



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**AISLAMIENTO DE BACTERIAS AEROBIAS QUE
DEGRADEN COMPUESTOS FENÓLICOS Y
ORGANOCOLORADOS CON CARACTERÍSTICAS
FENOTÍPICAS.**

T E S I S.

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA CELULAR.**

P R E S E N T A

B. E. GABRIELA ZAFRA JIMÉNEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. FLORINA RAMÍREZ VIVES

MÉXICO.

SEPTIEMBRE, 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria.

El mejor camino a seguir en la vida, no es aquel que uno escoge, sino aquel que uno mismo traza.

Esta tesis quiero dedicársela a aquellas personas que durante éste gran camino

jamás han dejado de estar a mi lado,

brindándome su apoyo, su amor incondicional y su confianza.

Aquellas personas que día a día celebran mis triunfos, y en mis fracasos

me brindan el brazo más fuerte para no dejarme desfallecer

y el más amoroso para ayudarme a levantar.

Esta tesis la dedico con amor y agradecimiento a mis padres y a mis hermanos

ya que sin su amor y su constante esfuerzo

no hubiera sido posible trazar mi propio camino y tampoco

hubiese sido posible llegar a cumplir con esta meta.

También quiero dedicársela con un profundo amor

A mi hija, Alondra

Quien ha llegado a ser mi luz y mi fuerza

para seguir adelante

Agradecimientos.

Quiero expresar mi agradecimiento

A Dios, quien ha sido mi gran fortaleza en los momentos difíciles, por ser la luz y la guía en este camino, por darme sabiduría y regalarme lo mejor de mi vida... mi Alondra.

A mis padres por ser mis amigos, mis héroes, por sus consejos, por darme la confianza y creer en mí.

A mis hermanos por ser también mi soporte en los momentos de angustia, por su confianza y respaldarme en mis decisiones.

A mis amigas y amigos, Juan Carlos, Daría, Ivonne, Leonor y Toño por su amistad y consejos, por tener siempre una voz de aliento en los momentos más difíciles y por todos los buenos momentos que compartimos. A Crispin, que aunque ya no está aquí conmigo, tu amor y tus consejos permanecerán siempre conmigo.

A Sergio Esteban, por sus consejos y su apoyo, por ayudarme en la redacción de esta tesis. Gracias, por compartir todos los buenos momentos, por hacer más alegre la estancia en el TESE y por esa bella historia que nos llevó a cumplir un sueño maravilloso.

A la Doctora. Florina Ramírez Vives, mi directora de tesis, quien me ofreció todas las posibilidades para cumplir con esta meta. Doctora Flor, gracias por compartir su conocimiento y sus consejos, por su confianza y apoyo en todo momento.

Al Doctor. Oscar Monroy, por abrirme las puertas de su laboratorio de Aguas Residuales y darme la oportunidad de terminar mi tesis. Gracias por el apoyo económico que me brindó durante la conclusión de esta tesis.

A los Doctores Jesús Ramírez Santos y Octavio Loera Corral por su tiempo, su apoyo y consejos durante la realización de esta tesis.

A la Maestra en Ciencias, Carmen Fajardo por apoyarme en la parte experimental del manejo del cromatografo de gases

A todos mis compañeros de laboratorio, Julieta, Nachito, Paty, Javier, Zenia y Lorena por compartir horas de trabajo y por su apoyo incondicional.

ÍNDICE.

	Pág.
I. Índice de figuras	<i>i</i>
II. Índice de tablas	<i>ii</i>
RESUMEN	<i>iii</i>
ABSTRACT	v
Capítulo 1.	
1. Introducción	1
1.1. Procesos biológicos	5
1.2. Importancia del aislamiento y caracterización de microorganismos especializados para el desarrollo de la tecnología de tratamientos con cultivos puros	6
1.3. Justificación	8
1.4. Hipótesis	8
1.5. Objetivo general	9
1.5.1 Objetivos particulares	9
Capítulo 2.	
2. Antecedentes	
2.1. Caracterización del fenol y clorofenoles	10
2.1.1. Características físicas y químicas del fenol	11
2.1.2. Aplicaciones del fenol	11
2.1.3. Características fisicoquímicas de los clorofenoles	13
2.1.4. Aplicaciones de los clorofenoles	14
2.2. Degradación del fenol y clorofenoles	15
2.2.1. Mecanismos de degradación	16
2.3. Toxicidad del fenol y clorofenoles	20
2.3.1. Absorción y efectos de los microorganismos	21

2.3.1.1.	Efectos crónicos	22
2.3.1.2.	Toxicidad aguda	24
2.3.1.3.	Efectos de exposición de corta duración	25
2.3.1.4.	Efectos de exposición prolongada o repetida	25
2.3.2.	Límites de exposición	25
2.4.	Microorganismos degradadores de los compuestos fenólicos y organoclorados	26

Capítulo 3.

3.	Materiales y Métodos	28
3.1.	Toma de muestras	29
3.1.1.	Muestras líquidas	29
3.1.2.	Muestras de suelo	29
3.1.3.	Transporte y conservación en el laboratorio	29
3.2.	Aislamiento de las bacterias y obtención de las cepas puras	29
3.2.1.	Aislamiento de muestras líquidas	29
3.2.2.	Aislamiento de muestras sólidas	30
3.3.	Caracterización de cepas puras degradadoras de fenol	30
3.3.1.	Caracterización morfológica	30
3.3.2.	Caracterización bioquímica	31
3.3.2.1.	Ensayos bacteriológicos comunes	31
3.4.	Identificación microbiana	31
3.4.1.	Análisis del perfil de ácidos grasos	31
3.5.	Análisis de la sensibilidad microbiana	33
3.6.	Determinación de la biomasa bacteriana	34
3.6.1.	Conteo de células totales por propagación en placa	34
3.6.2.	Conteo de células viables por propagación en placa	34
3.7.	Degradación microbiana del fenol	34
3.7.1.	Método fotométrico directo	34
3.7.2.	Análisis por cromatografía de gases	35
3.8.	Degradación de compuestos organoclorados	36
3.9.	Análisis cinéticos	36

3.9.1.	Determinación de los parámetros cinéticos de crecimiento	36
3.9.2.	Determinación de los parámetros cinéticos de degradación	37
Capítulo 4.		
4.	Resultados y Discusión	38
4.1.	Aislamiento e identificación de bacterias degradadoras de fenol	36
4.2.	Caracterización fenotípica de las colonias aisladas	39
4.2.1.	Morfología y características del crecimiento bacteriano	39
4.3.	Caracterización fenotípica del género <i>Acinetobacter</i> .	44
4.3.1.	Características bioquímicas	44
4.3.2.	Análisis de la sensibilidad a antibióticos para el género <i>Acinetobacter</i>	46
4.4.	Parámetros cinéticos	50
4.5.	Crecimiento bacteriano en compuestos organoclorados	57
Capítulo 5.		
5.	Conclusión	64
Capítulo 6.		
6.	Referencias	66
Capítulo 7.		
7.	Anexos	82
A 7.1	Medios de cultivo para el aislamiento bacteriano	82
A 7.1.1	Medio Luria Bertani sólido y líquido	82
A 7.1.2.	Medio Mineral sólido y líquido	83
A 7.2	Morfología bacteriana	84
A 7.2.1	Tinción de Gram	84
A 7.3	Pruebas bioquímicas	86
A 7.3.1	Agar Hierro Kliger	86
A 7.3.2	Prueba de la enzima oxidada	86
A 7.3.3	Prueba de la enzima catalasa	86

A 7.3.4 Oxido fermentación de glucosa	87
A 7.3.5 Indol	88
A 7.3.6 Movilidad	88
A 7.5 Curvas estándares para la degradación bacteriana	90
A 7.6 Análisis completo del perfil de los ácidos grasos de las cepas aisladas en cultivos axénicos.	91

ÍNDICE DE FIGURAS.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del fenol	10
Figura 2. Estructura química de compuestos fenólicos clorados	13
Figura 3. Reacción divergente en el catabolismo de catecol por <i>Pseudomonas</i> sp.	17
Figura 4. Catabolismo del fenol (vía <i>meta</i>) por <i>Pseudomonas putida</i>	19
Figura 5. Vía para el metabolismo del 4-Clorofenol por <i>Comamonas testosteroni</i> JH5	20
Figura 6. Aislamiento bacteriano en medio Luria Bertani (LB) y en medio de sales minerales (MM)	39
Figura 7. Morfología de colonias bacterianas aisladas en medio LB y en medio MM	40
Figura 8. Microscopía óptica de la tinción de Gram de una cepa pura.	40
Figura 9. Crecimiento bacteriano de <i>A. calcoaceticus</i> y <i>A. baumannii</i> a 35°C y pH de 7 sobre medio MM conteniendo fenol como única fuente de carbono y energía	51
Figura 10 Crecimiento bacteriano de <i>A. calcoaceticus</i> y <i>A. baumannii</i> a 35°C y pH de 7 sobre medio LB conteniendo fenol como única fuente de carbono y energía	52
Figura 11. Logaritmo de la densidad óptica a 600 nm como una función del tiempo para diferentes concentraciones de fenol para <i>A. calcoaceticus</i> y <i>A. baumannii</i>	54
Figura 12. Linealización de las velocidades iniciales de las concentraciones de fenol por Lineweaver-Burk para <i>A. calcoaceticus</i> y <i>A. baumannii</i>	56
Figura 13. Crecimiento bacteriano a 35°C y pH de 7.0 sobre medios MM conteniendo 2,4,6-triclorofenol y 2,4-diclorofenol como única fuente de carbono y energía a 50 mg·L ⁻¹ para <i>A. calcoaceticus</i> y <i>A. baumannii</i>	58
Figura 14 Logaritmo de la densidad óptica a 600 nm como única función del tiempo conteniendo 50 mg·L ⁻¹ de 2,4,6-triclorofenol y 2,4-diclorofenol para ambas especies de <i>Acinetobacter</i>	59
Figura 15. Consumo de compuestos organoclorados a 35°C y pH de 7.0 conteniendo 2,4,6-triclorofenol y 2,4-diclorofenol como única fuente de carbono y energía a 50 mg·L ⁻¹ para ambas especies de <i>Acinetobacter</i>	62

