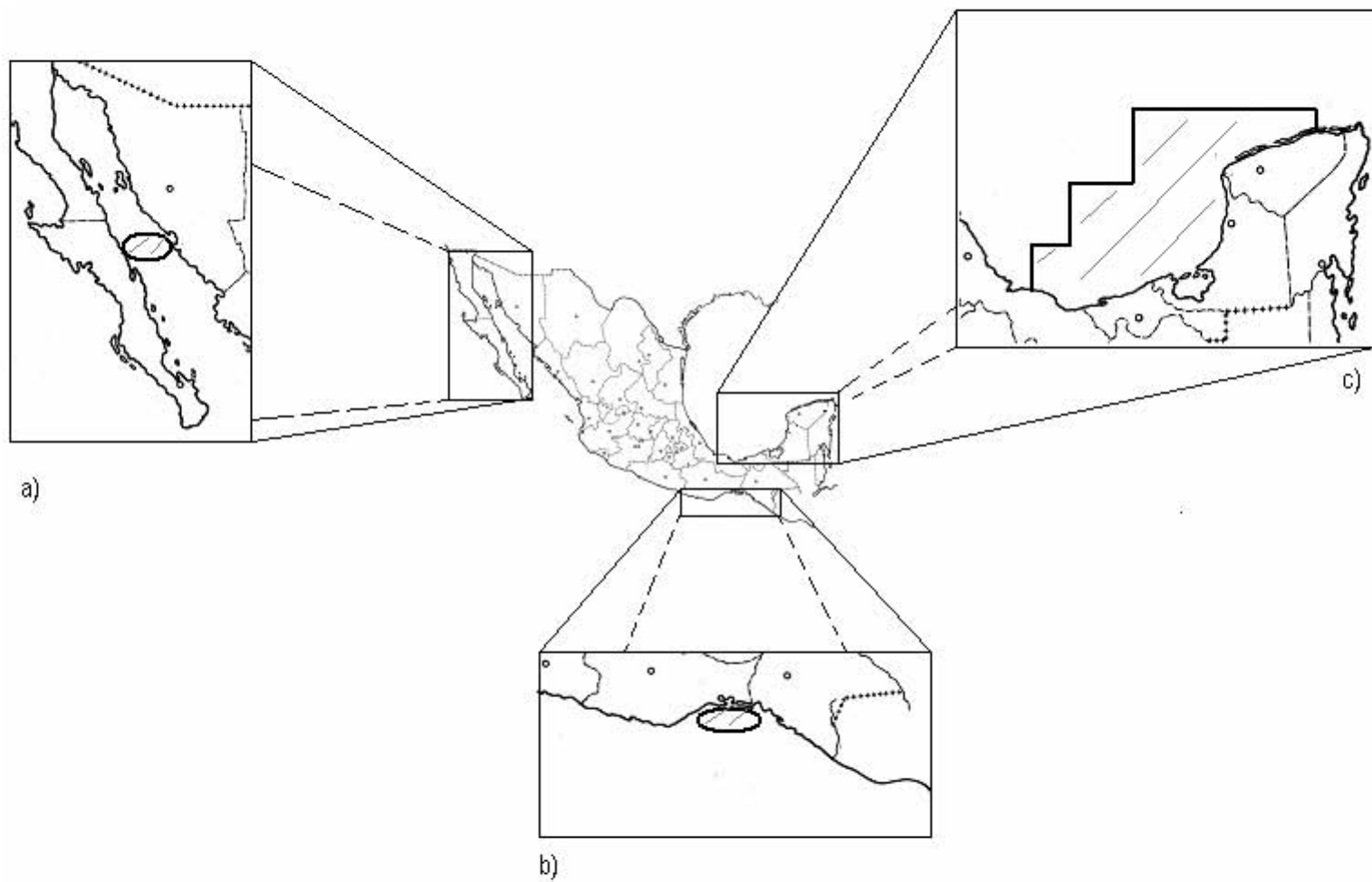


Figura 4. Áreas de estudio: a) Cuenca hidrotermal de Guaymas Son., b) Golfo de Tehuantepec, c) Golfo de México

6 MATERIAL Y MÉTODO

El material biológico analizado en el presente estudio pertenece a tres zonas marinas del territorio mexicano:

REGIÓN	TIPO DE MUESTRA
Golfo de México	: agua superficial (10 m) sedimento (entre 350 y 450 m aprox.)
Golfo de Tehuantepec	: sedimento (entre 12 y 938 m aprox.)
Cuenca hidrotermal de Guaymas, Son.:	contenido estomacal de macrocrustáceos bentónicos

6.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Agua y sedimento

Durante la Campaña Oceanográfica SGM6 (Sistema del Golfo de México), efectuada el mes de Septiembre del 2001, 81 estaciones de colecta marítima fueron muestreadas a bordo del buque oceanográfico “Justo Sierra” de la UNAM, en el suroeste del Golfo de México. Las estaciones se ubicaron entre los 18° y 22° de latitud Norte y entre los 88° y 96° de longitud Oeste. Para cada una de las estaciones se obtuvieron muestras de agua superficial (10 m de profundidad) y de sedimento. Las muestras de agua fueron colectadas con bolsas bacteriológicas Niskin (Niskin, 1962) y las de sedimento con una draga tipo Smith-McIntyre y un nucleador de caja para fondo blando.

Además, 8 muestras de sedimentos pertenecientes al programa de investigación FIQUIMBI I, realizado en Noviembre de 1989 en el Golfo de Tehuantepec y colectadas a

bordo del buque oceanográfico "El Puma", fueron tratadas en el presente estudio. Estas estuvieron almacenadas en refrigeración desde esa fecha hasta su procesamiento.

Contenido estomacal

13 muestras de contenido estomacal de crustáceos litoideos (*Neolithodes diomedae*) y braquiuros (*Bythogrea thermidor*) fueron analizados. Estos cangrejos fueron capturados cerca de las chimeneas hidrotermales de la cuenca de Guaymas, Sonora, en el Golfo de California, entre los 27° 0.891' y 27° 00.679' de latitud Norte y 111° 24.627' y 111° 24.413' de longitud Oeste, durante las inmersiones oceanográficas del crucero Atlantis/Alvin, realizadas del 28 de Abril al 3 de Mayo de 1998 a profundidades entre los 2000 y 2100 m. La disección de estos organismos se realizó a bordo del crucero y el contenido estomacal fue colocado en viales (1 ml de muestra por frasco) previamente esterilizados y adicionados con 9 ml de solución salina (0.4M NaCl, 0.028M MgSo₄ · 7H₂O y 0.1m KCl) y permanecieron almacenados en refrigeración a 4 °C hasta el presente estudio.

Para la obtención de bacterias hidrocarbonoclásticas, así como la de sus respectivos plásmidos, los 3 tipos de muestra fueron tratados bajo los mismos procedimientos y condiciones que a continuación se describen. Todos realizados en el laboratorio de Microbiología Marina del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL) de la UNAM.

6.2 AISLAMIENTO Y CONTEO DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE PETRÓLEO

Con el objeto de poder determinar la presencia de BHDP en las muestras y al mismo tiempo llevar a cabo su cuantificación, se utilizó la técnica del Número Más Probable (NMP).

Esta técnica consiste en el desarrollo de diluciones decimales de cada una de las muestras y de la elaboración de cultivos a través de las mismas (3-10 réplicas por dilución). Los cultivos se evalúan como positivos (+) o negativos (-) de acuerdo al criterio que se considere (turbidez, viscosidad, etc.). Después, los datos obtenidos en cada una de las diluciones se comparan con los proporcionados en tablas estadísticas

correspondientes para obtener el número más probable de microorganismos viables presentes en una cierta cantidad de muestra analizada (generalmente 100 ml) (Atlas, 1981; Kelley, 1991). Este método ha sido propuesto como el más seguro para el aislamiento y enumeración de microorganismos degradadores de petróleo en estuarios y ambientes marinos, comparado con el conteo en placa (Mills *et al.*, 1978; Walter y Colwell, 1976).

DILUCIONES

Para cada una de las muestras se realizaron diluciones decimales en serie de seis de la forma siguiente: a partir de la muestra original o muestra no diluida se tomó 1 ml de ésta y se inoculó a un primer tubo estéril que contenía previamente 9 ml de medio mineral diluido*, específico para bacterias hidrocarbonoclasticas (Lyman y Fleming, 1940), obteniendo la dilución 10^{-1} . Enseguida se tomó 1 ml de este tubo y se inoculó a uno segundo con 9 ml del mismo medio mineral para obtener la dilución 10^{-2} , y así sucesivamente, hasta obtener la dilución 10^{-6} (Figura 5: a).

CULTIVOS EN RÉPLICA

Los cultivos se hicieron a partir de las muestras originales y las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} de agua y contenido estomacal, así como las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} de sedimento. Para esto se prepararon 3 frascos de vidrio con tapón de rosca de 18 ml de capacidad, conteniendo 9 ml de medio mineral diluido* (Lyman y Fleming, 1940) y 50 μ l de petróleo crudo (proveniente del Ixtoc-I); adicionado como única fuente de carbono para asegurar el crecimiento de bacterias hidrocarbonoclasticas. Después cada frasco fue inoculado con 1 ml de la dilución y se dejaron incubar por un período de 2 meses a 30 ± 2 °C en el laboratorio de Microbiología Marina del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM (Figura 5: a).

* Ver APÉNDICE 1

Los controles se hicieron a partir de frascos conteniendo el mismo medio de cultivo con petróleo pero sin inóculo y recibieron el mismo tratamiento.

El criterio considerado para determinar el crecimiento de BHDP como positivo (+) fue la turbidez (emulsión; como crema de chocolate) desarrollada en los frascos.

De esta manera:

Turbidez (emulsión) = actividad degradativa positiva (+)

No turbidez (sin emulsión) = actividad degradativa negativa (-)

Las concentraciones de bacterias presentes por cada 100 mililitros se determinaron empleando las tablas estadísticas correspondientes para el NMP (Guinea *et al.*, 1979).

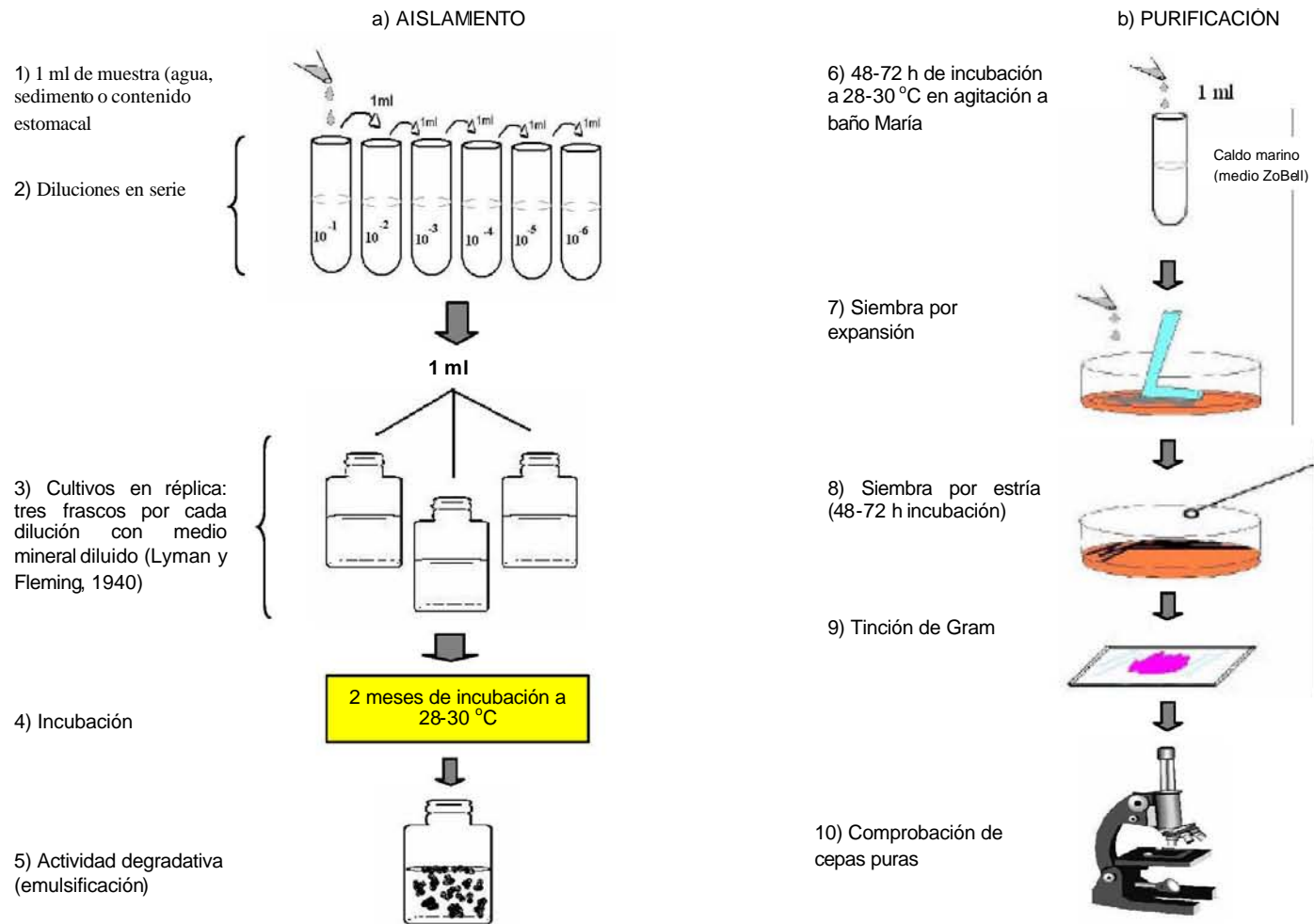


Figura 5. Aislamiento (a) y purificación (b) de cepas hidrocarbonoclasticas de muestras de agua, sedimento y contenido estomacal de crustáceos provenientes del Golfo de México, Golfo de Tehuantepec y la cuenca hidrotermal de Guaymas Son.