ÍNDICE DE TABLAS.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales industrias contaminantes y tipo de compuestos que emiten al ambiente	2
Tabla 2. Propiedades físicas y químicas del fenol	12
Tabla 3. Propiedades físicas y químicas de los clorofenoles	14
Tabla 4a. Consorcio de microorganismos degradadores de compuestos aromáticos	26
Tabla 4b. Microorganismos puros degradadores de compuestos aromáticos	27
Tabla 5. Caracterización bacteriana por su cadena de ácidos grasos	43
Tabla 6. Caracterización del género bacteriano <i>Acinetobacter</i>	46
Tabla 7. Fenotipo de resistencia en las especies de <i>Acinetobacter</i>	47
Tabla 8. Resistencia a antibióticos en dos especies de <i>Acinetobacter</i> después de 24 horas de incubación	48
Tabla 9. Velocidades iniciales de las curvas de crecimiento de ambas especies de <i>Acinetobacter</i>	55
Tabla 10. Comparación de las constantes cinéticas entre ambas especies del género <i>Acinetobacter</i>	57
Tabla 11. Comparación de los porcentajes de degradación entre las especies de <i>Acinetobacter</i>	63
Tabla 12. Ecuación de la recta y coeficiente de determinación de las curvas estándares del fenol, 2,4-DCP y 2,4,6-TCP por cromatografía de gases.	91

RESUMEN.

Gabriela Zafra Jiménez. (2007), aislamiento de bacterias aerobias que degraden compuestos fenólicos y organoclorados con características fenotípicas.

Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.

La problemática de la contaminación en México por industrias químicas, como las industrias papeleras y la refinería del petróleo, es de gran importancia desde el punto de vista social; debido al vertido de aguas residuales con alto contenido de compuestos recalcitrantes, a los sistemas de drenaje y cuerpos de agua. Algunas de las sustancias tóxicas presentes son compuestos fenólicos y compuestos organoclorados que llegan a ríos, mares, lagos o alcantarillados. El efecto de estos compuestos en dichos sistemas biológicos depende no sólo de las características físicas y químicas de los compuestos, sino también de su naturaleza y de los factores biológicos del ambiente. La estabilidad química del anillo aromático de estos compuestos fenólicos puede variar desde horas hasta años, son compuestos aromáticos altamente persistentes, recalcitrantes y su acumulación en el ambiente se debe a la estabilidad de los mismos, por lo que presentan un potencial de alto riesgo para la productividad de los sistemas acuáticos, y muchos de ellos llegan a ser carcinogénicos.

La mineralización de estos compuestos se lleva a cabo por métodos físicos y químicos, produciendo intermediarios aún más tóxicos que el compuesto original; sin embargo, la degradación biológica conduce a una mineralización completa o parcial del compuesto a dióxido de carbono, agua y producción de biomasa.

Por lo que el objetivo del presente trabajo fue aislar y caracterizar cepas bacterianas aerobias degradadoras de fenol y clorofenoles a partir de efluentes industriales, así como la determinación de las constantes cinéticas $\mu_{m\acute{a}x}$, y K_s , para predecir el grado de biodegradación. Además de identificar la resistencia a antibióticos con el fin de poderlas utilizar para su transformación genética, construyendo cepas que bajo concentraciones altas de xenobióticos puedan asegurar una máxima degradación en sistemas de biofiltros como monocultivos y remediar ambientes contaminados con fenol y compuestos fenólicos organoclorados. Como resultado se obtuvieron tres cepas que fueron identificadas por su

composición celular de ácidos grasos, las cuales pertenecen al género *Acinetobacter*, y pertenecientes a la especie *calcoaceticus* y *baumannii*.

Las constantes cinéticas para *A. calcoaceticus* y *A. baumannii* fueron para μ_{max} de 0.221 h⁻¹ y 0.182h⁻¹ y la constante de afinidad para fenol (K_s) de 247.15 y 197.16 mg·L⁻¹, respectivamente.

La degradación del 2,4-DCP se llevó a cabo en un 74.40 % para *A. baumannii* y un 60.66 % para *A. calcoaceticus* a una concentración de 50 mg·L⁻¹. Los porcentajes de degradación para el 2,4,6-TCP fueron del 65.13 % para *A. baumannii* y del 43.68 % para *A. calcoaceticus*. A concentraciones más altas (arriba de 75 mg·L⁻¹) no se presentó crecimiento tanto en 2,4-DCP como en el 2,4,6-TCP.

El monitoreo *in vitro* de la resistencia a diversos antibióticos indicó que la cepa *A. calcoaceticus* presenta resistencia a cloranfenicol 10 µg, tetraciclina 10 y 30 µg, ácido nalidíxico 5 µg, carbenicilina 100 µg, cefalotina 30 µg, cefalotaxina 30 µg, estreptomycin 10 µg, eritromicina 6 µg, ceftriaxona 30 µg, amoxicilina 5 µg, y la cepa *A. baumannii* únicamente presentó resistencia para cloranfenicol, tetraciclina, ácido nalidíxico, carbenicilina, cefalotina, cefalotaxina, y estreptomycin a las mismas concentraciones que *A. calcoaceticus*, así como también resistencia para ampicilina 10 y 30 µg, y kanamicina 10µg.

El monitoreo *in vitro* de la resistencia a diversos antibióticos, nos permite analizar la transferencia conjugativa de plásmidos extracromosomales con información degradativa entre cepas heterólogas, para estudios futuros.

Palabras claves: Biodegradación, fenol, clorofenol, 2,4-DCP, 2,4,6-TCP, 4-CP, *Acinetobacter*.

ABSTRACT.

Gabriela Zafra Jiménez. (2010), Isolation of degrade aerobics bacteria of phenolic and chlorophenols compounds with phenotypic characteristics.

Master Thesis. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.

The problems of the contamination in Mexico, for chemicals industries as pulp and paper industries and the oil refining are an increasingly important problem that society faces. Because of the contamination started for the disposal of wastewater with high concentrations of recalcitrant compounds to the drainage and water corps by these industries. Some of these toxic substances are phenol and chlorophenols compounds that arrive to rivers, oceans, lakes and sewers. The effect this compounds in such biology systems depend not only chemicals and physicals characteristics of the compound but also the nature and the biologicals factors of the environment. The chemical stability of the compounds change since hours to years, are aromatics compounds highly persistents, recalcitrants and the accumulation in the environment itself for the stability own, as have a risk high potential for the productivity of the aquatic systems. Many aromatic compounds are toxic at very low concentrations, and many are believed to be carcinogenic.

The mineralization of these compounds to carry on by certain physical and chemical methods produces intermediates that are even more toxic than the original compounds. However, biological degradation is preferred if complete oxidation to carbon dioxide, water and cells production can be achieved.

The aim of the present study was the isolation and characterization of aerobic bacterial strains able to degrade phenols and chlorophenols, thus as, determinate the kinetics parameters as μ_{max} y K_s to describe the biodegradation rate, besides to identify the antibiotic resistance with the aim that we can be used for their genetic transformation, in this manner, to built strain that under xenobiotics high concentrations, can ensure a maximum degradation in biofilters systems as monocultures.

Three pure strains were identified by their cellular fatty acid composition. These strains belong to the genus *Acinetobacter*, two of them belong to the specie *calcoaceticus*, and other to the specie *baumannii*.

The kinetics constants for *A. calcoaceticus* and *A. baumannii* were 0.221 h^{-1} and 0.182 h^{-1} for the μ_{max} and the affinity constant for phenol (K_s) were 247.15 and $197.16\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively.

Degradation of 2,4-DCP for *A. baumannii* was 74.40 per cent and 60.66 per cent for *A. calcoaceticus* at concentration of $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. The percent of degradation of 2,4,6-TCP were 65.13 percent for *A. baumannii* and 43.68 per cent for *A. calcoaceticus*. For upper concentrations (above $75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) the growth was not shown for 2,4-DCP as 2,4,6-TCP.

Monitoring *in vitro* from antibiotic resistance, shown that *A. calcoaceticus* was resistance to choramphenicol at $10\text{ }\mu\text{g}$, tetracyclin at 10 and $30\text{ }\mu\text{g}$, nalidixic acid at $5\text{ }\mu\text{g}$, carbenicillin at $100\text{ }\mu\text{g}$, cephalotin at $30\text{ }\mu\text{g}$, cephalotaxin $30\text{ }\mu\text{g}$, streptomycin at $10\text{ }\mu\text{g}$, erythromycin at $6\text{ }\mu\text{g}$, cephtriaxone at $30\text{ }\mu\text{g}$ and amoxicillin at $5\mu\text{g}$. The strain *A. baumannii* shown resistance for choramphenicol, tetracyclin, nalidixic acid, carbenicillin, cephalotin, cephalotaxin and streptomycin at the same concentrations that *A. calcoaceticus*, thus as, resistance for ampicillin 10 y $30\text{ }\mu\text{g}$ and kanamycin at $10\text{ }\mu\text{g}$.

Monitoring *in vitro* for the resistance of different antibiotics, allows us to analyse the conjugative transfer of extra chromosomal plasmids with degradative information among heterologous strains in future studies.

Keyword: Biodegradation, phenol, chlorophenol, 2,4-DCP, 2,4,6-TCP, 4-CP, *Acinetobacter*

1 INTRODUCCIÓN.

El deterioro del ambiente causado por diferentes tipos de contaminantes es actualmente foco de atención de todo el mundo. El aumento en los volúmenes de producción y la variedad de productos intermedios y terminados, la generación de energía y las industrias de la transportación, han llevado a un incremento continuo en la contaminación de la biósfera con efluentes domésticos, industriales y de servicios. El problema creado por el acelerado incremento en la contaminación ambiental en las grandes ciudades y centros industriales, ha llevado a elevar la concentración de sustancias tóxicas a niveles impermisibles, poniendo en peligro la salud y la vida de los seres humanos y de otras especies dentro de los ecosistemas marinos (Hernández *et al.*, 2001; Torres y Calva, 2002).

La contaminación del aire y del suelo, va acompañada por la contaminación del agua con sustancias peligrosas, provenientes de las descargas de diferentes procesos industriales, de transformación química y actividades agrícolas.

Estas industrias descargan sus desechos a los sistemas acuáticos como lagos, ríos y océanos, e igualmente a los suelos y alcantarillados, afectando frecuentemente los mantos freáticos. Estas descargas pueden ser de origen accidental (derrames) o estructural (presencia permanente de fuentes contaminantes) (Colin, 1994; Torres, 1994). Estos contaminantes pueden clasificarse de acuerdo con la rama industrial en donde se producen y con base a su composición química, Tabla 1.

El efecto de toxicidad inherente en los sistemas biológicos, de los compuestos listados en la tabla 1, provoca su persistencia y acumulación, y su rango de persistencia es desde horas hasta años. Su biodisponibilidad no sólo depende de las características físicas y químicas de

los compuestos, sino también de su origen y de los factores biológicos del ambiente (Alexander, 1985; Leahy y Colwell, 1990; Atlas, 1991). Muchos de estos compuestos son de difícil degradación y presentan un potencial de alto riesgo (Nannipieri y Bollag, 1991; Häggblom y Vallo, 1995). Se ha reportado que se emiten al ambiente cerca de 40,000 toneladas anuales de solventes causando daños muy serios. También se sabe que dentro de los ambientes de trabajo en la industria de transformación química, se rebasan los límites de toxicidad permitidos, esto es, los trabajadores respiran productos tóxicos que se originan en los procesos que realizan, provocándoles desde quemaduras, irritación en tracto respiratorio, necrosis celular y pulmonar, hasta problemas neoplásicos y neurológicos graves, (Sims, 1990; NAS, 1993; Chitra *et al.*, 1995; Dipple, 1996;).

Tabla 1. Principales industrias contaminantes y el tipo de compuestos que emiten al ambiente.

Industria	Emisión Contaminante
Petrolera y Petroquímica	Petróleo crudo, aceites, naftas, aromáticos mercaptanos, bencenos, toluenos, bifenilos, <i>n</i> -octanos, <i>n</i> -decanos, fenol , sulfuro de hidrógeno, azufre y amonio
Industria del Carbón	Fenol , piridina, rasas, amoniaco, hidrocarburos.
Pulpa y Papel	Mercaptanos, sulfitos, cetonas, alcoholes, aldehídos, PCB's, fenoles , clorofenoles , lignina, ácido feulico, ácido protocatéquico, ácido benzoico, guaicol, catecol, ácido fenil propiónico.
Tintes y Pinturas	HNO ₃ , H ₂ SO ₄ , fenoles , aminas, colorantes.
Polímeros	Alcoholes, hidrocarburos, fenoles , aldehídos.
De Cloro (Desinfectantes)	Cloro, cloruros, HCl, mercurio, ácido benzoico, fenol .

(Hernández *et al.*, 2001; Kumaran y Paruchuri, 1997)

Actualmente en México y en el mundo, la contaminación de aguas de desecho de una gran variedad de procesos industriales (refinerías, industrias químicas, metalúrgicas y petroquímicas) por compuestos orgánicos es un grave problema. Por otra parte, las crecientes

demandas sobre la reutilización de aguas industriales y las nuevas reglamentaciones ecológicas, hacen necesaria la modificación de las instalaciones existentes y el desarrollo de procedimientos de manufactura y tratamientos eficientes, así como las sinergias para el reúso del agua.

Existen algunas combinaciones que permiten la utilización más racional del agua. Por ejemplo, en Rusia una fábrica de cartón utiliza los efluentes de una planta de papel, algunos expertos coinciden en que las aguas textiles pueden utilizarse hasta 15 veces modificando los sistemas tradicionales; en la industria del algodón se han utilizado con éxito efluentes municipales tratados (coagulación-floculación-sedimentación-cloración); en la industria hulera se ha combinado las aguas de procesos con las pluviales y se regeneraron por coagulación-filtración-desionización, y en la industria metalúrgica se han aplicado con buena efectividad membranas electrolíticas para el reciclado de aguas, también se tiene la certeza de que los residuos radioactivos se pueden separar del agua residual por ósmosis inversa. (Hugges y Cooper, 1996)

Una vez optimizados los procesos para el adecuado uso del agua, se tienen que generar las tecnologías para que los efluentes generados en los procesos de producción sean tratados. El primer paso para la generación de estas tecnologías es conocer los sistemas que logran este objetivo y posteriormente determinar cuál de éstos es el más eficiente.

Existe poca información sobre la mineralización de compuestos particularmente del tipo aromático (benceno, tolueno, xileno, cresoles, aminas, naftalenos, antracenos, fenoles, así como sus derivados halogenados, nitrados y sulfurados), que tienen como particularidad una elevada estabilidad y toxicidad, pero que pueden ser degradados mediante los procedimientos convencionales de tratamiento de aguas residuales (Hernández *et al.*, 2001).

Actualmente se están investigando diferentes métodos alternativos para la eliminación química de estos compuestos, algunos procesos emplean el oxígeno del aire y el oxígeno

molecular a temperaturas y presiones elevadas (250 a 350 °C y 5 a 100 atm), estos procedimientos requieren de consumos elevados de gases o energía lo cual hace poco práctica su utilización. Algunos otros emplean como oxidantes peróxidos e hidroperóxidos orgánicos bajo condiciones de operación cercanas a las atmosféricas, pero tienen la desventaja de tener un costo elevado y durante la oxidación catalítica se generan compuestos de igual o mayor toxicidad (Singlenton, 1994).

Otra alternativa es la oxidación electrocatalítica, en donde por medio de electrodos específicos se pueden generar *in situ* agentes oxidantes altamente reactivos para la degradación de los contaminantes aromáticos antes descritos; Sin embargo, el alto costo de la energía eléctrica para llevar a cabo este procedimiento a nivel industrial lo hace inviable. Por otra parte, la utilización de ozono como agente oxidante ha dado buenos resultados en el tratamiento de aguas contaminadas con compuestos orgánicos e inorgánicos, y aunque su área de aplicación es muy amplia, su uso se ha limitado debido a los altos niveles de energía y la sofisticación del equipo requerido para la obtención de ozono (Zilli *et al.*, 1993; Lin y Chuang, 1994).

El peróxido de hidrógeno ha surgido como una fuente alterna para la oxidación terciaria avanzada; este oxidante es empleado en ausencia de un catalizador para la reducción de compuestos clorados, sulfurados, aldehídos y compuestos nitrogenados; estas reacciones se efectúan de una manera rápida bajo condiciones alcalinas y a temperaturas elevadas. Para aumentar la efectividad en la degradación de otros contaminantes, es posible utilizar peróxido de hidrógeno en presencia de un activador (catalizador, luz UV y ozono) que permita la generación de radicales $\text{HO}_2^\cdot$ y $^\cdot\text{OH}$, los cuales presentan un elevado potencial de oxidación. Sin embargo éste como muchos otros tratamientos biológicos son muy complejos y caros (Autenrieth *et al.*, 1991; Jianmin *et al.*, 1993).

La mineralización biológica de compuestos clorados puede proceder por medio de una vía de deshalogenación reductiva cuyo mecanismo ocurre bajo condiciones de anaerobiosis, sin

embargo, esta deshalogenación no siempre conduce a una mineralización total de los compuestos organoclorados (Torres, 1994). También puede proceder aeróbicamente por medio de la vía de la β -cetoadipato por el desdoblamiento en el anillo en *orto* y por la vía ácido α -ceto por el desdoblamiento del anillo en *meta* (Morsen y Rehm, 1990)

El conocimiento de los mecanismos de transformación biológica de los compuestos xenobióticos dispara el desarrollo de nuevos tratamientos tecnológicos, para estos desechos industriales, especialmente tecnologías que demandan una pequeña producción de desechos adicionales. En este sentido, la aplicación de los procesos de biodegradación utilizando cultivos puros de microorganismos especialmente adaptados para metabolizar el contaminante, parece ser una buena alternativa a estos procesos convencionales (Hannaford y Kvek, 1999; González *et al.*, 2001), además de que se ha demostrado que el grado máximo de crecimiento específico ($\mu_{\max}$) en cultivos puros es mayor que en cultivos mixtos, lo que conduce a una mayor eficiencia de degradación (Monteiro *et al.*, 2000).

1.1 Procesos biológicos.

En la actualidad, existe un uso generalizado de procesos biológicos que se emplean en la ingeniería ambiental para el tratamiento de desechos industriales, tales como el tratamiento de lodos activados, composteo, biorremediación, bioacumulación, biofiltración entre otros, donde gracias a la actividad microbiana se degradan los compuestos tóxicos teniendo como resultado compuestos ecológicamente limpios, siendo estos el agua, el bióxido de carbono y la biomasa (Eckenfelder y Ford, 1970; Ramalho, 1993; Méndez *et al.*, 2004). Estos procesos biológicos se basan principalmente en los requerimientos nutricionales y energéticos del microorganismo, los factores ambientales que afectan el crecimiento, así como la relación entre el crecimiento microbiano y la utilización del sustrato (Benefield y Randall, 1987; Filiz y Gökçay, 1996).