6.3 PURIFICACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

Con el objeto de poder contar con cepas puras para la extracción de plásmidos, así como para su posterior identificación hasta especie, se seleccionaron 32 muestras representativas de agua, sedimento y contenido estomacal de las tres zonas de estudio, considerándose tanto su actividad degradativa como sus concentraciones bacterianas en los cultivos anteriormente evaluados por el método del NMP.

Para esto se tomó una alícuota de 1 ml directamente de los cultivos y se agregó a un tubo con tapón de rosca conteniendo 20 ml de medio Marino tipo ZoBell (Oppenheimer y ZoBell, 1952) específico para bacterias marinas, previamente esterilizado, y se dejaron incubar en agitación a baño María, a una temperatura de 28-30 °C por 48-72 h o hasta alcanzar una turbidez similar al grado 0.5 de la escala de McFarland. De estos nuevos cultivos se hicieron siembras en placa para obtener cepas puras. Se utilizaron las técnicas de siembra por expansión y estría sobre agar marino tipo ZoBell (Difco 2216) específico para bacterias marinas, para esto se tomó una alícuota de 100 µl del cultivo y se inoculó en placa, enseguida se expandió con una asa de vidrio estéril y se incubaron por 48-72 h a 28-30 °C (Figura 5: b).

Después de su incubación, de éstos cultivos en placa se tomó una colonia al azar y se sembró por estriado en una nueva caja, para lograr una mejor separación de las células y así obtener colonias discretas de diferentes posibles especies presentes en las muestras. Las siembras se hicieron por duplicado y se dejaron incubar por 48-72 h a 28-30 °C (Figura 5: b).

De esta última técnica fue necesario repetir el procedimiento de 2 a 3 veces para poder obtener cepas completamente puras. Su pureza se comprobó a través de preparaciones hechas en tinción de Gram* y observadas al microscopio óptico a 10X, 40X y 100X, con la finalidad de diferenciar las bacterias Gram negativas (-) de las Gram positivas (+) y determinar su forma celular.

* Ver APÉNDICE 1

PURIFICACIÓN DE CONSORCIOS BACTERIANOS

Las asociaciones o consorcios bacterianos encontrados en todas las muestras de contenido estomacal y que no fue posible separarlos inicialmente con las técnicas anteriores, a diferencia de las de agua y sedimento, se logró por sonicación, utilizando un sonicador de baño María a 117 volts, 50-60 H (Branson, ultrasonic cleaner). El procedimiento fue el siguiente: para cada una de las muestras se hicieron diluciones en serie de cuatro, en frascos “pildoreros” con tapón de rosca que contenían una mezcla de agua de mar y agua destilada (Pereira *et al.*, 2002) previamente esterilizados. Estos fueron inoculados tomando varias asadas del cultivo en placa hasta igualar el grado 0.5 de la escala de McFarland; obteniéndose 4 lotes en total. Posteriormente un primer lote fue sometido a 5 minutos de sonicación como tiempo inicial mínimo, concluyendo el cuarto lote con 20 minutos de tratamiento. Sin embargo, debido a la pureza poco satisfactoria (comprobada a microscopio óptico a 100X), el tratamiento se incrementó a 10 minutos como tiempo inicial.

6.4 EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO

Para la extracción de plásmidos se tomaron 4 de las cepas purificadas de la región del Golfo de México, 3 del Golfo de Tehuantepec y 5 de la cuenca hidrotermal de Guaymas, Son.

La extracción se hizo a través de una minipreparación (Miniprep) de cada una de las muestras, por medio del Kit comercial QIAprep Spin Miniprep de QIAGEN, cuya metodología se basa en el principio de lisis alcalina de bacterias propuesto por Birnboim y Doly (1979), seguida de la adsorción de ADN plasmídico en sílica en presencia de sales.

El paso preliminar a la técnica consiste en la obtención de cultivos bacterianos en caldo LB con una turbidez del 0.5 en la escala de McFarland sugerido por Birnboim y Doly (1979); sin embargo, debido al crecimiento poco satisfactorio en este medio, los cultivos se realizaron primero en medio ZoBell (Difco 2216) y se dejaron incubar por 48-72 h a 30 ± 2 °C. Después, fueron “rastrillados” para ser inoculados directamente en tubos con caldo LB hasta igualar el grado de turbidez sugerido para proseguir con la técnica.

Después, 1.5 ml de cultivo se transfirió a un tubo Eppendorf estéril y se centrifugó por 30 segundos en una microcentrífuga a máxima velocidad (10,000 g) y se eliminó el sobrenadante.

Miniprep a través del kit QIAprep Spin Miniprep:

1. Se resuspendió el pellet de células bacterianas en 250 µl del buffer P1* y se transfirió a un tubo de microcentrífuga y se aseguró que la RNAsa A* había sido agregada al buffer P1.
2. Se colocó 250 µl del buffer P2* invirtiendo suavemente el tubo de 4 a 6 veces para mezclarlo y se continuó invirtiendo hasta que la solución se volvió viscosa y ligeramente clara, sin permitir que la reacción de lisis procediera por más de 5 min. No se usó vortex.
3. Se agregaron 350 µl de buffer N3* e inmediatamente se invirtió suavemente el tubo, de 4 a 6 veces para eliminar precipitados, observándose una solución opaca.
4. Se centrifugó a máxima velocidad por 10 min. Un pellet de color blanco se formó. Durante la centrifugación se colocó una columna "QIAprep" en un tubo colector de 2 ml.
5. Se agregó el sobrenadante del paso 4 a la columna QIAprep, por decantación o pipeteado.
6. Se centrifugó de 30-60 segundos a máxima velocidad y se descargó el sobrenadante.
7. Se lavó la columna QIAprep agregando 0.75 ml del buffer PE* y se centrifugó nuevamente de 30-60 seg a máxima velocidad.
8. Se descargó el líquido obtenido y se volvió a centrifugar por un minuto más, para remover residuos del buffer de lavados.
9. Se colocó una columna QIAprep en un tubo Eppendorf limpio de 1.5 ml. Para eluir el DNA, se agregó 50 µl de buffer EB* (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) o H₂O al centro de cada una de las columnas QIAprep. Se dejó por diez minutos y después se centrifugó por un minuto.

*Reactivos incluidos en el kit (ver APENDICE 2)

ELECTROFORESIS

Para la comprobación de los plásmidos presentes en las extracciones obtenidas a través de la Miniprep, el DNA plasmídico obtenido en cada una de las cepas se corrió por electroforesis en geles de agarosa al 0.5% por tratarse de plásmidos mayores a 2 Kb (Sambrook y Russell, 2001). Se utilizó una celda para electroforesis Minicell[®] Primo, modelo EC320, conectada a una fuente de poder Life Thecnologies, modelo 250. El proceso corrió bajo las siguientes condiciones:

- voltaje 60 V (6V/cm)
- corriente 60 mA
- poder 250 W
- duración 40 min.

Junto con las muestras se corrió el control 60C1 de *P. putida*. Esta cepa presenta un plásmido con peso molecular de 8,080 pb que ya ha sido utilizado como marcador de referencia (Molino, 2000). También se agregó el marcador de peso molecular Ready-Load[™] 1 kb DNA Ladder de Invitrogen que contiene fragmentos de DNA de pesos conocidos, con los cuales se calculó la curva patrón de los geles y a la vez, estimar los pesos moleculares de los plásmidos en estudio.

Después de llevar a cabo la electroforesis, los geles fueron irradiados con una lámpara de luz UV marca Roythec, modelo LS-88, a longitudes de onda larga y corta (250-320 nm y 320-400 nm respectivamente) para hacer un examen preliminar de los geles.

Enseguida, fueron observados en un transiluminador de la marca Electronic Dual Light[™] Transilluminator (con cámara fotográfica CCD integrada y adaptada a una computadora con el programa DNA READER para captura de imágenes), para el análisis de cada uno de los geles obtenidos.

6.5 IDENTIFICACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

Se efectuaron preparaciones en tinción de Gram* de todas las cepas bacterianas seleccionadas con la finalidad de diferenciar entre bacterias Gram negativas y Gram positivas; así como entre las diferentes formas celulares clasificadas de acuerdo con su morfología (bacilos, cocos, etc.). Después se les aplicó la prueba de la oxidasa que permitió determinar el tipo de pruebas bioquímicas utilizadas para su identificación (Holt *et al.*, 1994).

Para la identificación taxonómica de los bacilos Gram negativos y que resultaron positivos a la prueba de oxidasa, se utilizó el Sistema Api 20 NE de los laboratorios bioMérieux, ya que es una de las pruebas bioquímicas más rápidas y mejor recomendadas para identificar bacterias Gram negativas no entéricas (Appelbaum y Leathers 1984, y Sogaard *et al.*, 1986).

PRUEBAS BIOQUÍMICAS POR EL SISTEMA API 20 NE

Inóculo:

En un tubo conteniendo 2 ml de cloruro de sodio al 0.85 % se realiza una suspensión bacteriana, con una turbidez igual al patrón 0.5 de la escala de McFarland.

Inoculación de la galería:

Los microtubos (no las cúpulas) de las pruebas nitrato de potasio (NO₃) a p-nitrofenil-BD galactopiranosido (PNPG) se inoculan con la suspensión bacteriana. Después se transfieren 8 gotas de la suspensión bacteriana al medio AUX*, se mezcla suavemente evitando la formación de burbujas y enseguida se llenan los microtubos y las cúpulas de las pruebas glucosa (GLU) a fenil-acetato (PAC).

Las pruebas subrayadas glucosa (GLU), arginina (ADH) y urea (URE) se llenan con aceite de parafina estéril de tal manera que se forme un menisco convexo. Luego se cubre la cámara y se deja incubar a 30 °C durante 24-48 h.

Después de la incubación, la lectura se lleva a cabo observando la ausencia (-) o presencia de turbidez (+) en cada una de las pruebas. Para la lectura de la prueba NO_3 se agregan los reactivos NIT1* Y NIT2* y para la prueba triptofano (TRP) el reactivo JAMES*.

Todas las reacciones se registran en las fichas correspondientes para ser comparadas con el catálogo analítico (Analytical Profile Index, 1999).

* Reactivos incluidos en el sistema (ver APÉNDICE 2)

7 RESULTADOS

7.1 PRESENCIA DE BACTERIAS HIDROCARBONOCLÁSTICAS

De los cultivos hechos con las muestras de cada una de las tres regiones, elaborados con medio mineral y adicionados con petróleo como única fuente de carbono (Lyman y Fleming, 1940), se comprobó la presencia de BHDP (Figura 6).

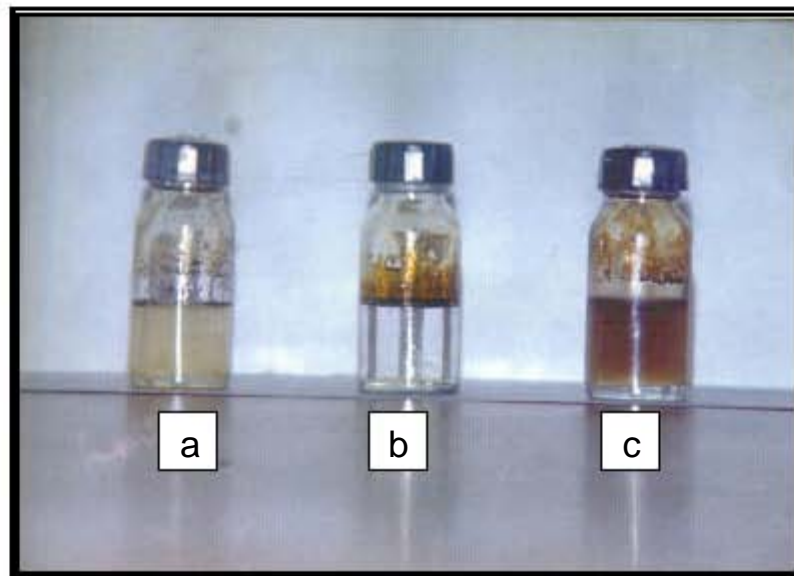


Figura 6. Cultivos en frascos con medio mineral adicionados con petróleo como única fuente de carbono. a): frasco con poca degradación; b): frasco control; c): frasco con alta degradación.

Para las muestras de agua provenientes del Golfo de México se obtuvo el 73% de actividad degradativa y un 64% para las muestras de sedimento, de un total de 81 muestras (100%) para ambos casos (Tabla 5).

En el caso de las muestras de sedimento provenientes del Golfo de Tehuantepec, el 75% mostró actividad biodegradativa, es decir, 6 de un total de 8.

De las muestras del contenido estomacal de crustáceos provenientes de las chimeneas hidrotermales de Guaymas, Son., el 77% presentó una lectura positiva a la actividad biodegradativa, es decir; 10 de un total de 13, aunque esta actividad comparada con la obtenida en las otras dos regiones, solo pudo observarse después de las tres primeras semanas de haberse iniciado la incubación.

Área de estudio	Actividad degradativa
Golfo de México	73% (agua)
	64% (sedimento)
Golfo de Tehuantepec	75% (sedimento)
Guaymas Son.	77% (contenido estomacal)

Tabla 5. Porcentaje de la actividad degradativa (emulsificación) en cultivos bacterianos desarrollados en muestras de agua, sedimento y contenido estomacal de las tres zonas en estudio.

Los resultados generales obtenidos para cada uno de los cultivos hechos con las muestras de las tres regiones se presentan en la Tabla 6 y están expresadas en actividad biodegradativa (emulsificación) positiva (+) o negativa (-).