El tratamiento de aguas residuales mediante lodos activados se desarrolló por primera vez en Inglaterra en el año 1914 y actualmente es el tratamiento más utilizado en los países desarrollados (Herbert *et al.*, 1996; Yupanqui, 2001; Méndez *et al.*, 2004). El tratamiento de lodos activados utiliza consorcios microbianos para la transformación de la materia orgánica disuelta, se realiza en reactores biológicos que pueden presentar apariencia muy diversas (principalmente, circulares y rectangulares). Para conseguir que los reactores tengan la cantidad de oxígeno requerido por los microorganismos para dichos procesos y producir la necesaria agitación, suele haber electro agitadores superficiales o inyección de aire. Este tratamiento biológico transforma la materia orgánica disuelta en sólidos sedimentables (lodos activados), bióxido de carbono y agua. Los lodos activados se retiran fácilmente del agua tratada, mediante sedimentadores.

En México, el 25 % de las plantas de tratamiento de aguas residuales son de lodos activados, el 40 % son lagunas de oxidación y el resto son diferentes tecnologías en las que se incluyen reactores anaerobios (Monroy *et al.*, 2000). Sin embargo, solo el 15.3% de las aguas residuales municipales y 27.6% de las industriales, son tratadas (CNA, 2004). Por lo que el trabajo referente a la depuración de aguas está pendiente en el país, principalmente por los problemas económicos por los que se atraviesa. No obstante, a pesar de que la infraestructura para el tratamiento de aguas residuales no se ha implementado, la investigación y desarrollo sobre el tema sigue avanzando en los centros de investigación y universidades del país.

1.2 Importancia del aislamiento y caracterización de microorganismos especializados para el desarrollo de la tecnología de tratamientos con cultivos puros.

Una vez que se optimizan los procesos de manufactura para el uso de agua, suceden dos cosas, se reduce el volumen de agua residual y se aumenta la carga orgánica en ella, así como la concentración de otros residuos. Estas condiciones nos llevan a dos cambios tecnológicos importantes: por un lado se reduce el volumen de los reactores biológicos empleados y por el otro, se exigirán a los reactores biológicos mayor eficiencia de remoción trabajando a altas

cargas orgánicas. La segunda situación es la que involucra mayor investigación, ya que se deben de optimizar las condiciones de operación para que los microorganismos involucrados en el proceso de degradación tengan mejores condiciones metabólicas. También se debe mejorar la biodisponibilidad de los contaminantes para hacer los procesos más eficientes. Una alternativa interesante es el enriquecimiento de los lodos con microorganismos especializados en la remoción de compuestos particulares, esta opción deja de ser inviable si pensamos que el tamaño del reactor tenderá a volúmenes menores de operación.

El aislamiento de cepas especializadas para la degradación de algunos compuestos xenobióticos, es un área de investigación que está teniendo auge, por ejemplo, en un estudio sobre la biodegradación de fenol en un reactor operado en lote, usando un cultivo puro de *Pseudomonas putida* DMS 548, se determinó la cinética de biodegradación, para el fenol a concentraciones de 1 a 100 mg·L⁻¹, obteniendo una $\mu_{\max} = 0.436 \text{ h}^{-1}$, una $K_s = 6.19 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ y una $K_i = 54.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (Pawloswsky y Howell, 1993; Monteiro *et al.*, 2000).

Otros estudios revelan que los hongos como *Aspergillus terreus* (Martínez *et al.*, 1992; Borja *et al.*, 1993a). y *Geotrichum candidum* (Borja *et al.*, 1995), tienen la capacidad de biodegradar los compuestos fenólicos de las aguas residuales a una concentración de 475 mg·L⁻¹, indicando que los microorganismos siguen cinéticas de crecimiento de tipo Monod. Este modelo permite la comparación entre ambos microorganismos así como también la predicción de la eliminación de fenoles en las aguas residuales, obteniéndose las constantes cinéticas de $\mu_{\max} = 0.06 \text{ h}^{-1}$ y una $K_s = 13\,525 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para *A. terreus* y una $\mu_{\max} = 0.047 \text{ h}^{-1}$, $K_s = 4558 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para *G. candidum* (García *et al.*, 1997).

Estos trabajos muestran la viabilidad del enriquecimiento de sistemas de lodos para el tratamiento de compuestos xenobióticos y la importancia de seguir en este camino para la generación de las tecnologías que se requerirán en un futuro no muy lejano.

1.3. Justificación.

Muchas de las industrias de transformación química, de refinerías de petróleo, de la manufactura de resinas, entre otras, producen altas concentraciones de fenol en sus efluentes industriales. Estas aguas residuales contienen fenol en un rango de 5 a 500 mg·L⁻¹, (Hill y Robinson, 1995; Montero *et al.*, 2000). Sin embargo, el fenol es tóxico y letal a concentraciones relativamente bajas, 5 a 25 mg·L⁻¹ para especies acuáticas como los peces, a demás de que proporciona un sabor desagradable en el agua potable a concentraciones mucho más bajas de 5 mg·L⁻¹ (Nybroe *et al.*, 1992; Richards *et al.*, 1994).

Estos efluentes industriales son tratados por medio de procesos físicos y químicos convencionales, sin embargo, estos procesos son muy complejos y caros, (González *et al.*, 2001). Actualmente se estudia la aplicación de procesos de degradación por técnicas biológicas, usando cultivos puros de microorganismos especialmente adaptados para metabolizar el compuesto contaminante, debido a que la biodegradación es un proceso más limpio. Con esta modificación a los procesos biológicos, se pretende aumentar la eficiencia de degradación en los sistemas de lodos activados o de biofiltros aerobios utilizados en el tratamiento de aguas residuales industriales que contengan compuestos xenobióticos, así la modificación consiste específicamente en la construcción de un microorganismo que sea adaptado a éste, y que pueda degradar uno o más xenobióticos, o que los degrade más eficientemente.

1.4. Hipótesis.

Pueden aislarse bacterias aerobias degradadoras de compuestos fenólicos y organoclorados en aguas residuales de industrias de transformación química, así como del suelo cercano a sus vertidos.

1.5. Objetivo General.

Aislar y caracterizar bacterias aerobias que degraden fenol y clorofenoles, a partir de suelo y efluentes industriales.

1.5.1. Objetivos Particulares.

1. Aislar cepas bacterianas aerobias que degraden fenol, 4-Clorofenol, 2,4-Diclorofenol, 2,4,6-Triclorofenol y Pentaclorofenol, a partir de muestras de suelo cercano al vertido del agua residual; así como, de la misma agua contaminada.
2. Realizar la identificación de las cepas bacterianas aisladas (cultivos axénicos).
3. Caracterizar fenotípicamente las cepas bacterianas, con base en su resistencia a antibióticos.
4. Determinar los parámetros cinéticos de los cultivos en lote de las cepas identificadas, durante la degradación de los compuestos fenólicos y organoclorados.

2. ANTECEDENTES.

2.1. Características del fenol y clorofenoles.

2.1.1. Características físicas y químicas del fenol.

Químicamente, el fenol es un hidrocarburo aromático simple, es decir, es un compuesto de fórmula general ArOH , donde AR es un fenilo, fenilo sustituido o alguno de los demás grupos arilo; los fenoles difieren de los alcoholes por tener el grupo OH directamente unido al anillo aromático (Figura 1), derivado de compuestos como el hidroperóxido de cumeno, ácido benzoico y del cloro benceno (Razo, 2003), y según la nomenclatura de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) se registra al fenol como ácido carbólico, ácido fenólico o alcohol fenílico. Sin embargo, es ampliamente conocido por sus sinónimos como hidroxibenceno, oxibenceno, bencenol, hidrato fenílico y monofenol (EPA, 2000).

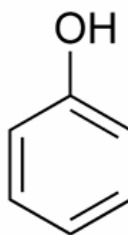


Figura 1. Estructura química del fenol

Los fenoles y muchos fenoles sustituidos incluyendo clorofenoles, nitrofenoles y cresoles han sido designados como contaminantes prioritarios (Stephen *et al.*, 1983; Nybroe *et al.*, 1992). La reactividad del fenol es atribuida a su grupo fenilo que reacciona con bases formando los fenolatos, y ligeramente con algunos ácidos (IPCS, 1994; Rodríguez y Torres, 2004), es sensible a agentes oxidantes generando productos como la hidroquinona, además de sufrir

reacciones de sustitución electrofílica como la halogenación y la sulfonación (ICPS, 1994; EPA, 2000). En el ambiente, estas propiedades hacen que el fenol reaccione con otros compuestos alterando fácilmente su estructura, convirtiéndolo en un compuesto más complejo y de difícil degradación, por lo que son altamente tóxicos para muchos microorganismos a muy bajas concentraciones, es decir de 5-25 mg·L⁻¹ e imparten un sabor característico en agua potable a concentraciones mucho más bajas (Hill y Robinson, 1995; Mulugeta *et al.*, 2000). Su presencia en medios acuosos es severamente limitada, por reglamento, la concentración máxima permitida es de 0.5 mg·L⁻¹ para agua potable y de 0.5-1.00 mg·L⁻¹ para aguas residuales industriales, de acuerdo a la legislación Española actual (BOE-14-9-90) y a la Norma Oficial Mexicana (NMX-AA-050-SCFI.2001).