Tabla 6. Actividad biodegradativa de cultivos bacterianos provenientes del Golfo de México, Golfo de Tehuantepec y la cuenca hidrotermal de Guaymas Son., después de dos meses de incubación en medio mineral adicionado con petróleo (Lyman y Fleming, 1940).

GOLFO DE MÉXICO						GOLFO DE TEHUANTEPEC		GUAYMAS SONORA	
ESTACION	AGUA	SEDIMENTO	ESTACION	AGUA	SEDIMENTO	ESTACION	SEDIMENTO	ESTACION	CONTENIDO ESTOMACAL
1/A03	-	-	41/CH009	+	+	20/S	-	C1GC/L1	+
2/A04	-	-	42/CH043	+	+	21/S	+	C2GC/L1	+
3/A05	-	-	43/CH052	+	+	22/S	-	3207/L1	+
4/B05	+	+	44/CH087	+	+	29/S	+	3208/L1	+
5/B04	-	-	45/CH074	+	+	33 A/S	+	3209/L1	-
6/B03	-	-	46/*F06	+	+	33 B/S	+	3210B/L1	+
7/B02	-	+	47/G05	+	+	37/S	+	C1GC/L2	+
8/B01	+	+	48/G04	+	+	40/S	+	C2GC/L2	-
9/CH061	+	+	49/G03	+	+			3207B/L2	-
10/CH62	+	-	50/H04	+	+			3208/L2	+
11/C06	+	+	51/H05	+	+			3209B/L2	+
12/C05	+	+	52/CH105	+	+			3210B/L2	+
13/C04	+	+	53/G06	+	+			G.S.-L1	+
14/C03	+	+	54/G*07	+	+				
15/C02	+	+	55/CH098	+	+				
16/C01	+	+	56/CH011	+	+				
17/D01	+	+	57/G08	+	+				
18/D02	+	+	58/G09	+	-				
19/D03	-	-	59/G10	-	-				
20/D04	+	+	60/G11	-	-				
21/D05	+	+	61/G12	-	-				
22/D06	+	+	62/H12	-	-				
23/E08	+	+	63/H11	-	-				
24/E07	+	+	64/H10	+	-				
25/CH030	+	+	65/H09	+	-				
26/E06	+	+	66/I06	+	+				
27/E05	+	+	66/I08	+	-				
28/E04	+	+	67/H07	+	+				
29/E03	+	+	68/H06	+	+				
30/E02	+	+	69/I06	+	+				
31/E01	+	+	70/I07	+	+				
32/E2*	+	+	71/I08	+	-				
33/E03*	+	+	72/I09	+	-				
34/*RFO1	+	+	73/I 10	-	-				
34/F03	+	+	74/I 11	-	-				
35/F04	+	+	75/I12	-	-				
36/F05	+	+	76/J12	-	-				
37/FO6	+	+	77/K12	-	-				
38/F07	+	+	78/I12	-	-				
39/CH048	+	+	79/M12	-	-				
40/F08	+	+							

+ Emulsión
- sin emulsión

Los resultados generales de las concentraciones bacteriológicas obtenidas para cada uno de los cultivos hechos con las muestras de las tres regiones se presentan en la Tabla 7 y están expresadas en NMP de:

BHDP/100 ml de muestra

Para las muestras de agua superficial del Golfo de México, se obtuvieron concentraciones que oscilaron entre las 36 y 1.1×10^5 bacterias/100 ml, registrándose por lo general, las concentraciones más altas en las estaciones comprendidas en el interior y alrededores del área de las plataformas petroleras; es decir, entre las estaciones 26/E06 y 58/G09, como se muestra en la Figura 7:a. La mayoría de estas estaciones muestra una concentración de 11,000 bacterias/100 ml.

Con respecto a las muestras de sedimento, las concentraciones fluctuaron entre las 3.6×10^6 y 1.1×10^8 bacterias/100 ml de sedimento húmedo. Las concentraciones más altas se ubicaron entre las estaciones 34/F03 y 57/G08, localizadas también en el área de las plataformas y sus alrededores (Figura 7:b).

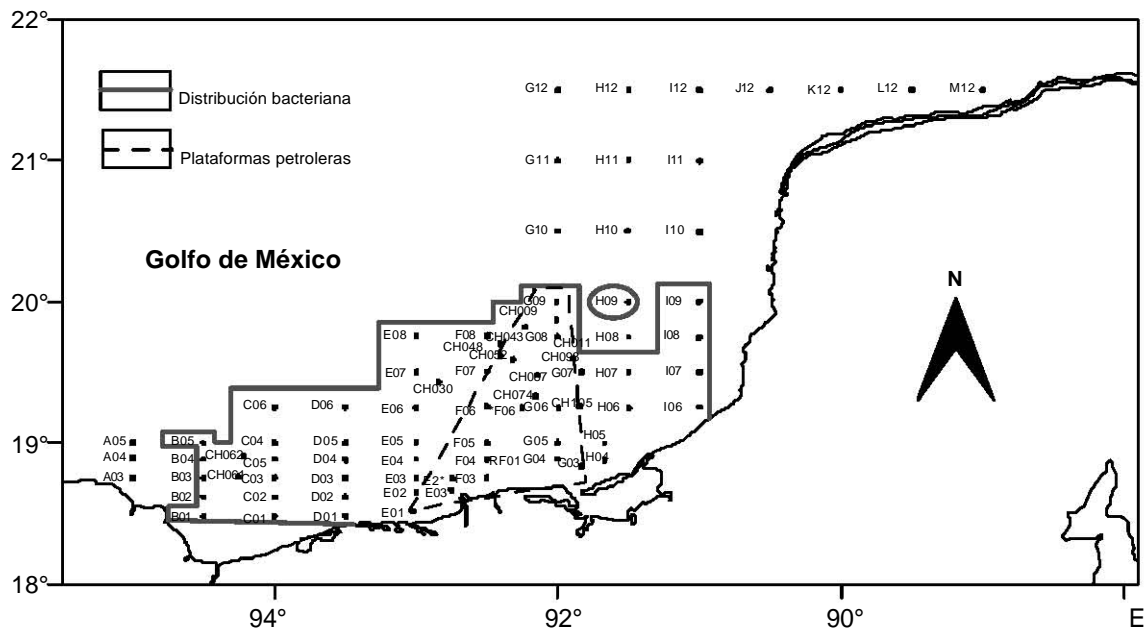
En algunas estaciones no hubo presencia de bacterias degradadoras de petróleo tanto en muestras de agua como de sedimento. Las muestras de agua que no presentaron degradación pertenecen a las estaciones 1/A5 a 7/B02, 59/G10 a 64/H10, 66/I06 a 66/I08, 73/F10 a 79/M12; mientras que para las muestras de sedimento que no presentaron degradación pertenecen a las estaciones I/A03 a 6/B03, 10/CH62, 19/B03, 58/G09 a 65/H09, 66/I08, 71/I08 a 79/M12. Estas estaciones de agua y sedimento corresponden precisamente a las que se encuentran más alejadas del área de las plataformas, como se muestra en la Figura 7.

En los sedimentos del Golfo de Tehuantepec las concentraciones de bacterias degradadoras fluctuaron entre las 2.6×10^4 y 4.9×10^6 bacterias/100 ml.

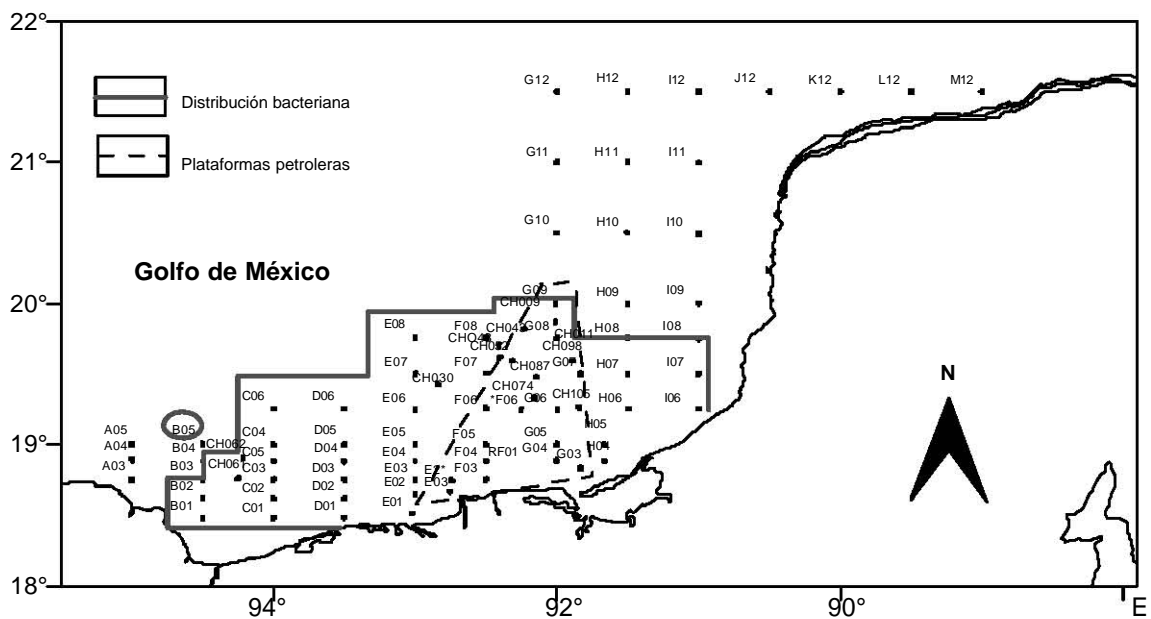
Para las muestras de contenido estomacal de crustáceos de la cuenca hidrotermal de Guaymas, Son. se obtuvieron concentraciones que oscilaron entre las 9×10^2 y 3.2×10^4 bacterias/100 ml.

Tabla 7. Concentraciones de bacterias hidrocarbonoclasticas en cultivos hechos con muestras provenientes del Golfo de México, Golfo de Tehuantepec y la cuenca hidrotermal de Guaymas Son., después de dos meses de incubación en medio mineral adicionado con petróleo (Lyman y Fleming, 1940).

GOLFO DE MÉXICO						GOLFO DE TEHUANTEPEC		GUAYMAS SONORA	
ESTACIÓN	AGUA	SEDIMENTO	ESTACIÓN	AGUA	SEDIMENTO	ESTACIÓN	SEDIMENTO	ESTACIÓN	CONTENIDO ESTOMACAL
1/A03	0	0	41/CH009	2.8 X 10 ²	1.5 X 10 ⁷	20/S	7 X 10 ⁴	C1GC/L1	1.7 X 10 ³
2/A04	0	0	42/CH043	2.3 X 10 ¹	1.1 X 10 ⁵	21/S	2.1 X 10 ⁵	C2GC/L1	14 X 10 ²
3/A05	0	0	43/CH052	1.1 X 10 ⁴	1.1 X 10 ⁵	22/S	4 X 10 ⁵	3207/L1	32 X 10 ³
4/B05	3.6 X 10 ¹	7.3 X 10 ⁴	44/CH087	2.1 X 10 ³	1.1 X 10 ⁵	29/S	2 X 10 ⁵	3208/L1	26 X 10 ²
5/B04	0	0	45/CH074	1.1 X 10 ⁴	1.1 X 10 ⁵	33 A/S	1.7 X 10 ⁵	3209/L1	7 X 10 ¹
6/B03	0	0	46/*F06	2.1 X 10 ³	1.1 X 10 ⁵	33 B/S	2.6 X 10 ⁵	3210B/L1	21 X 10 ³
7/B02	0	3.6 X 10 ⁴	47/G05	1.1 X 10 ⁴	1.1 X 10 ⁵	37/S	4.9 X 10 ⁵	C1GC/L2	17 X 10 ²
8/B01	2.8 X 10 ²	9.1 X 10 ⁴	48/G04	1.1 X 10 ⁴	1.1 X 10 ⁵	40/S	1.4 X 10 ⁵	C2GC/L2	7 X 10 ¹
9/CH061	7.3 X 10 ¹	2.8 X 10 ⁵	49/G03	2.1 X 10 ³	1.1 X 10 ⁵			3207B/L2	6 X 10 ¹
10/CH62	3.6 X 10 ¹	0	50/H04	1.1 X 10 ⁴	1.1 X 10 ⁵			3208/L2	17 X 10 ²
11/C06	2.8 X 10 ²	1.1 X 10 ⁵	51/H05	1.1 X 10 ⁴	1.1 X 10 ⁵			3209B/L2	12 X 10 ²
12/C05	2.8 X 10 ²	2 X 10 ⁵	52/CHI05	1.1 X 10 ⁴	1.1 X 10 ⁵			3210B/L2	9 X 10 ²
13/C04	1.1 X 10 ⁴	1.1 X 10 ⁵	53/G06	1.1 X 10 ⁴	1.1 X 10 ⁵			G.S.-L1	20 X 10 ³
14/C03	2.8 X 10 ²	2 X 10 ⁵	54/G*07	1.1 X 10 ⁴	1.1 X 10 ⁵				
15/C02	3.6 X 10 ¹	3.6 X 10 ⁴	55/CH098	1.1 X 10 ⁴	1.1 X 10 ⁵				
16/C01	3.6 X 10 ¹	3.6 X 10 ⁴	56/CH011	4.6 X 10 ³	1.1 X 10 ⁵				
17/D01	2.8 X 10 ²	2 X 10 ⁵	57/G08	2.1 X 10 ³	1.1 X 10 ⁵				
18/D02	2.8 X 10 ²	2.8 X 10 ⁵	58/G09	1.1 X 10 ⁴	0				
19/D03	0	0	59/G10	0	0				
20/D04	2 X 10 ²	2.8 X 10 ⁵	60/G11	0	0				
21/D05	2.8 X 10 ²	2 X 10 ⁵	61/G12	0	0				
22/D06	2.1 X 10 ³	7.3 X 10 ⁴	62/H12	0	0				
23/E08	2.1 X 10 ²	7.3 X 10 ⁴	63/H11	0	0				
24/E07	1.5 X 10 ³	1.1 X 10 ⁵	64/H10	0	0				
25/CH030	2 X 10 ²	2.1 X 10 ⁷	65/H09	9.3 X 10 ²	0				
26/E06	1.1 X 10 ⁴	1.1 X 10 ⁵	66/I06	0	2 X 10 ⁵				
27/E05	1.1 X 10 ⁴	2.8 X 10 ⁵	66/I08	0	0				
28/E04	1.1 X 10 ⁴	1.1 X 10 ⁵	67/H07	2.8 X 10 ²	1.1 X 10 ⁵				
29/E03	1.1 X 10 ⁴	1.5 X 10 ⁷	68/H06	1.1 X 10 ⁴	1.1 X 10 ⁵				
30/E02	2 X 10 ²	2.8 X 10 ⁵	69/I06	4.6 X 10 ³	9.1 X 10 ⁴				
31/E01	1.5 X 10 ³	2.1 X 10 ⁷	70/I07	2.8 X 10 ²	3.5 X 10 ³				
32/E2*	1.1 X 10 ⁵	2.8 X 10 ⁵	71/I08	4.6 X 10 ³	0				
33/E03*	2.8 X 10 ²	9.3 X 10 ⁵	72/I09	4.6 X 10 ³	0				
34/*RFO1	2.8 X 10 ²	2.8 X 10 ⁵	73/I 10	0	0				
34/F03	7.3 X 10 ¹	1.1 X 10 ⁵	74/I 11	0	0				
35/F04	1.1 X 10 ³	2.1 X 10 ⁷	75/I12	0	0				
36/F05	2.1 X 10 ³	1.1 X 10 ⁵	76/J12	0	0				
37/F06	1.1 X 10 ⁴	1.1 X 10 ⁵	77/K12	0	0				
38/F07	1.1 X 10 ⁴	1.1 X 10 ⁵	78/I12	0	0				
39/CH048	1.1 X 10 ⁴	1.1 X 10 ⁵	79/M12	0	0				
40/F08	2.1 X 10 ²	2.8 X 10 ⁵							



a) agua superficial



b) sedimento

Figura 7. Distribución de bacterias hidrocarbonoclasticas a lo largo de las estaciones muestreadas en el Golfo de México, durante la campaña oceanográfica SGM6-2001: a) Distribución bacteriana en agua superficial (10 m); b) Distribución bacteriana en sedimento.

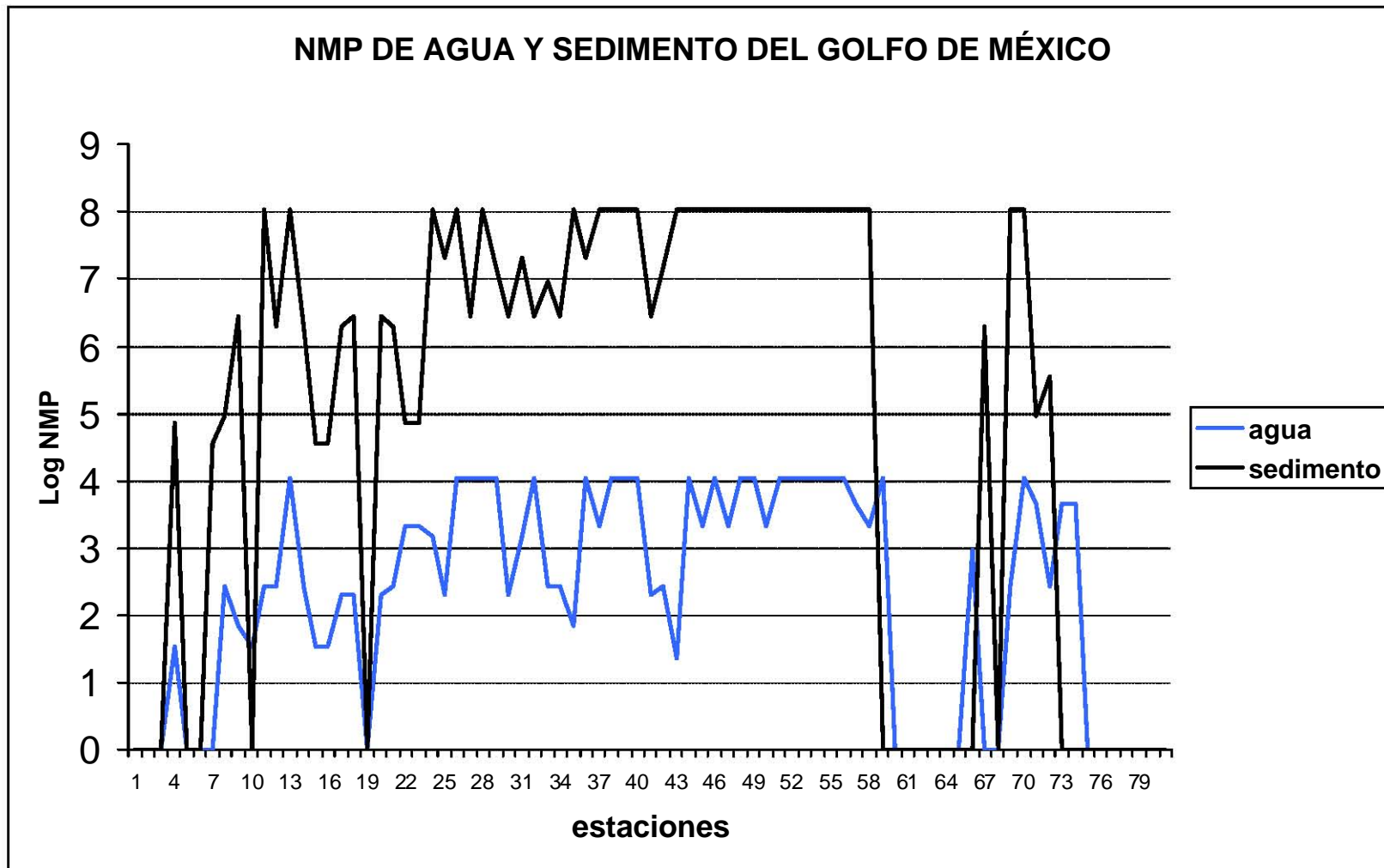


Figura 8. Concentraciones en NMP/100 ml de bacterias degradadoras de hidrocarburos en agua y sedimento, colectadas durante el programa SGM-6 en el Golfo de México.

7.2 BACTERIAS HIDROCARBONOCLÁSTICAS PURIFICADAS

ELECCIÓN DE MUESTRAS

De las muestras que presentaron tanto una actividad bacteriana (+) como una concentración representativa de las mismas, se seleccionaron 32 para la purificación de cepas hidrocarbonoclasticas: 19 del Golfo de México (9 de agua y 10 de sedimento); 4 del Golfo de Tehuantepec y 9 de Guaymas, Son., (Tabla 8).

Tabla 8. Muestras elegidas para la purificación de bacterias hidrocarbonoclasticas del Golfo de México, Golfo de Tehuantepec y la Cuenca Hidrotermal de Guaymas, Son.

Región	Muestra	Estación
Golfo de México	s	26/E06
	s	30/E02
	a	31/E01
	a	32/E2*
	s	33/E03
	a	35/F04
	s	36/F05
	s	37/F06
	a	39/CH048
	a	40/F08
	a	41/CH009
	a	43/CH052
	s	44/CH087
	s	45/CH074
	a	48/G04
	s	51/H05
	s	52/CHI05
	s	55/CH098
	a	58/G09
Golfo de Tehuantepec	s	21/S
	"	33 a/S
	"	37/S
	"	40/S
Guaymas Sonora	c.e.	C2GC/L1
	"	3207/L1
	"	3208/L1
	"	3210B/L1
	"	C1GC/L2
	"	C2GC/L2
	"	3207B/L2
	"	3210B/L2
"	G.S	

a = agua

s = sedimento

c.e. = contenido estomacal

PURIFICACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

Purificación de consorcios

Como se mencionó anteriormente, sólo en las cepas elegidas para la purificación de cepas de BHDP de Guaymas Son. se presentaron consorcios difíciles de purificar por los métodos de resiembra. La Tabla 9 muestra los intervalos de tiempo a los que fueron sometidos estas muestras por el método de sonicación para obtener su purificación.

Tabla 9. Cultivos bacterianos de contenido estomacal con presencia de consorcios sometidos a diferentes intervalos de tiempo bajo la técnica de sonicación.

Muestra	Cultivo	Tiempo 1 (min.)	Pureza	Tiempo 2 (min.)	Pureza
C2GC/L1	1	5	*	10	*
	2	10	*	20	*
	3	15	-	30	-
	4	20	-	40	+
3207/L1	1	5	*	10	*
	2	10	*	20	*
	3	15	-	30	+
	4	20	-	40	+
3208/L1	1	5	*	10	*
	2	10	*	20	*
	3	15	-	30	-
	4	20	-	40	+
3210B/L1	1	5	*	10	*
	2	10	*	20	*
	3	15	-	30	+
	4	20	-	40	+
C1GC/L2	1	5	*	10	*
	2	10	*	20	*
	3	15	-	30	+
	4	20	-	40	+
C2GC/L2	1	5	*	10	*
	2	10	*	20	*
	3	15	-	30	+
	4	20	-	40	+
3207B/L2	1	5	*	10	*
	2	10	*	20	*
	3	15	-	30	-
	4	20	-	40	+
3210B/L2	1	5	*	10	*
	2	10	*	20	*
	3	15	-	30	+
	4	20	-	40	+
G.S	1	5	*	5	*
	2	10	*	10	*
	3	15	-	15	+
	4	20	-	20	+

+ puro
 - impuro
 * sin siembra para verificar su pureza

CEPAS PURAS DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS

Se obtuvieron un total de 32 cepas puras, 19 del Golfo de México, 9 de Guaymas Sonora y 4 para el Golfo de Tehuantepec, como se muestra en la Tabla 10.

De acuerdo con la tinción de Gram que se aplicó para verificar su pureza, todas resultaron ser bacilos Gram negativos y sin presencia de endospora (Figura 9).

Tabla 10. Cepas puras de bacterias hidrocarbonoclasticas provenientes de muestras de tres regiones marinas.

Región	Muestra	Cepa		
			Gram	Forma celular
Golfo de México	s	26-E06	-	bacilo
	s	30-E02	-	"
	a	31-E01	-	"
	a	32-E2*	-	"
	s	33-E03	-	"
	a	35-F04	-	"
	s	36-F05	-	"
	s	37-F06	-	"
	a	39-CH0	-	"
	a	40-F08B	-	"
	a	41-CH0	-	"
	a	43-CH0	-	"
	s	44-CH0	-	"
	s	45-CH0	-	"
	a	48-G04	-	"
	s	51-H05	-	"
	s	52-CHI	-	"
s	55-CH0	-	"	
a	58-G09	-	"	
Golfo de Tehuantepec	s	21/S-Th	-	"
	"	33 a/S-Th	-	"
	"	37/S-Th	-	"
	"	40/S-Th	-	"
Guaymas Son.	c.e.	C2GC-L1	-	"
	"	3207-L1	-	"
	"	3208-L1	-	"
	"	3210B-L1	-	"
	"	C1GC-L2p	-	"
	"	C2GC-L2	-	"
	"	3207-4"L2	-	"
	"	3210-4pL2	-	"
"	G.S.C.E.	-	"	