Algunas de las propiedades químicas y físicas más importantes del fenol se encuentran descritas en la tabla 2 (www.fenoquímica.com.mx; www.segulab.com N° CAS 108-95-2).

2.1.2. Aplicaciones del fenol.

El fenol es la unidad estructural básica para una variedad de compuestos orgánicos sintéticos incluyendo muchos químicos para la agricultura ya que son productos de transformación química de diversos plaguicidas; es el material crudo ampliamente usado para la producción comercial de una amplia variedad de resinas poliméricas sintéticas, incluyendo resinas fenólicas como materiales de construcción para automóviles y accesorios; resinas epóxicas como adhesivos; policarbonato para contenedores de bebidas dulces y poliamida para diversas aplicaciones (Richards *et al.*, 1994; Herbert y On-Chim, 1997; Wang y Loh, 1999). También son usados para sintetizar una gran variedad de antioxidantes, herbicidas y desinfectantes generales, entre otros. La producción anual de fenol es aproximadamente 1.25 miles de millones de kilogramo (Tiedje, 2000; Herbert y Zhou, 2002).

El fenol es así un contaminante orgánico a menudo encontrado en aguas residuales de industrias de resinas, de la refinación del aceite y plantas de carbón. Además los derivados del

fenol como el fenol mismo son constituyentes comunes de efluentes acuosos de procesos, también encontrados en aguas residuales de industrias tales como químicos sintéticos, pesticidas, fabricación de pulpa y papel, entre otros. El fenol es también un biocida y desinfectante, por lo que a menudo es percibido y comprendido como un inhibidor de la actividad microbiana (Young y Rivera, 1985).

Tabla 2. Propiedades físicas y químicas del fenol

• Nombre químico	Ácido carbólico, Fenol
• Otros sinónimos	Monohidroxibenceno, Oxibenceno, Hidrato fenólico, Hidroxibenceno, Ácido fénico
• Peso molecular (g/mol).	94.11
• Fórmula molecular.	C ₆ H ₅ OH
• Familia química	Aromáticos
• Porcentaje de componentes	99.9 % fenol puro
• Temperatura de ebullición (°C).	181.8
• Temperatura de fusión (°C).	40.8
• Temperatura de inflamación.	85 (copa abierta)
• Temperatura de autoignición.	715
• Densidad relativa (agua=1@31°C) (agua=1@50°C)	1.072 (sólido) 1.049 (líquido)
• Estado sólido	Sólido a 40.8 °C o menor temperatura Líquido arriba de 40.8 °C
• Color	Incoloro por debajo de 10 UH
• Olor	Ácido, dulce, medicinal o alquitrado.
• Densidad de vapor (aire =1)	3.24
• Solubilidad en agua	Moderada, 8.4/100 g. de agua a 20 °C Moderada, 8.7/Litro a 25°C*
• *Densidad a 20°C con densidad relativa del agua a 4°C	1.0576 g/Litro
• *Coeficiente de octanol (log K _{ow})	1.46
• Datos de Reactividad: Incompatibilidad Polimerización	Aluminio y plomo No ocurre polimerización espontánea

(*Razo, 2003; Murcia 2007)

2.1.3. Características fisicoquímicas de los clorofenoles.

Los clorofenoles están situados en los sitios de los ácidos débiles, esta acidez está dada por el número y posición de los átomos de cloro relativos a los grupos hidroxilo. Las propiedades físicas están dadas en la tabla 3 (www.insht.es N° CAS 95-95-4; N° CAS 106-48-9; N° CAS 120-83-2). Son sólidos a temperatura ambiente. En los clorofenoles, el anillo aromático del fenol está sustituido con 1 a 5 átomos de cloro (Figura 2). Son intermediarios versátiles en la síntesis química debido a que, tanto en los grupos hidroxilo como el anillo aromático puede reaccionar por una sustitución tanto nucleofílica como una sustitución hidrofílica y son fácilmente oxidados (Wiley y Sons, 1993).

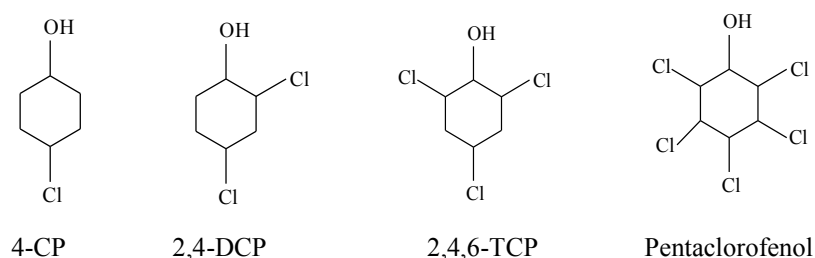


Figura 2. Estructura química de compuestos fenólicos clorados
(4-CP: 4-clorofenol; 2,4-DCP: 2,4-diclorofenol; 2,4,6-TCP: 2,4,6-triclorofenol)

Tabla 3. Propiedades físicas y químicas de los clorofenoles.

	4-Clorofenol	2,4-Diclorofenol	2,4,6-Triclorofenol
• Fórmula	C ₆ H ₄ ClOH	C ₆ H ₄ Cl ₂ O	C ₆ H ₂ Cl ₃ OH
• Peso molecular	128.56	163.01	197.46
• Punto de ebullición (°C)	220	210-211	246
• Punto de fusión (°C)	43	45.0	65-68
• Punto de congelación (°C)	43	42-43	68
• Valores de pKa	9.2	7.7	6.4
• Aspecto	Cristales incoloros	Cristales incoloros	Polvo color crema
• Olor	Característico	Característico	Característico
• Solubilidad en agua	Moderada (2.7 g/100ml a 20°C)	0.5 (g/100ml a 20°C)	Insoluble (soluble en alcohol y acetona)
• Presión de vapor	13 a 20 °C	133 a 50 °C	76.5 °C a 1mmHg
• Densidad de vapor (aire = 1)	4.44	5.6	6.8
• Densidad de vapor (agua = 1)	1.2	-	1.49
• Punto de inflamación (°C)	121	114	118

(Wiley y Sons, 1993)

2.1.4. Aplicaciones de los clorofenoles.

El 2,4-Diclorofenol (2,4-DCP) es utilizado en los procesos de manufactura del 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y del ácido 2(2,4-Diclorofenoxi) propiónico. Industrialmente el 2,4-DCP se obtiene por cloración del fenol, p-clorofenol, o-clorofenol o una mezcla de ambos. Aunque el 2,4,6-Triclorofenol (2,4,6-TCP) puede obtenerse directamente del fenol, los dos precursores reales son el 2,4-DCP y el 2,6-DCP. Sus principales aplicaciones son dentro del área agroquímica y para la preservación de maderas principalmente esta el pentaclorofenol (Bulhozer, 1995). Una de las más importantes aplicaciones del 4-Clorofenol (4-CP) está en la síntesis de derivados de quinizarina y de antraquinonas, así como también en la síntesis de un biocida como el 2-Benzil-4-Clorofenol. El 4-Clorofenol es uno de los

materiales crudos para la síntesis de dos fungicidas, el diclorofeno y el triadimefon. También está involucrado en la síntesis de una droga como el etil- α , α -dimetil-4-clorofenoxi acetato, utilizado como un agente reductor del colesterol, esta síntesis involucra reacciones con acetona y cloroformo seguidas por una esterificación del etanol. El 2,4-DCP está involucrado en la síntesis de herbicidas como el 2,4-D herbicida; que se encuentra como un herbicida post-emergente selectivo, el dicloro-metil; y como un herbicida pre-emergente, el oxiadiazón es un herbicida que se aplica antes de la germinación de las semillas. El 2,4,6-Triclorofenol ha tenido dos aplicaciones importantes: síntesis de fungicidas, y en la manufactura del cloranilo, un agente colorante (Foster y Leslie, 1990; Wiley y Sons, 1993)

2.2. Degradación del fenol y clorofenoles.

La biodegradación de los hidrocarburos es un proceso, en el cual los microorganismos tienen la capacidad de utilizar parcial o completamente estos compuestos, como fuente de carbono y energía, degradándolos hasta dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O) logrando así su completa mineralización. Este proceso se realiza por medio de enzimas y de mecanismos a nivel de membrana que permite la entrada de nutrientes y depende de varios factores como las características del contaminante, su concentración, los microorganismos presentes, así como de las condiciones geoquímicas y ambientales, entre otras (Bossert y Bartha, 1984; Alexander, 1991; EPA, 2003).

Los fenoles y clorofenoles son contaminantes persistentes de agua y suelo, son xenobióticos con pocas fuentes naturales que han sido introducidos al ambiente por medio de los procesos de manufactura o como residuales de procesos que emplean cloro o compuestos clorados. La degradación del fenol se ha comprobado en diferentes estudios. Young y Rivera, 1985 encontraron que el fenol mismo puede ser estequiométricamente convertido a metano y dióxido de carbono por lodos anaerobios de un digestor municipal.

Kobayashi *et al.*, 1989 reportan que el fenol es biodegradable bajo condiciones anaerobias, pero requieren dosis de peptona como un co-sustrato para la anaerobiosis. Por otro lado, Wang *et al.*, 1996 demostraron que el fenol puede ser eliminado en un reactor de lodo expandido, pero requiere de carbón activado, el cual sirve como adsorbente para el fenol así como también de soporte para los microorganismos anaerobios.

Existen varios mecanismos para la degradación aerobia de compuestos aromáticos, entre los que se encuentran están: el transporte en la membrana citoplásmica, hidroxilación y escisión del anillo por medio de transformaciones metabólicas (Atlas y Bartha, 2002; Madigan *et al.*, 2003; Sylvia, 2005).