a = agua
s = sedimento
c.e. = contenido estomacal

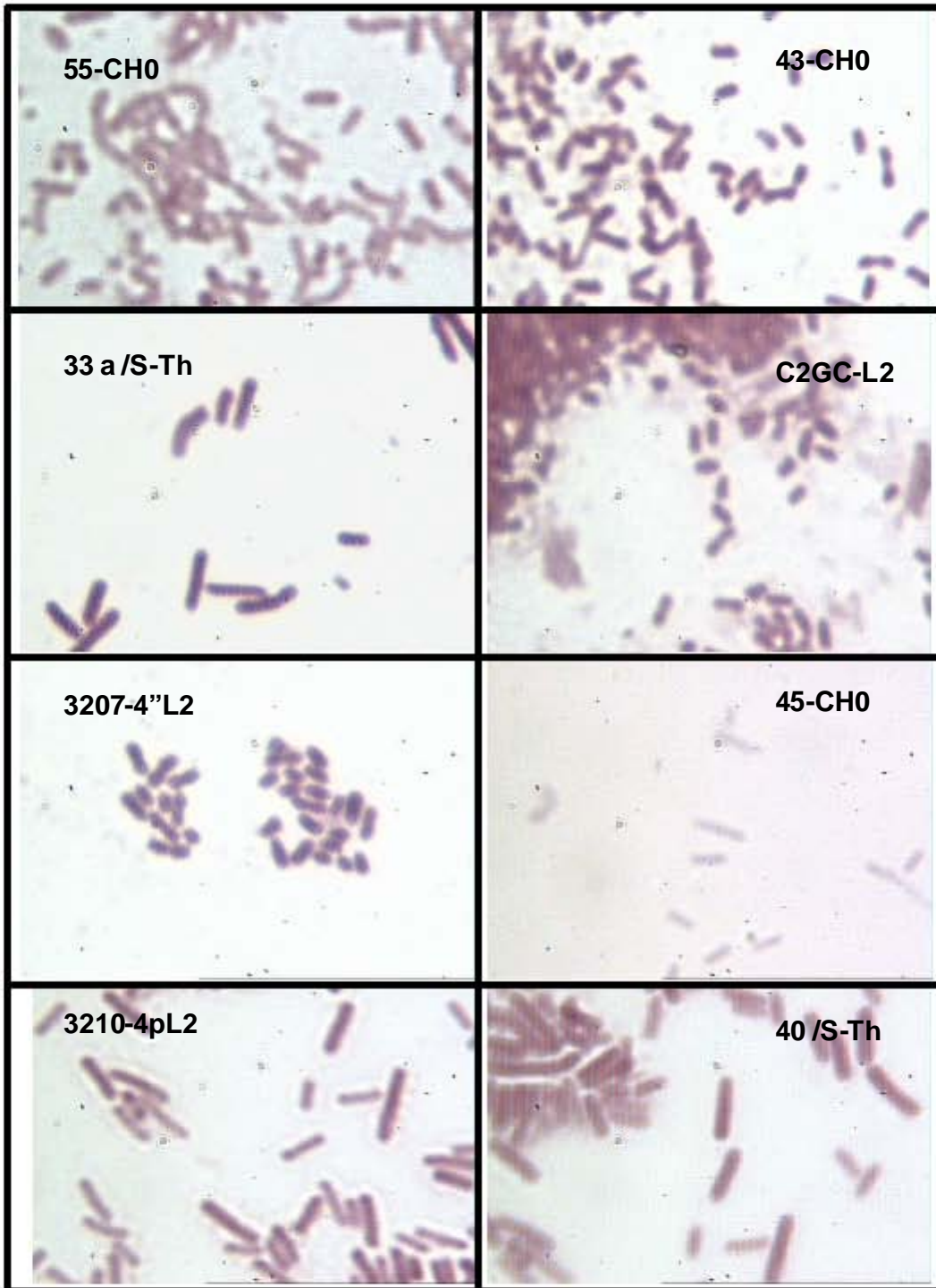


Figura 9. Tinción de Gram de bacterias degradadoras de hidrocarburos aisladas de muestras de agua y sedimentos del Golfo de México (55-CH0, 43-CH0, 45-CH0); sedimento del Golfo de Tehuantepec (33 a/S-Th, y 40 /S-Th) y contenido estomacal de crustáceos de la cuenca hidrotermal de Guaymas, Son., (C2GC-L2, 3207-4''L2 y 3210-4pL2).

7.3 PRESENCIA DE PLÁSMIDOS EN BACTERIAS HIDROCARBONOCLÁSTICAS

De las cepas puras de bacterias degradadoras de hidrocarburos obtenidas de las muestras de agua superficial, sedimento y contenido estomacal, se tomaron 12 para la extracción de plásmidos: 4 del Golfo de México, 3 del Golfo de Tehuantepec y 5 de la cuenca hidrotermal de Guaymas, Son., como se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11. Cepas puras de bacterias hidrocarbonoclasticas de las tres regiones en estudio seleccionadas para la extracción de plásmidos.

Región	Muestra	Cepa
Golfo de México	a	40-F08B
	a	43-CH0
	s	45-CH0
	s	55-CH0
Golfo de Tehuantepec	s	21/S-Th
	"	33 a/S-Th
	"	40/S-Th
Guaymas, Sonora	c.e.	C2GC-L1
	"	3208-L1
	"	C1GC-L2p
	"	3207-4"L2
	"	3210-4pL2

a = agua

s = sedimento

c.e. = contenido estomacal

ELECTROFORESIS

La electroforesis en geles de agarosa reveló la presencia de plásmidos en las cepas que se seleccionaron para cada una de las tres zonas. Se realizaron dos geles con las muestras de DNA plasmídico obtenido de cada una de las 12 cepas:

Un primer gel estuvo conformado por las muestras de sedimento 21/S-Th, 40/S-Th y 33 a/S-Th del Golfo de Tehuantepec; C2GC-L1 y 3208-L1 del contenido estomacal de crustáceos de Guaymas, Son. y 45-CH0 de sedimento del Golfo de México, corridas a partir del pozo 4 al 9 respectivamente (Figura 10).

La segunda mitad se corrió en un segundo gel; es decir, las muestras de las cepas 3207-4" L2, 3210-4pL2 de contenido estomacal de Guaymas, Son.; 55-CH0 de sedimento, 43-CH0 y 40-F08B de agua del Golfo de México y la C1GC-L2p de contenido estomacal de Guaymas, Son. y se corrieron a partir del pozo 4 al 9 respectivamente (Figura 11).

El marcador 1 kb DNA Ladder y la cepa control 60C1, utilizados como referencia, se corrieron en ambos geles, en los pozos 2 y 3 respectivamente.

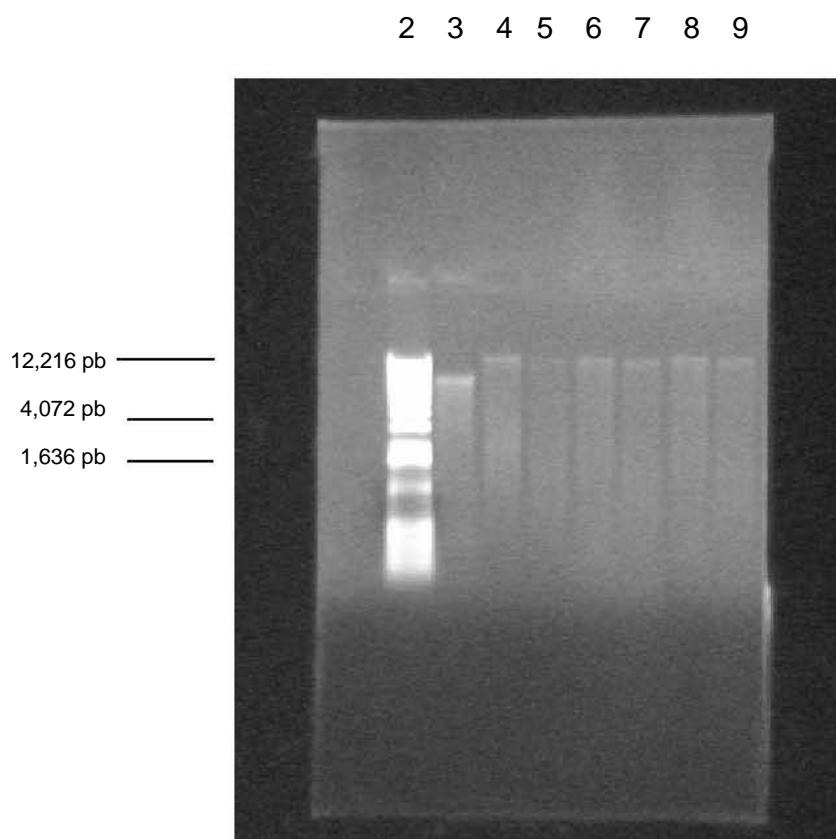


Figura 10. Fotografía del gel 1. Electroforesis en gel de agarosa al 0.5% de DNA plasmídico obtenido a partir de cepas bacterianas hidrocarbonoclasticas, junto con el marcador 1 kb DNA Ladder (pozo 2) y el control 60C1 (pozo 3), teñido con bromuro de etidio. Las preparaciones corridas en los pozos 4 al 9 corresponden a las siguientes cepas: 4) 55-CH0 y 5) 45-CH0 del Golfo De México; 6) 40/S-Th y 7) 33 a/S-Th del Golfo de Tehuantepec; 8) C2GC-L1 y 9) 3208-L1 de Guaymas; Son.

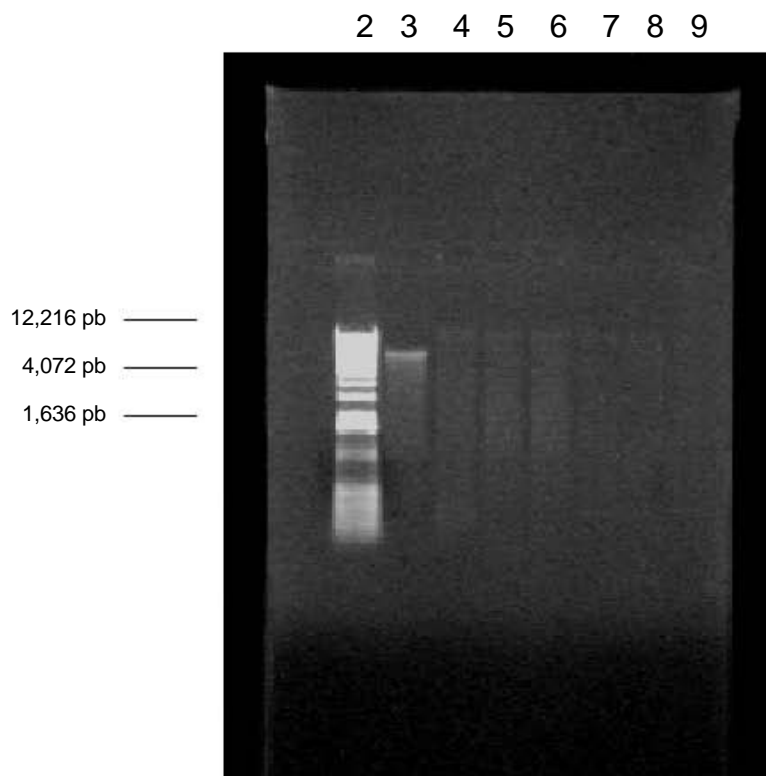


Figura 11. Fotografía del gel 2. Electroforesis en gel de agarosa al 0.5% de DNA plasmídico obtenido a partir de cepas bacterianas hidrocarbonoclasticas, junto con el marcador 1 kb DNA Ladder (pozo 2) y el control 60C1 (pozo 3), teñido con bromuro de etidio. Las preparaciones corridas en los pozos 4 al 9 corresponden a las siguientes cepas: 4), 40-F08B y 5) 43-CH0 del Golfo de México; 6) 21/S-Th del Golfo de México; 7) 3207-4" L2, 8) 3210-4pL2 y 9) CIGC-L2p de Guaymas; Son.

ESTIMACIÓN DE PESOS MOLECULARES

El peso molecular de los plásmidos desconocidos, observados en los geles, se calculó a través del antilogaritmo de “y”, donde:

$$y = a x + b$$

y:

$$x = \text{RF (movilidad relativa)}$$

La curva de calibración para cada uno de los geles se obtuvo por la regresión lineal de la movilidad relativa de los fragmentos del marcador Ready-Load™ 1 kb DNA Ladder, contra sus pesos moleculares conocidos.

De esta forma, los parámetros calculados para el Gel 1 fueron: Pendiente (a): -7.366; Ordenada al origen (b): 6.6032; Coeficiente de correlación (r): -0.9982.

Los parámetros calculados para el Gel 2 fueron: Pendiente (a): -6.1640; Ordenada al origen (b): 6.2576; Coeficiente de correlación (r): -0.998.

PESOS MOLECULARES

La Tabla 12 muestra los pesos moleculares estimados para los plásmidos obtenidos en los Geles 1 y 2 por la extrapolación de su movilidad relativa (RF) y los parámetros obtenidos en la curva de calibración de los fragmentos del marcador incluido en cada uno de los geles.

Los plásmidos obtenidos de las cepas del Golfo de México registraron pesos moleculares entre 13,521 y 16,302 pb., mientras que los obtenidos de las cepas del Golfo de Tehuantepec registraron pesos moleculares entre 13,521 y 15,650 pb. Para los obtenidos de contenido estomacal sus pesos se encontraron en un intervalo de 12,553 y 14,828 pb.

Tabla 12. Pesos moleculares estimados para cada uno de los plásmidos obtenidos de 12 cepas de bacterias hidrocarbonoclasticas silvestres corridos en 2 geles de agarosa bajo electroforesis.

Gel 1				
Pozo	Cepa	Bandas	RF	Peso molecular pb
2	marcador	4	0.4047	4,072
			0.4206	3,054
			0.452	2,036
			0.4603	1,636
3	60C1*	1	0.3650	8,080
4	55-CH0	"	0.334	13,898
5	45-CH0	„	0.327	15,650
6	40/S-Th	„	0.334	13,898
7	33 a/S-Th	„	0.327	15,650
8	C2GC-L1	„	0.340	12,553
9	3208-L1	„	0.334	13,898
Gel 2				
Pozo	Cepa	Bandas	RF	Peso molecular pb
2	marcador	4	0.4275	4,072
			0.4482	3,054
			0.4758	2,036
			0.4965	1,636
3	60C1*	1	0.3793	8,080
4	40-F08B	"	0.3450	13,521
5	43-CH0	"	0.3318	16,302
6	21/S-Th	"	0.3450	13,521
7	3207-4" L2	"	0.3385	14,828
8	3210-4pL2	"	0.3385	14,828
9	C1GC-L2p	---	---	---

* control

--- sin plásmido

La Tabla 13 resume los resultados de los plásmidos aislados de las 12 cepas de las tres regiones.

Tabla 13. Pesos moleculares estimados para los plásmidos encontrados en cepas bacterianas aisladas de tres tipos diferentes muestras provenientes de las tres regiones en estudio.

Región	Muestra	Cepa	Peso molecular pb
Golfo de México	a	40-F08B	13,521
	a	43-CH0	16,302
	s	45-CH0	15,650
	s	55-CH0	13,898
Golfo de Tehuantepec	s	21/S-Th	13,521
	s	33 a/S-Th	15,650
	s	40/S-Th	13,898
Guaymas, Son.	c.e.	C1GC-L2p	---
	c.e.	C2GC-L1	12,553
	c.e.	3207-4" L2	14,828
	c.e.	3210-4pL2	14,828,
	c.e	3208-L1	13,898

a = agua
s = sedimento
c.e. = contenido estomacal

7.5 BACTERIAS HIDROCARBONOCLÁSTICAS IDENTIFICADAS

De las 32 cepas bacterianas puras de las tres regiones se identificaron 13 especies bacterianas.