Muchos compuestos aromáticos clorados son biodegradables, y sus vías de degradación han sido elucidadas en estudios utilizando cepas puras en laboratorio (Rochkind-Dubinsky *et al.*, 1987; Häggblom, 1992), los compuestos aromáticos se oxidan mediante dioxigenasas a *cis*, *cis*-dihidrodiol, que son inestables y se convierten espontáneamente en catecoles (Atlas y Bartha, 2005)

2.2.1. Mecanismos de degradación.

Se han elucidado las vías catabólicas para la degradación de numerosos compuestos aromáticos en bacterias aerobias. Estas vías proceden de catecol (Figura 3) o sustitutos de catecol (Mörsen y Rehm, 1990; Yang y Humphrey, 1995). El catecol es oxidado por dos tipos distintos de enzimas, la *orto*-oxigenasa (vía β -cetoadipato) para la formación de succinato y acetil Co-A, y la *meta*-oxigenasa (vía ácido α -ceto) para la formación de acetaldehído y piruvato.

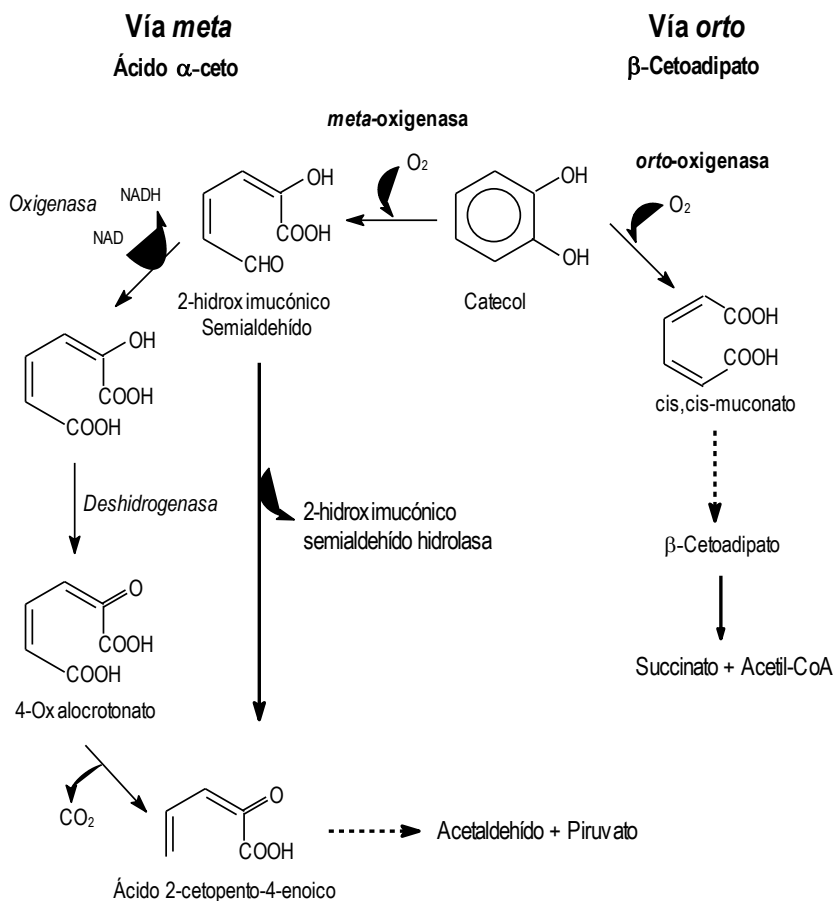


Figura 3. Reacción divergente en el catabolismo de catecol por *Pseudomonas* sp. (Zuniga et al., 1981)

El catecol puede ser metabolizado por alguna de las 3 rutas metabólicas en *Pseudomonas* sp. La primera conduce a la formación de β -cetoadipato a partir del desdoblamiento en *orto* del catecol por la *orto*-oxigenasa. Las otras dos comienzan con la fisión de catecol por la *meta*-oxigenasa. El producto 2-hidroximucónico semialdehído de la oxigenasa meta puede ser metabolizado por dos rutas: (1) la acción directa de una hidrolasa que produce ácido 2-cetopento-4-enoico y formato, y (2) por la oxidación inicial del 2-hidroximucónico semialdehído por una oxigenasa dependiente de NAD⁺ a 2-hidroxi-1,6-muconato, el cual se oxida a 4-oxalocrotonato por una deshidrogenasa y éste se descarboxila para la formación del

ácido 2-cetopento-4-enoico que finalmente se transforma hasta acetaldehído y piruvato. (Clarke y Richmond, 1998).

La vía *orto* es altamente específica tanto para la catálisis como para la inducción. El catecol debe ser convertido a muconato activando la inducción de la enzima *orto* oxigenasa. Este mecanismo parece incrementar la especificidad de inducción debido al metil derivado del catecol que no provoca la síntesis de las enzimas *orto*, así la vía *orto* es restringida a la utilización de catecol bajo circunstancias en el cual este metabolito se acumula en un grado suficiente para disparar la inducción de la 1,2-dioxigenasa. En contraste, la *meta* oxigenasa separa una variedad de alquilos derivados de catecol en adición al catecol mismo. La amplia especificidad catalítica de la *meta* oxigenasa está reflejada en la variedad de compuestos que regulan su inducción. El *o*-fenol, *m*- y *p*-cresol son potentes inductores de las enzimas de la vía *meta*, en *P. putida* cepa U (Saharsbudhe y Modi, 1987). Así, el catecol producido durante la utilización de fenol (Figura 4), es metabolizado exclusivamente por la vía *meta*, debido a que nunca se lleva a cabo la concentración endógena necesaria para disparar la inducción de enzimas especializadas de la vía *orto*, y sólo puede utilizar la vía *orto* si la enzima 1,2-oxigenasa es removida por mutaciones (Bayly y Wigmore, 1973).

Mientras que xenobióticos, tales como compuestos aromáticos (organoclorados, entre otros) son mineralizados vía el desdoblamiento en *orto* (Figura 5). La degradación de substratos cloro y metilaromáticos en mezclas es a menudo incompleta, provocando una acumulación de metabolitos finales como clorocatecoles, semialdehídos hidroximucónicos clorados (HMS's), entre otros. Recientemente se ha descrito que *Comamonas testosteroni* JH5, realiza una mineralización completa y rápida de una mezcla de 4-clorofenol (4-CP) monometilfenoles (Hollender *et al.*, 1994), y esto lo lleva a cabo por una fisión en el anillo en *meta*. Por lo cual, no hay acumulación de HSM y sí una liberación de cloro en cantidades estequiométricas. El crecimiento de *C. testosteroni* se promueve al incrementar la concentración de 4-CP hasta 1.8 mM (Hollender *et al.*, 1997).

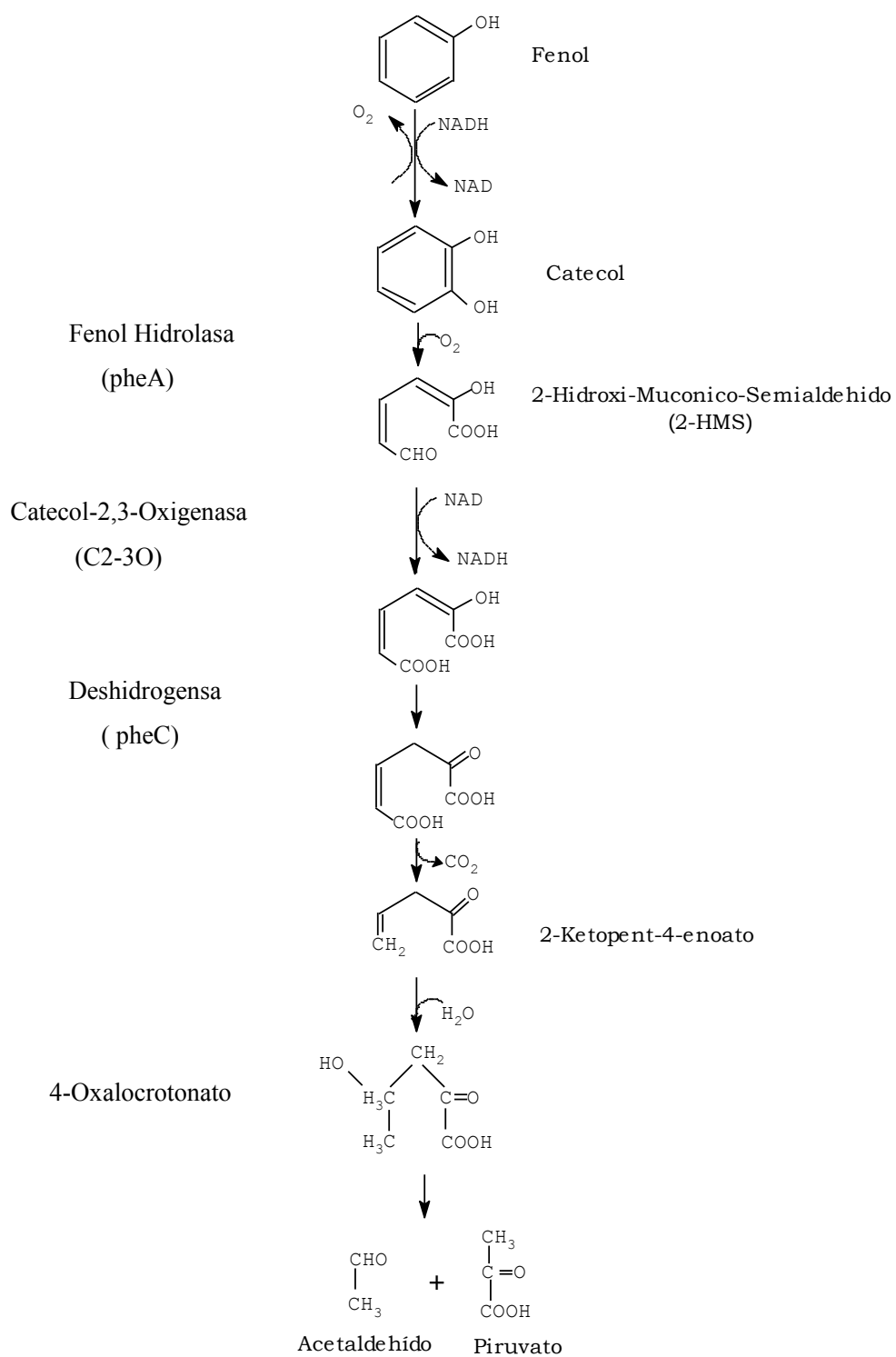


Figura 4. Catabolismo del fenol (Vía meta), por *Pseudomonas putida* (Clarke y Richmond, 1998)