Para las muestras de agua y sedimento del Golfo de México se identificaron 9 especies: *P. aeruginosa*, *P. xantofila*, *P. multivoran*, *P. putrefaciens*, *A. salmonicida*, *A. masoucida*, *A. macrogenes*, *F. multivorum*, *F. odoratum*.

Para las muestras de sedimento del Golfo de Tehuantepec se identificaron 2 especies: *P. aeruginosa* y *Listonella damsela*.

Para las muestras de contenido estomacal de crustáceos de la cuenca hidrotermal de Guaymas Son., 2 especies: *Vibrio fluvialis* y *Listonella damsela*.

8 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo se discuten a continuación en el siguiente orden: en primer lugar se analiza la presencia de bacterias hidrocarbonoclásticas en muestras de agua, sedimento y contenido estomacal de crustáceos; así como sus concentraciones obtenidas, haciendo énfasis en que aunque este punto no constituya un objetivo del trabajo, es analizado dadas las diferencias físicas de las muestras y por las diferencias encontradas con reportes anteriores, específicamente para la región del Golfo de México.

En segundo lugar se analiza la presencia de consorcios bacterianos encontrados en las muestras de contenido estomacal. En tercer lugar se analizan los plásmidos obtenidos, así como sus pesos moleculares estimados en cada una de las cepas que fueron seleccionadas para su aislamiento. Por último, se hacen algunas observaciones en torno a las especies identificadas en cada una de las muestras tratadas.

PRESENCIA DE BACTERIAS HIDROCARBONOCLÁSTICAS:

Agua y sedimento

Las muestras de agua y sedimento provenientes del Golfo de México, demuestran por un lado la presencia de bacterias hidrocarbonoclásticas en la zona y por otro, que existe una mayor abundancia bacteriana en las muestras de sedimento que en las de agua, ya que mientras las muestras de sedimento con mayor concentración de bacterias alcanzaron valores de hasta 1.1×10^8 bacterias/ 100 ml, para las de agua estas sólo alcanzaron valores no mayores a 1.10×10^4 bacterias/100 ml (Tabla 7). Esta diferencia se puede explicar debido a que los sedimentos marinos son el receptáculo de materiales y sustancias dispersas en la columna de agua, ya que éste posee hidrocarburos de hasta 10 años de residencia (Botello *et al.*, 1996). Esto permite que las bacterias hidrocarbonoclásticas se desarrollen más ampliamente, incrementándose en un número superior en los sedimentos comparado con el que se registran en agua.

Por otro lado, los mismos datos de agua y sedimento, permiten apreciar una distribución bastante particular entre las concentraciones más bajas y las más altas a lo largo de esta área de estudio. Esto es que las estaciones con mayor concentración

de bacterias coincidieron con el área de las plataformas petroleras y sus alrededores, mientras que las estaciones con menor y nula concentración se encontraron más alejadas a esta zona (Figura 7).

De la Lanza (1991) menciona que los fenómenos meteorológicos, como las corrientes de aire superficiales y marinas, que entran al golfo por la parte del caribe, influyen en la distribución de las manchas de petróleo e hidrocarburos. Del mismo modo, Lizárraga *et al.*, (1983), apunta que los aportes de hidrocarburos ocasionados en el área por las plataformas petroleras, pueden por efecto de estas corrientes dirigirse hacia la región oeste de la Sonda de Campeche en cierta época del año (otoño-invierno).

Esto puede explicar, por un lado, la ausencia de BHDP en las estaciones ubicadas en la entrada del Golfo de México (frente a la península de Yucatán, donde las concentraciones fueron nulas) y por otro, que la mancha bacteriana detectada esté desplazada más hacia el Oeste con relación a la zona de las plataformas. El desplazamiento de la mancha bacteriana hacia el Oeste concuerda con el desplazamiento de las corrientes que se presentan en la temporada en que fue realizado el muestreo (Septiembre), y por otro con el modelo propuesto por Testa y Winegardner, (1991), el cual explica que la dispersión de un compuesto como el petróleo en un cuerpo de agua se ajusta hacia la dirección de la corriente que esté presente en el.

De acuerdo con las concentraciones de bacterias hidrocarbonoclasticas encontradas para sedimento éstas son superiores a las publicadas por Lizárraga, *et al.*, en 1983, ya que sus concentraciones son 7 veces menores a los datos obtenidos en el presente estudio. Puede señalarse que aunque no existen diferencias en cuanto a las técnicas de muestreo y conteo, si existe diferencia en el número de estaciones consideradas entre un trabajo y otro y además, el hecho de que el intervalo de tiempo entre ellos es relativamente grande (22 años).

Otra explicación a estas diferencias se puede dar en base a las constantes actividades portuarias y al establecimiento de nuevas fuentes crónicas de aporte petrolífero, así como un incremento en la explotación del recurso en la zona; ya que a partir de 1983 los niveles de hidrocarburos en sedimento, específicamente en la Sonda de Campeche han aumentado, registrándose en temporadas normales; es decir, sin alteración por parte de derrames, 139 ppm en mayo de 1985, superiores a los niveles encontrados en diciembre de 1983 y de 1978, 33 ppm y 29 ppm respectivamente (De

la Lanza, 1991). Atlas (1981), menciona que en ambientes marinos contaminados con hidrocarburos la presencia de BHDP es proporcional a las concentraciones de hidrocarburos registradas en la zona.

Por otro lado, las concentraciones de bacterias hidrocarbonoclásticas en los sedimentos del Golfo de Tehuantepec indican la presencia de este tipo de bacterias en la región, aunque con valores muy inferiores a los obtenidos en sedimentos del Golfo de México, pero mayores a los encontrados en el agua. Sin embargo, estos resultados difieren con los obtenidos por Fuentes (1994), quien no reporta presencia de estas bacterias en muestras de agua superficial de esta región, obtenidas en Julio de 1992.

La abundancia bacteriana encontrada en el sedimento del Golfo de Tehuantepec, registra valores inferiores de hasta 22 veces menos comparados con los del Golfo de México, con concentraciones no mayores a las de 4.9×10^6 bacterias/100 ml. Esto pone de manifiesto que a pesar de que el Golfo de Tehuantepec es un área con una actividad portuaria intensa y presenta aportes de hidrocarburos provenientes de la industria petrolera (Tapia, 1998) ésta no es tan grande como la que se registra en el Golfo de México, ya que de acuerdo con Botello (1996), sólo el Golfo de México representa el 75% de la industria petrolera en todo el país.

Por otro lado, es necesario recalcar que a diferencia de las muestras de agua y sedimento del Golfo de México, las del Golfo de Tehuantepec no fueron tratadas para su análisis inmediatamente después de su colecta; estas permanecieron almacenadas bajo refrigeración por trece años, hasta el presente estudio, lo que pudo ocasionar pérdidas de organismos en la población y/o una pérdida a nivel genotípico y fenotípico en las bacterias que permanecieron viables, por lo que estos resultados deben ser tratados con ciertas reservas.

Contenido estomacal

Desde el inicio de su tratamiento en los cultivos con medio mineral y petróleo, el crecimiento de las bacterias hidrocarbonoclásticas presentes en las muestras de contenido estomacal resultaron en general ser inferiores a los obtenidos en los cultivos de agua y sedimento, lo que al final pudo haberse reflejado en las concentraciones. Lo anterior se puede atribuir de entrada a que las condiciones ambientales a las que fueron sometidas estas muestras durante su análisis, fueron distintas a las que se

encuentran en su ambiente natural (presión atmosférica y temperatura principalmente), lo que pudo haber causado la pérdida de algunos organismos. Aunque algunos estudios indican que el decremento en la presión no parece ser letal para las bacterias marinas que habitan estas zonas, sí se ha reportado un crecimiento temporalmente lento al inicio de su manipulación (ZoBell, 1970; Yayanos *et al.*, 1979). Por su parte Oliver y Smith (1982) mencionan que el cambio de temperatura durante la obtención de muestras de tracto intestinal puede causar la pérdida de algunos organismos.

Por otro lado, el tipo de petróleo que se utilizó en los cultivos no fue el mismo en cuanto al tipo de hidrocarburos y cantidad de los mismos a los que están adaptados estos microorganismos; ya que los hidrocarburos constituidos entre un tipo de petróleo y otro varían significativamente con respecto a la región de donde provienen (Botello, 1996; Lizárraga, 1996). El petróleo que se encuentra en la cuenca de Guaymas es de origen biogénico y de carácter geológicamente “nuevo”, a diferencia del usado en el experimento, que es de tipo fósil, proveniente del pozo Ixtoc-I, ubicado en el Golfo de México.

Otro aspecto que es importante resaltar es que estas muestras permanecieron almacenadas por un tiempo, desde su colecta hasta este estudio (4 años), lo que también pudo influir en pérdidas a varios niveles, como ya se señaló anteriormente en el caso de las muestras del Golfo de Tehuantepec.

Seyfried y Mottl (1995) sugieren que las bacterias que habitan chimeneas hidrotermales del fondo marino han desarrollado algún tipo de estrategia, la cual optimiza su sobrevivencia y reproducción. La presencia de consorcios bacterianos en el interior de organismos bentónicos, posiblemente es una de estas estrategias fuertemente desarrolladas entre las bacterias hidrocarbonoclasticas que viven en este tipo de ambientes, debido a que todas las muestras de contenido estomacal revisadas en este trabajo mostraron la presencia de grupos bacterianos difíciles de desasociar al inicio de su purificación.

Los consorcios bacterianos en el ambiente marino son comunes y fáciles de obtener en muestras de sedimento marino, principalmente en las capas superficiales. Existen reportes de obtención de consorcios bacterianos autóctonos específicamente de bacterias hidrocarbonoclasticas encontrados en muestras de sedimento marino (Morgan y Watkinson, 1994), así como en suelos terrestres impactados por petróleo (Escalante, 2002), pero de acuerdo con la bibliografía revisada en este informe, hasta

el momento no se tienen reportes de presencia de consorcios hidrocarbonoclasticos en chimeneas hidrotermales del fondo oceánico, ya sea de vida libre o en tracto digestivo de organismos bentónicos.

Se puede sugerir que su presencia dentro de estos crustáceos responde a una asociación simbiótica; sin embargo existen muy pocos estudios al respecto y de éstos pocos, las opiniones son divergentes, debido a que en algunos se reporta que la población bacteria encontrada en algunos animales que habitan el fondo marino es similar a la de su entorno (Beeson y Jonson, 1967; Colwell, 1962; Leifson *et al.*, 1964), pero por otro lado, Colwell, 1962; Ruby y Morin, (1979), confirman la presencia de una microbiota distinta a la del exterior en el tracto digestivo de otros organismos y sugieren que si bien no puede ser una población residente si se puede tratar de una en transición.

PLÁSMIDOS ASOCIADOS A BACTERIAS HIDROCARBONOCLASTICAS

De los plásmidos obtenidos en las diferentes muestras de las tres zonas y cuyos pesos moleculares se encuentran reportados en las Tablas 12 y 13, se desprenden dos hechos que resultan de especial interés:

1) De las doce cepas elegidas para la obtención de plásmidos sólo una no presentó evidencia de ellos; la cepa C1GC-L2p de contenido estomacal. En las 11 restantes el DNA plasmídico se observó como una banda discreta en cada una de las cepas analizadas (Figuras 10 y 11); por lo que este patrón sugiere la presencia de plásmidos.

2) Los pesos moleculares estimados, de los plásmidos obtenidos en las cepas de las tres zonas y de los tres tipos de muestra, se encontraron en un rango de peso molecular entre 12,553 a 16,302 pb.

Es evidente que el número y tamaño de plásmidos obtenidos en estas cepas no fue tan diverso, aun tratándose de muestras provenientes de tres áreas diferentes, geográficamente hablando; por lo que no se estableció ninguna relación entre el tipo de muestra, el tamaño y la región a la que pertenecen. Por otro lado, estos datos son similares a los obtenidos por Jiménez (2003) y Molino (2000), quienes encuentran en

diferentes muestras de sedimento del Golfo de México un plásmido por cepa y cuyos pesos moleculares son muy similares entre ellos.

Sin embargo, en estudios realizados en otras regiones del mundo pero con el mismo tipo de bacterias se han logrado aislar múltiples plásmidos con pesos moleculares muy diversos en un número relativamente pequeño de cepas silvestres. Mohandas *et al.*, (1997) obtienen plásmidos de 7.1, 13,13.2, 26 y 80 kb en 2 cepas bacterianas (ND 22 y T 17 B) aisladas de muestras de brea. Por su parte Pleshakova *et al.* (2001) obtiene plásmidos de 8, 9 y 120 kb de *Acinetobacter calcoaceticus* aislada de una muestra de agua de una planta purificadora contaminada con desperdicios de aceite mineral. En el reporte se menciona haber usado 2 métodos más aparte del de Birnboim y Doly (1979) para aislarlos.

En las extracciones corridas en los geles (Figuras 10 y 11) se puede apreciar que existe un “barrido” a lo largo del frente seguido por las preparaciones después de la electroforesis y revelado por el bromuro de etidio. Este hecho puede explicarse debido a que las preparaciones obtenidas, a través de la metodología empleada, pueden contener pequeñas cantidades de ADN cromosomal roto, así como de RNA.

A diferencia de algunos autores que reportan un número pequeño de plásmidos recuperados en distintas cepas de muestras, tanto de agua como de sedimento (del 50% a menos) (Devereux y Sizemore, 1982), de las 12 cepas seleccionadas para aislar plásmidos, solo la cepa C1GC-L2p no presentó plásmidos. La ausencia de plásmidos en esta cepa aislada de contenido estomacal puede confirmar por un lado, que la degradación de hidrocarburos no está limitada a la acción enzimática de los plásmidos, sino que esta se realiza por diferentes vías metabólicas donde el cromosoma está involucrado. Morgan y Watkinson (1994) mencionan la existencia de bacterias, entre ellas, las del género *Pseudomonas*, capaces de degradar alcanos sin la presencia de plásmidos. Cohen y Shapiro (1992) mencionan que la capacidad degradativa en estas bacterias puede ser intrínseca, es decir, estar asociada a genes cromosómicos, por lo que los plásmidos pueden no estar presentes.

Por otro lado, su ausencia también puede responder a la pérdida de éste durante la manipulación de las cepas. Latha y Lalithakumari (2001) afirman que cuando las condiciones ambientales a las que se hace crecer y purificar las bacterias

hidrocarbonoclasticas no son las mismas a las de su hábitat de donde fueron tomadas; es decir, condiciones estresantes (crecimiento en presencia de petróleo como única fuente de carbono) la bacteria lo pierde definitivamente, desarrollándose células sin plásmidos.

BACTERIAS HIDROCARBONOCLÁSTICAS IDENTIFICADAS

El 100 % de las cepas identificadas (13) resultaron ser bacilos Gram negativos, tanto para las muestras de agua y sedimento como para las de contenido estomacal. Estos datos concuerdan con lo reportado por Lizárraga¹ *et al.*, (1986²), quien menciona que las bacterias Gram negativas tienden a ser más comunes en áreas con presencia crónica de petróleo.

De las cepas identificadas en las muestras del Golfo de México y Tehuantepec, el género *Pseudomonas* está presente en ambas regiones, seguido por *Aeromonas*. Estos resultados colocan a *Pseudomonas* como el género más representativo entre todas las especies identificadas en el Golfo de México y en las tres regiones en general. Esto concuerda con lo publicado por numerosos estudios referentes al tema, realizados en diferentes regiones y ambientes del mundo (Atlas 1995; Escalante 2002; Devereux y Sizemore 1982), y confirma que en áreas donde la contaminación por hidrocarburos es constante, se pueden aislar con cierta facilidad especies hidrocarbonoclasticas de este género, las cuales son dominantes en este tipo de poblaciones.

Específicamente para el caso del Golfo de México, Devereux y Sizemore (1982) reportaron que el género *Pseudomonas* predomina en la degradación del petróleo en especies de bacterias hidrocarbonoclasticas aisladas de muestras de agua. Del mismo modo, Molino (2000) realizando estudios similares en la Sonda de Campeche coloca a este género en la misma posición.

Por el contrario, las especies identificadas en las muestras de contenido estomacal difieren a las encontradas en agua y sedimento y ninguna especie del género *Pseudomonas* estuvo presente. En ellas *Vibrio fluvialis* es la especie sobresaliente en 3 de las 4 cepas analizadas para este tipo de muestra, la otra fue identificada como

Listonella damsela (antes *Vibrio damsela*); ambas especies catalogadas dentro de la familia Vibrionidae y reportadas como agentes oportunistas causales de infecciones en algunos peces marinos (Holt *et al.*, 1994; Negrete, 2004).

A pesar de que el género *Vibrio* no está contemplado como uno de los más frecuentes entre los que presentan bacterias degradadoras de hidrocarburos, estos resultados sitúan a *V. fluvialis* como la especie más persistente en este tipo de muestra, debido a la metodología empleada para su purificación. Grimes *et al* (1984) reporta que las especies del género *Vibrio* son las bacterias dominantes en sitios de descarga en Puerto Rico, y sugiere que el papel que este género juega en la degradación de hidrocarburos debe ser mayor que el reportado para *Pseudomonas*.

Estos datos son de especial interés, ya que sugieren por un lado, ciertas diferencias entre la flora bacteriana hidrocarbonoclastica presente en organismos que habitan estas zonas impactadas, comparadas con las de vida libre; y por otro que, de acuerdo a la bibliografía revisada en este trabajo, este es el primer reporte en el que se encuentran tales características degradativas dentro de esta especie, sugiriendo que la lista de especies bacterianas que pueden llevar a cabo el proceso biodegradativo sigue aumentando.

9 CONCLUSIONES

- En las tres regiones de estudio (Golfo de México, Golfo de Tehuantepec y la Cuenca hidrotermal de Guaymas, Son.) se determinó la presencia de bacterias hidrocarbonoclasticas, por lo que se puede concluir que se trata de zonas impactadas por hidrocarburos; principalmente en el área del Golfo de México (Sonda de Campeche), cuyas altas concentraciones de bacterias degradadoras de hidrocarburos confirman que las plataformas petroleras siguen siendo la fuente principal de hidrocarburos en la zona.
- De las cepas purificadas todas resultaron ser bacilos Gram negativos, siendo *Pseudomonas* el género de bacterias degradadoras de hidrocarburos más representativo entre los encontrados en las tres zonas y *V. fluvialis* como la especie más persistente en el contenido estomacal de crustáceos de Guaymas, Son.
- Existe evidencia de DNA plasmídico en las cepas bacterianas analizadas, por lo que este tipo de material genético asociado a estos organismos sugiere su participación en el proceso de degradación del petróleo.
- La diferencia de microbiota bacteriana, encontrada en el contenido estomacal de crustáceos y comparada con las de agua y sedimento, sugieren una posible asociación desarrollada entre estos microorganismos y los crustáceos bentónicos de donde fueron aislados.
- La presencia de consorcios bacterianos hidrocarbonoclasticos, encontrados en el contenido estomacal de crustáceos, manifiesta una posible estrategia de vida desarrollada en estas bacterias, habitantes de un ambiente que, aparte de contar con la presencia de hidrocarburos, cuenta con factores físicos extremos.

10 BIBLIOGRAFÍA:

Abed R., Safi N., Koster J., De Berr D., El- Nahhal Y., Rullcotter, J. y García- Pichel F. 2002. Microbial diversity of a heavily polluted microbial mat and its community changes following degradation of petroleum compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* pp: 1674-1683.

Al-Hadhrami M. N., Lappin- Scout H. y Fisher P. J. 1995. Bacterial survival and n-alcane degradation within Omán crude oil and a mousse. *Mar. Poll. Bull.* 30 (6). pp: 403-408.

Alexander M. 1994. *Biodegradation and biorremediation*. Academic press; New York. pp: 257-263.

Analytical Profile Index. 1999. Enterobacteriaceae and other Gram negative bacteria; 4ª Edición. BioMerioux; France.

Appelbaum P.C. y Leathers D.J. 1984. Evaluation of the rapid NFT system for identification of gram-negative, non-fermenting rods. *J. Clin. Microbiol.* 20: 730-734.

Atlas R. M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol Rev.* 45 (1). pp: 180-209.

Atlas R. M. 1995. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Mar. Poll. Bull.* 31. (4-12) pp: 178-182.

Atlas R. M. y Atlas M. C. 1991. Biodegradation of oil and bioremediation of oil spills. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2: 440-443.

Bartha R. y Atlas R.M. 1977: *The microbiology of aquatic oil spills*. Advances in Applied Microbiology. 22:225-266.

Beeson R. J. y Jonson. 1967. Natural bacterial flora of the bean clam, *Donax gouldii*. *Journal of Invertebrate Pathology.* 9. pp: 104-110.

Benson S., Oppici M., Shapiro J. y Fennewald M. 1979. Regulation of membrane peptides by *Pseudomonas* plasmid alk regulon. *J. Bacteriol.* 140. pp: 754-762.

Birnboim H. C. y Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid. Res.* 7: 1513-1523.

Botello A. V. 1981. Cuantificación de hidrocarburos fósiles y metales pesados en sedimentos y organismos marinos de la Sonda de Campeche. *Prog. Coord. Est. Escol. Sonda de Campeche*, 1er Informe final. México, D.F. 80 p.

Botello A V. 1995. Fuentes, transformación y caracterización geoquímica del petróleo en el ambiente marino. p. 211-223. In A.V. Botello, J. L. Rojas-Galaviz, j. A. Benitez. D. Zárate-Lomeli (Eds). *Golfo de México, contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias*. EPOMEX. Serie Científica 5. Universidad Autónoma de Campeche. México. 666 p.

- Botello A. V. 1996. Características, composición y propiedades físicas del petróleo, p. 203-210. *In* A.V. Botello, J. L. Rojas-Galaviz, j. A. Benitez. D. Zárata-Lomeli (Eds). *Golfo de México, contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias*. EPOMEX. Serie Científica 5. Universidad Autónoma de Campeche. México 666 p.
- Botello A. V., Ponce V. G. y Macko A. S. 1996. Niveles de concentración de hidrocarburos en el Golfo de México, p. 225-253. *In* A.V. Botello, J. L. Rojas-Galaviz, j. A. Benitez. D. Zárata-Lomeli (Eds). *Golfo de México, contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias*. Universidad Autónoma de Campeche. EPOMEX. Serie Científica 5. México. 666 p.
- Bull A. y Meadow P. 1978. *Companion to microbiology, selected topics for further study*. Longman; U.S.A. pp 90-103.
- Calvert S. E. 1966. Accumulation of diatomaceous silica in the sediments of the gulf of California. *GSA. Bull.*, 77, 569-596.
- Campbell A. C. Gieskes J.M., Lupton J.E. y Lonsdale P.F. 1988. Manganese geochemistry in the Guaymas Basin, Gulf of California. *Geochim. Cosmochim. Acta*. 52: 345-357.
- Carranza E. A., Morales E. y Rosales L. 1998. Tectónica, sedimentología y geoquímica, Cap. 1:1-12. En: M. Tapia-García (Ed.) *El Golfo de Tehuantepec: el ecosistema y sus recursos*, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa; México. 240 p.
- Cohen S. N. y Shapiro J. S. 1992. Organization and expression of genes involved in biosynthesis of antibiotic and other secondary metabolites. *Ann. Rev. Microbiol.* Vol. 82: 120-144.
- Colwell R. R. 1962. The bacterial flora of Puget Sound Fish. *J. Appl. Bacteriol.* 25. pp. 147-158.
- Dale J. 1989. *Molecular genetics of bacteria*. John Wiley and Sons; USA. pp: 1-39.
- Dawes C. J. 1986. *Botánica marina*. Limusa; México D.F. 673 p.
- De la Lanza G. 1991. *Oceanografía de mares Mexicanos*. AGT Editores, S.A.; México. pp: 31-49.
- Devereux R. y Sizemore R. 1982. Plasmid incidence in marine bacteria isolated from petroleum polluted sites on different petroleum hydrocarbons. *Mar. Poll. Bull.* 13 (6): 198-202.
- Didyk B. y Simoneit B. R. 1989. Hydrothermal oil of Guaymas Basin and implication for formation mechanisms. *Nature.*, 342. pp. 65-69.
- Dinkla I., Gabor E. y Janssen D. 2001 Effects of iron limitation on the degradation of toluene by *Pseudomonas* strains carrying the TOL (pWVO) plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (8): 3406-3412.

Érij V., Rásina M. y Rudin M. 1985. *Química y tecnología del petróleo y del gas*. Editorial Mir; Moscú. pp. 23-40.

Escalante R. M. 2002. Biodegradación de crudo de petróleo en terrarios. Tesis de Maestría. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; Perú.

Floodgate G. 1984. The fate of petroleum in marine ecosystems, *En: Atlas R. (Ed.) Petroleum microbiology*. Macmillan Publishing Co; New York. pp: 355-398.

Fuentes G. S. 1994. Caracterización de la actividad hidrocarbonoclástica por bacterias en agua del Golfo de Tehuantepec, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias; UNAM; México.

Goodfellow M. y O'Donnell G. A. 1993. *Handbook of new bacterial systematic's*. Academic Press Limited, Cambridge. pp: 121-123.

Grimes D.J., Singleton F.L. y Colwell R. R., 1984. Allogenic succession of marine bacterial communities in response to pharmaceutical waste., Citado por Lizárraga *et al* (1986) Taxonomy and distribution of hydrocarbonoclastic bacteria from the Ixtoc-I area. *Deuxième Colloque International de Bactériologie marine-Actes de Colloques*, 3, 633-638.

Gruse W. y Stevens D. 1964. *Tecnología química del petróleo*. Omega; Barcelona. pp. 28-32.

Guinea J., Sancho J. y Parés R. 1979. *Análisis microbiológico de aguas, aspectos aplicados*. Omega; España. pp: 87-93.

Guo C.L., Zhou H.W., Wong Y.S. y Tam N.F.Y. 2005. Isolation of PAH-degrading bacteria from mangrove sediments and their biodegradation potential. *Mar. Poll. Bull.* (publicación en proceso): www.elsevier.com/locate/marpolbul

Hartl D. y Jones E. 2001. *Genetics; analisis of genes and genomes*. 5a Ed. James and Bartlett; USA. pp: 858.

Holt, Krieg N., Sneath P. Stanley J. y Williams S. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9a Ed. Lippincott Williams and Wilkins; U.S.A. 787 p.

Jannasch H. W. K., Elmhjellen K., Wirsen C. O. y Farmalan A. 1971. Microbial degradation of organic matter in the deep sea. *Science*. 1971: 672-675.

Jiménez B. E. 2003. Presencia de plásmidos de bacterias degradadoras de petróleo del Golfo de México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Metropolitana; Unidad Xochimilco.

Johnson A. y Woodford N. 1998. *Molecular Bacteriology: Protocols and clinical applications*. Humana Press; USA. 682 p.

Kelley G.S. 1991. *Microbiology techniques*. Publishing Company; U.S.A. pp. 399-304.