Acinetobacter calcoaceticus NCIB8250 es capaz de crecer en fenol como única fuente de carbono y energía, en virtud de una fenol hidrolasa multicomponente codificada cromosómicamente (Ehrt *et al.*, 1995). Los genes respectivos están combinados en el operón *mop*, junto con el operón *catA* que codifica para la catecol 1,2-dioxigenasa, la primera enzima de la vía en rompimiento en *orto*. Similarmente la enzima fenol hidroxilasa junto con los genes que codifican para los catecoles en la vía en rompimiento en *meta* están organizados en el plásmido TOL o en el cromosoma de *Pseudomonas* spp. La expresión del operón *mop* depende del factor σ^{54} de la RNA polimerasa, la cual es inducido por fenol (Ng *et al.*, 1995; Schirmer *et al.*, 1997).

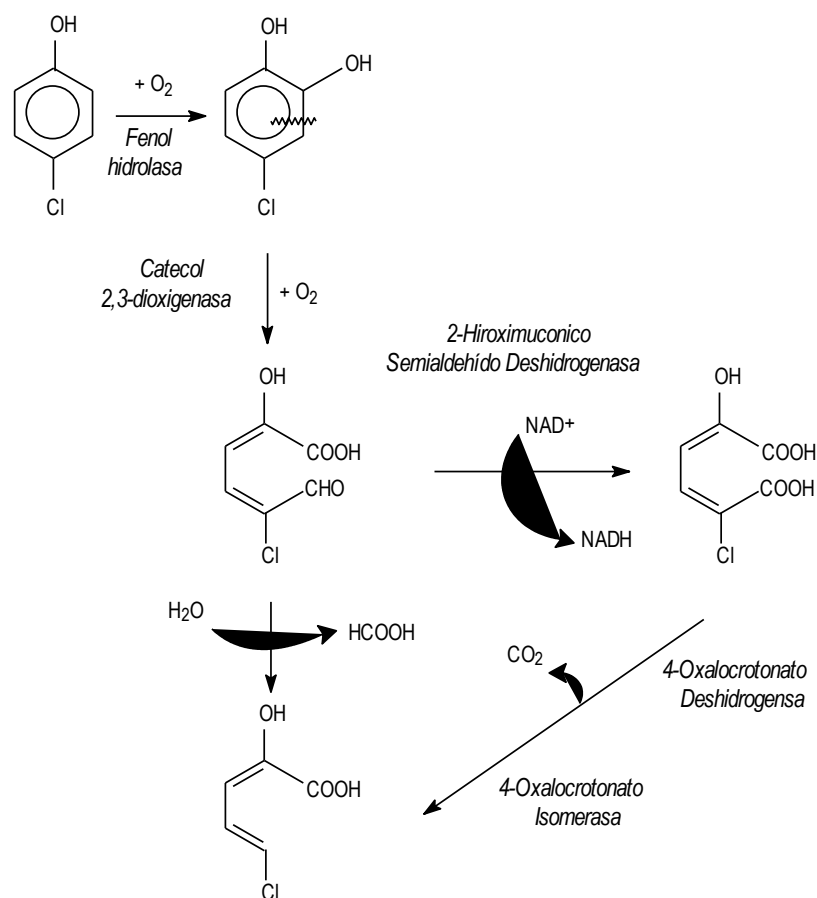


Figura 5. Vía propuesta para el metabolismo del 4-Clorofenol por *Comamonas testosteroni* JH5 (Dagley, 1978)

2.3. Toxicidad del fenol y clorofenoles

Se ha comprobado que el fenol es un compuesto tóxico para la salud humana, animales, plantas y el medio ambiente, debido a la concentración y formación de radicales libres (Roy y Popelier, 2008). Por su toxicidad y reactividad, el fenol puede afectar ecosistemas acuáticos o terrestres, debido a que es soluble en agua y pueden realizar reacciones de condensación y polimerización con un amplio número de compuestos. (Kondrateva *et al.*, 2001; Scheiner y Gurevitch, 2001).

En ambientes acuáticos, el fenol tiene efectos adversos sobre todos los niveles, en el caso de las macrófitas se genera crecimiento anormal y clorosis; mientras que para organismos superiores como los peces e invertebrados son más sensibles ya que la exposición del fenol provoca efectos letales debido a que solo pueden tolerar concentraciones hasta de $1,211 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Tisler y Koncan, 1995).

En organismos terrestres, se ha reportado un incremento en la mortalidad de algunas especies como las lombrices de tierra cuando son expuestas a concentraciones de 188 a 6,900 mg/kg (Neuhauser *et al.*, 1986; Neuhauser y Calahan, 1990). Los compuestos fenólicos y clorofenoles también pueden causar efectos mutagénicos en células de mamíferos (Tsutsui *et al.*, 1997)

2.3.1. Absorción y efectos en los organismos.

La presencia de compuestos fenólicos y clorofenoles en el agua pueden provocar un daño a las comunidades y poblaciones acuáticas, como en los anélidos, moluscos, crustáceos, equinodermos y peces; cuando éstos los absorben del medio a través de las branquias, tracto gastrointestinal o de la piel, los concentran en sus tejidos, pero también pueden ser liberados por difusión pasiva a través de las agallas o por medio de una desintoxicación al formarse glucorónidos conjugados (fenil- β -glucorónido).

Las exposiciones de los invertebrados, crustáceos y peces de agua dulce y marinos al clorofenol por arriba de 2-4 días, muestran que la toxicidad aguda se va incrementando con los niveles de cloración. Para el mono, di y triclorofenol, la DL_{50} de 2-4-días es de 0.6-10.3 $mg \cdot L^{-1}$ dependiendo de la especie. Para el pentaclorofenol la DL_{50} es de 0.03-0.6 $mg \cdot L^{-1}$, excepto para ciertos invertebrados resistentes que pueden sobrevivir a concentraciones de 5-10 $mg \cdot L^{-1}$ (Wiley y Sons, 1986).

En las plantas, los clorofenoles poseen una fitotoxicidad que se incrementa con el grado de cloración. La absorción del clorofenol por las plantas depende de la solubilidad del producto y del pH del medio ambiente.

En los microorganismos, todos los clorofenoles poseen actividades bactericidas que se incrementan con el grado de cloración alcanzando un máximo para los triclorofenoles. Sus efectos metabólicos incluyen inhibición enzimática de la fosforilación oxidativa e inhibición de la síntesis de adenosin trifosfato. Los clorofenoles son altamente tóxicos para las algas. Los triclorofenoles son al menos tres veces más tóxicos que el diclorofenol (Wiley y Sons, 1986)

En general, la concentración, estructura, pH de la sustancia y del medio, así como la velocidad de incorporación y el metabolismo de los compuestos fenólicos y clorofenoles determinan el grado en que éste afecta a los organismos, ya sea de manera crónica o por una toxicidad aguda (Torres y Calva, 2002).

a) Efectos crónicos

Los efectos crónicos se presentan a largo plazo y son producidos cuando los compuestos fenólicos permanecen en los organismos, donde actúan desacoplando la cadena de la fosforilación oxidativa, específicamente capturan los electrones del $FADH_2$ dando como resultado una menor producción de ATP, por lo tanto, los organismos experimentan una pérdida de energía que trastorna todas sus funciones. Existen diferentes factores, tanto

ambientales como biológicos, que pueden aumentar o disminuir el efecto crónico de los compuestos fenólicos sobre los organismos (Bohloul *et al.*, 1977; Joseph y Joseph, 1999).

1. Entre los factores ambientales destacan (Flerov, 1973):

- a) La fotólisis, que aumenta o disminuye los efectos de los compuestos fenólicos en función del tipo de los productos finales formados.
- b) Sinergismo, donde la toxicidad de los fenoles en ocasiones no sólo se debe en sí al compuesto puro, sino a su asociación con otros compuestos u otros contaminantes que existen en el ambiente.
- c) pH, la toxicidad puede variar dependiendo de las condiciones de acidez o alcalinidad existentes en el medio, generalmente la toxicidad de los compuestos fenólicos aumenta con pH ácidos.
- d) Temperatura, al aumentar la temperatura es mayor la sensibilidad de los organismos acuáticos hacia los compuestos fenólicos debido a que se incrementa su metabolismo.
- e) Concentración de oxígeno disuelto, al disminuir la concentración de oxígeno en el agua, los organismos aumentan su respiración y con ellos son más sensibles a los compuestos fenólicos debido a que los absorben más rápido.