- Latha K. y Lalithakumari D. 2001. Transfer and expression of a hydrocarbon-degrading plasmid pHCL from *Pseudomonas putida* to marine bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 523-528.
- Leifson E., Cosenza B. L., Murchelano R. y Cleverdon C. 1964. Motile marine bacteria. I. Techniques, ecology and general characteristics. *J. Bacteriol.* 87. pp. 652-666.
- Linstromber W. W. 1979. *Curso breve de química orgánica*. Reverte S. A.; España. pp. 123-127.
- Lizárraga M. 1996. Microbiología del petróleo en el sur del Golfo de México. Pp. 265-278. Zárate-Lomeli (Eds). *Golfo de México, contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias*. EPOMEX. Serie Científica 5. Universidad Autónoma de Campeche. México. 666 p.
- Lizárraga M., Muñoz J., Porras J., Izquierdo F. y Wong I. 1986⁽¹⁾. Taxonomy and distribution of hydrocarbonoclastic bacteria from the Ixtoc-I area. *Deuxième Colloque International de Bactériologie marine-Actes de Colloques.* 3, 633-638.
- Lizárraga M., Porras J. y Izquierdo F. 1983. Tasa bacteriana hidrocarbonoclasticas/heterótrofas como índice de impacto ambiental por petróleo crudo en la Sonda de Campeche. *An. Ins. cien del Mar y Limnol.* Univ. Nal. Autón. México. 10 (1): 177-186.
- Lizárraga M. Porras J., Izquierdo F. y Rosano M. 1986⁽²⁾. Bacteriología del sur del Golfo de México y área del Canal de Yucatán. *Cien. Mar.* 12 (2): 21-34.
- Lizárraga M., Rodríguez H. y Romero J. 1982. Effects of the Ixtoc I blowout on heterotrophic bacteria. *Mar. Poll. Bull.* 13. (2): 67-70.
- Lyman J. y Fleming R.H. 1940. Composition of the sea water. *J. Mar. Res.* 3:134-146.
- Marchand M., Caprais J. Corre S. Jacq E. y Hussein D. 1994. Utilisation des hydrocarbures par la microflore bacterienne du site hydrothermal du bassin de Guaymas (golfe de Californie); *Oceanologica Acta.* 17 (2): 177-189.
- Mills A. L., Breuil C. y Colwell R. R. 1978. Enumeration of petroleum-degrading marine and estuarine microorganisms by the most probable number method. *Can. J. Microbiol.* 24:552-557.
- Mohandas C., Jason J., Shanta N., Loka P.A y Chandramohan D. 1997.- Behavior of marine oil-degrading bacterial populations in a continuous culture system. *J. Mar Biotechnol.* 5:169-171.
- Molino K. 2000. Detección de plásmidos en bacterias marinas degradadoras de petróleo crudo de la zona del Ixtoc. Tesis de Licenciatura. UAM; Unidad Xochimilco.
- Monreal M. A. y Salas D. A. 1998. Dinámica y estructura termohalina, Cap. 2: 13-26. En: M. Tapia-García (Ed.) *El Golfo de Tehuantepec: el ecosistema y sus recursos*, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa; México. 240 p.
- Morgan P. y Watkinson R. 1994. Biodegradation of components of petroleum. pp: 1-31. En: Ratledge, C. (Ed.) *Biochemistry of microbial degradation*. Kluwer Academic Publishers; Netherlands. 590 p.

- Negrete M. P. 2004. Estudio de *Vibrio fluvialis* (Lee *et al.*, 1981) y *Vibrio furnici* (Diener *et al.*, 1984) como agentes causales de infecciones en el pez dorado, *Carassius auratus* (Linneaus, 1978). Tesis de Doctorado. UAM; Unidad Xochimilco.
- Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T. y Killinston R. A. 1998. *Instant notes in microbiology*. Bios Scientific Publishers; U.S.A. pp. 85-145.
- Niskin S.J. 1962. A water samples for microbiological studies. *Deep sea res Oceanogr. Abst.* 9. pp: 501-503.
- Oliver D. y Smith E. 1982. Intestinal microflora of deep-sea animals: a taxonomic study. *Deep sea Res.* 29. (6A). pp: 785-794.
- Oppenheimer C.H. y ZoBell C.E. 1952. The growth and viability of the sixty-three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. *J. Mar. Res.*, 11: 10-18.
- Parsek M., McFall S. y Chakrabarty A. 1996. Evolution of regulatory system of biodegradative pathways, p. 135-153. En: Nakazawa, T. y Furukawa, K. (Eds) *Molecular biology of Pseudomonads*. ASM Press; USA.
- Patillo M. y Nelson D. 2000. The northern Gulf of Mexico, pp. 435-456. En: Sheppard, C. (Ed.). *Seas at the millennium: an environmental evaluation*. Vol.1. Pergamon; U.S.A. pp: 435-438.
- Pereira M. G., Mudge S. y Latchford J. 2002. Consequenses of linses oil spill in salt marsh sediments. *Mar. Poll. Bull.*, 44: 520-536.
- Pleshakova E.V., Muratova A. Yu. y Turkooskaya O. V. 2001. Degradation of mineral oil with a strain of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Appl. Biochem. Microbiol.* 37 (4). pp: 342-347.
- Ramos J., Marques S. y Timmis K. 1997. Transcriptional control of the *Pseudomonas* TOL plasmid catabolic operons is achieved through an interplay of host factors and plasmid-encoded regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* 51: 341-373.
- Roos F., Enger E., Otto R. y Kormelink R. 1996. *Diversity of life*. Win. C. Brown; U.S.A. 488 p.
- Ruby E. G. y Morin J. G. 1979. Luminous enteric bacteria of marine fishes: a study of their distribution, densities, and dispersion. *Appl. Environ. Microbiol.* 38. pp. 46-48.
- Sakaguchi K. y Okanishi M. 1980. Degradative plasmids: Aspects of microbial evolution. En: *Molecular Breeding and Genetics of Applied Microorganisms*. Kodesha LTD y Academic Press Inc. pp. 47-60.
- Sambrook J. y Russell D. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*; 3a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; USA. pp: 5.4-5.17.
- Schwarz J. R., Walker J. D. y Colwell R. R. 1974. Growth of deep-sea bacteria on hydrocarbons ambient and *in situ* pressure. *Dev. Ind. Microbiol.* 15:239-249.

Seyfried W. (Jr) y Mottl M. 1995. Geologic setting and chemistry of deep-sea hydrothermal vents, p. 1-53. En: Karl D. (Ed.) *The microbiology of deep-sea hydrothermal vents*. CRC Press. U.S.A 299 p.

Shapiro J. A., Benson S. y Fennewald. 1980. Genetics of plasmid-determined hydrocarbon oxidation, pp. 1-23. En: Colin Stuttard y Kenneth R. Rozee (Eds.) *Plasmids and Transposons, Environmental effects and maintenance mechanisms*. Academic Press Inc. New York.

Smith M. R. 1994. The physiology of aromatic hydrocarbon degrading bacteria. En: Ratledge, C. (Ed.) *Biochemistry of Microbial Degradation*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp: 347-363.

Soogard P., Gahrn-Hansen B., Hui-Ping Z. y Frederiksen w. 1986. An investigation of three commercial methods for rapid identification on non-enteric Gram-negative rods. *Acta path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B* 94: 357-363.

Tapia M. 1998. Evaluación ecológica de la ictiofauna demersal. Cap. 10: 129-148. En: M. Tapia-García (Ed.) *El Golfo de Tehuantepec: el ecosistema y sus recursos*, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa; México. 240 p.

Testa S. y Winegardner D. 1991. *Restoratiom of petroleum-contaminated aquifers*. Lewis Publishers. pp. 69-72.

Turner G. M. M. 1992. Estudio oceanográfico en algunos parámetros físicos y químicos de la zona de surgencias del Golfo de Tehuantepec, en los meses de mayo y noviembre. Tesis Profesional. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza, UNAM; México.

Van J., Singh A. y Ward O. 2003. Recent advances in petroleum. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67 (4). pp. 509-549.

Vázquez F., Rangel R., Mendoza A., Fernández J., Aguayo E., Palacio A. y Sharma V. 2000. Southern Gulf of Mexico. pp: 467-482. En: Sheppard, C. (Ed.) *Seas at the millennium: an environmental evaluation*. Pergamon; U.S.A. 1. pp: 841.

Vázquez F., Salvador G., Ramírez A. Turner M., Frausto A. y Alexander H. 1998. La química del agua. Cap. 4: 35-50. En: M. Tapia-García (Ed.) *El Golfo de Tehuantepec: el ecosistema y sus recursos*, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa; México. 240 p.

Walter J. y Colwell R. 1976. Enumeration of petroleum-degrading microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 31 (2). pp: 198-207.

Wong C. y Barrera E. 1996. Implicaciones ecológicas de la concentración microbiológica en la zona costero marina, p. 369-376. In A.V. Botello, J. L. Rojas-Galaviz, j. A. Benitez. D. Zárate-Lomeli (Eds). *Golfo de México, contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias*. EPOMEX. Serie Científica 5. Universidad Autónoma de Campeche. México 666 p.

Yayanos A. Dietz S. y Van Boxtel, R. 1979. Isolation of a deep-sea barophilic bacterium and some of its growth characteristics. *Science*. 205. pp. 808-810.

ZoBell C. E. 1946. Action of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriol. Rev.* 10. pp:1-49.

ZoBell C. E. 1970. Pressure effects of morphology and life process of bacteria, citado por Oliver, D. y Smith, E. 1982. Intestinal microflora of deep-sea animals: a taxonomic study. *Deep sea Res.* 29. (6A). pp: 785-794.

APÉNDICE 1

MEDIO MINERAL CONCENTRADO (LYMAN Y FLEMING, 1940)

Concentración por 20 litros de agua destilada

Fluoruro de sodio	0.15 g
Cloruro de estroncio hexahidratado	1.2 g
Ácido bórico	1.3 g
Fosfato monobásico de potasio	4.5 g
Bromuro de potasio	4.8 g
Bicarbonato de sodio	9.6 g
Cloruro de potasio	33 g
Nitrato de amonio	36 g
Cloruro de calcio dihidratado	30 g
Cloruro de magnesio hexahidratado	248 g
Cloruro de sodio	1175 g
Sulfato de sodio anhidrico	195 g

- 1.- Disolver cada compuesto en la mínima cantidad de agua, por separado.
- 2.- Ir agregando poco a poco en orden cada reactivo al resto del agua destilada y mover para evitar que precipiten.

MEDIO MINERAL DILUIDO PARA BACTERIAS HIDROCARBONOCLÁSTICAS

Medio mineral concentrado	200 ml
Agua destilada	800 ml
Cloruro férrico al 1.2%	1 ml
Amortiguador Tris HCL 1M	10 ml
Petróleo crudo	50 µl (0.05 ml)

- 1.- Mezclar el medio mineral, el agua y el cloruro férrico, ajustar el pH a 7.5.
- 2.- Agregar el amortiguador y el petróleo.

MEDIO ZOBEL

Concentración por litro

Agua de mar añejada	750 ml
Agua destilada	250 ml
Levadura	1 g
Peptona	5 g
Agar bacteriológico	15 g
Cloruro férrico al 1.2 %	1 ml

- 1.- Se mezclan agitando uno por uno todos los componentes hasta disolver, menos el agar.
- 2.- Se ajusta el pH a 7.5
- 3.- Se agrega el agar, se calienta y agita para disolverlo.
- 4.- Esterilizar en autoclave a 115 libras o 121 °C por 15-20 minutos.

CALDO ZOBELL DIFCO-2216

MEDIO LÍQUIDO LURIA BERTANI (LB)

Triptona	10 g
NaCl	10 g
Extracto de levadura	5 g

- Esterilizar en autoclave a 115 libras o 121 °C por 15-20 minutos.

TINCIÓN DE GRAM

- 1.- Hacer una preparación tomando una asada de muestra que se coloca en una gota de agua destilada sobre un portaobjetos, procurando no concentrarla.
- 2.- Fijarla con calor.
- 3.- Teñir con Cristal Violeta por 1 minuto.
- 4.- Lavar con agua corriente.
- 5.- Poner Lugol por 1 minuto.
- 6.- Lavar con agua corriente.
- 7.- Decolorar con alcohol por 30 segundos.
- 8.- Lavar con agua corriente.
- 9.- Poner Safranina por 30 segundos.
- 10.- Lavar con agua corriente, dejar secar y observar a imersión.

Al realizar este método de tinción permite diferenciar a las bacterias Gram positivas (+) de las bacterias Gram negativas (-); las primeras se tiñen de azul por el complejo cristal violeta-yodo, mientras que las Gram (-) se decoloran con la presencia del alcohol y la safranina les confiere una coloración rosa-rojo.

APÉNDICE 2

REACTIVOS DEL KIT QIAprep Spin Miniprep 50

BUFFER P1

Concentración por 1 litro

Tris base	6.06 g
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	3.72 g
pH	8
RNasa "A"	100 mg
H ₂ O	1000 ml

BUFFER P2

Concentración por 1 litro

NaOH	8.0 g
SDS al 20%	50 ml
H ₂ O	950 ml

REACTIVOS DEL SISTEMA API 20 NE

MEDIO AUX

Sulfato amónico	2.0 gr
Agar	1.5 gr
Base mineral	82.8 mg
Aminoácidos	250.0 mg
Vitaminas y sustancias nutritivas	35.9 mg
Tampon fosfato 0.04 M pH 7.1 qsp	1000 ml
pH final 7.0-7.2	

MEDIO NaCl AL 0.85%, 2 ML

Cloruro sódico	8.5 g
Agua destilada	1000 ml

REACTIVOS DE GRIESS PARA LOS NITRITOS

NIT 1: ácido sulfanílico	0.8 g
ácido acético 5 N	100 ml
NIT 2: N-N-dimetil-1-naftilamina	0.6 g
ácido acético 5 N	100 ml

REACTIVO JAMES

Compuesto J 2183	0.5 g
HCl 1N qsp	100 ml

REACTIVO OX

Tetrametil-p-fenilendiamina	1 g
Alcohol isoamílico	100 ml