2.- Entre los factores biológicos se encuentran (Buikema *et al.*, 1979):

- a) Degradación microbiana, la descomposición por parte de los microorganismos disminuye la toxicidad de muchos compuestos fenólicos.
- b) Edad y talla de los organismos, en general los organismos pequeños son más sensibles que los organismos grandes.
- c) Estacionalidad, en organismos acuáticos por ejemplo, en el verano la actividad metabólica es superior debido al aumento de la temperatura, por lo que son más sensibles que en el invierno.
- d) Madurez sexual, se ha observado que los organismos sexualmente maduros son menos tolerantes a los compuestos fenólicos que los organismos juveniles.

b) Toxicidad aguda

El efecto de los compuestos fenólicos se presenta en periodos cortos de tiempo y se caracterizan porque se produce una intoxicación que produce la muerte de los organismos.

La toxicidad dependerá de las propiedades estructurales y químicas de los compuestos fenólicos, así como de la sensibilidad de los organismos sobre los que actúan. En lo que se refiere a la naturaleza química de los compuestos fenólicos, su toxicidad está en función del tipo de compuesto, así como de la posición y número de sustituciones químicas presentes en la molécula, por ejemplo, la toxicidad del fenol aumenta si hay substituciones por hidrógeno, yodo y bromo, determinándose incluso que el yodofenol y el bromofenol son más dañinos para los peces que el clorofenol, también se ha observado que la posición *orto*, tiene efectos menores porque el hidrógeno en dicha posición es altamente volátil y soluble, haciendo que su efecto se atenúe; por el contrario la posición *meta* o *para* son las más tóxicas, como es el caso del mononitrofenol (Kopperman *et al.*, 1974).

En organismos acuáticos como los peces, la toxicidad se desarrolla en cuatro fases: una pronunciada actividad motora, pérdida del equilibrio, convulsiones, pérdida de la actividad motora y por último la muerte. Cuando el fenol es absorbido, hay un incremento del mucus de las células secretoras de la piel en los organismos porque se ha desarrollado un tejido necrótico; posteriormente los vasos sanguíneos se llenan de sangre y se presentan eritrocitos extravasculares, las branquias se inflaman y experimentan hemorragias. Hay infiltración de suero y sangre coagulada en las meninges del cerebro, así como una hiperanemia en el cerebelo y médula oblonga, lo que ocasiona la tumefacción del cerebro (Schultz y Dumont, 1978; Bucher y Hofer, 1993).

c) Efectos de exposición de corta duración.

El vapor de los compuestos fenólicos es corrosivo para los ojos, la piel y el tracto respiratorio, en seres humanos. La inhalación del vapor de la sustancia puede originar edema pulmonar. El fenol causa efectos en el sistema nervioso central, el corazón y el riñón, dando lugar a convulsiones, alteraciones cardíacas, fallo respiratorio, colapso y coma. La exposición puede causar la muerte y los efectos pueden aparecer de forma no inmediata (www.segulab.com, Wiley y Sons, 1993).

d) Efectos de exposición prolongada o repetida.

La exposición constante al fenol o a los clorofenoles representa un peligro para la salud ya que ambos compuestos son absorbidos fácilmente por el cuerpo afectando a órganos como el hígado, pulmones, riñones y a la mucosa gastrointestinal, provocando diversas patologías entre las que se encuentran: la acidosis metabólica, anorexia, hiperventilación, insuficiencia renal aguda, afecciones al sistema nervioso central, cáncer, coma y la muerte (Wiley y Sons, 1993; Rodríguez y Torres, 2001). El contacto prolongado o repetido con la piel puede producir dermatitis (www.segulab.com).

2.3.2. Límites de exposición.

El fenol se puede absorber rápidamente por inhalación del vapor, a través de la piel y por ingestión, la evaporación del fenol a 20 °C, pueden llevarse a una concentración nociva en el aire, lo que se considera como un riesgo de inhalación (www.segulab.com). En el caso de los clorofenoles, no puede indicarse la velocidad a la que se alcanza una concentración nociva en el aire por evaporación a 20 °C (www.segulab.com). Los límites de exposición para el TLV así como para el TWA son 5 ppm y 19 mg/m³ en piel respectivamente (ACGIH 1993-1994), y en el caso de MAK es de 5 ppm; y de 19 mg/m³ en piel. En el caso de los clorofenoles estos límites no se han establecido aún (www.segulab.com N° CAS 108-95-2).

2.4. Microorganismos degradadores de los compuestos fenólicos y organoclorados.

Existe una gran variedad de microorganismos que han sido aislados y caracterizados, a partir de efluentes de transformación química e industriales, los cuales poseen la capacidad para degradar sustancias aromáticas tales como el fenol, catecol, y compuestos clorados a bajas concentraciones. Entre los microorganismos degradadores de fenol se incluyen a *Pseudomonas putida* (Hill y Robinson, 1995; Monteiro *et al.*, 2000; Gonzales *et al.*, 2001); *Pseudomonas* spp. (Bayly y Wigmore, 1973); *Alcaligenes* sp. (Hughes y Bayly, 1983); *Streptomyces setonii* (Antai y Crawford, 1983); *Bacillus stearothermophilus* (Gurujeyalakshumi y Oriel 1989); *Rhodopseudomonas palustres* (Rahalkar *et al.*, 1993); *Candida tropicales* (Neujahr y Gaal, 1999); *Trichosporon cutaneu* (Godjevargova *et al.*, 1998); *Aspergillus terreus* y *Geotrichum candidum* (García *et al.*, 1997) y *Rhodococcus chlorophenolicus* (Apalahati y Salkinoja, 1987), *Ochromonas danica* (Kirk y Ronald, 1996). En la tabla 4a, se muestran algunos otros microorganismos degradadores de compuestos aromáticos como consorcios y en la tabla 4b se muestran microorganismos puros degradadores de compuestos aromáticos.

Tabla 4a. Consorcio de microorganismos degradadores de compuestos aromáticos

Microorganismo	Sustrato	Sistema y Modo de Operación	Referencia
<i>Pseudomona putida</i> P8 y <i>Cryptococcus elinovii</i> H1	Fenol	Air-lift lote y continuo	Zache y Rehm, 1989
		Columna empacada continua	Mörsen y Rehm, 1990
		Reactor Loop	Mörsen y Rehm, 1987
<i>Candida</i> sp y <i>Pseudomona</i> sp.		Reactor Loop	Enrhard y Rehm, 1985
<i>Escherichia coli</i> KR <i>Pseudomona putida</i> P8 <i>Staphylococcus aureus</i> 257		Matraz agitado	Keweloh <i>et al.</i> , 1989

Tabla 4b. Microorganismos puros degradadores de compuestos aromáticos

Microorganismo	Sustrato	Sistema y Modo de Operación	Referencia
<i>Methanosarcina barkeri</i> DSM800	o-Fenil-Fenol	Quimiostato	Sembiring y Winter. 1989
<i>Alcaligenes</i> sp. A7-2	4-Clorofenol	Columna empacada lote semicontinuo y continuo	Balfanz y Rehm, 1991
		Columna empacada continuo	Werstmeier y Rehm, 1987
		Columna de vidrio semicontinuo y continuo	Werstmeier y Rehm, 1985
<i>Pseudomona putida</i>		Reactor en lote	Saez y Rittmann, 1991
<i>Pseudomona putida</i> pp64		Reactor agitado semicontinuo	Saez, 1992
<i>Comamonas testoteroni</i>		Cultivo en Batch	Hollender <i>et al.</i> , 1997
<i>Pseudomona</i> sp. B13(DSM624)		Quimiostato	Schmidt, 1987
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (BMK-F-1767)	Pentaclorofenol	Matraz	Lin y Hickey., 1990
<i>Pseudomona putida</i> P8	Fenol	Lecho fluidizado continuo	Bettmann y Rehm, 1985
<i>Fusarium flocciterum</i>		Reactor mezcla continuo	Anselmo y Novais, 1992
<i>Pseudomona putida</i> pp64		Reactor agitado semicontinuo	Saez, 1992
<i>Methanospirillum hungatei</i>		Matraz agitado	Knoll y Winter, 1989
<i>Fusarium flocciferum</i>		Matraz agitado	Anselmo <i>et al.</i> , 1989
<i>Pseudomona</i> sp. B13(DSM624)		Quimiostato	Schmidt, 1987
<i>Acinetobacter</i> sp. Cepa W-17		Células inmovilizadas	Desouky <i>et al.</i> , 2003
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Clorofenoles	Cultivo en Batch	Falck <i>et al.</i> , 1997
<i>Acinetobacter</i> sp.		Cultivo en Batch	Hao <i>et al.</i> , 2002
		Cultivo en Batch	Kim y Hao, 1999
<i>Pseudomonas</i> sp. RA2	3,4-Diclorofenol, 2,3,5,6-Tetraclorofenol y Pentaclorofenol	Matraz agitado	Ibarra y Rodríguez, 1993

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

En este capítulo se describen los materiales y se detallan las técnicas utilizadas durante la realización del trabajo experimental de la tesis. Incluyendo desde el aislamiento de las cepas a partir de muestras tomadas de diversas industrias papeleas y de transformación química hasta la identificación de las mismas, así como de su caracterización. Se hace énfasis en el grado de degradación de los compuestos tóxicos.

Se realizaron también algunas técnicas bioquímicas comunes, pruebas de la catalasa y oxidasa entre otras, tinción de Gram y se evaluaron algunos parámetros como el crecimiento en función de la temperatura y degradación bacteriana.

Parte de la caracterización fenotípica de las cepas aisladas se llevó a cabo por medio de un antibiograma con el fin de obtener un parámetro de identificación de las bacterias aisladas y poder llevar a cabo estudios futuros de conjugación bacteriana entre cepas heterólogas en un sistema cerrado e incrementar así el grado de degradación hasta CO₂, H₂O y producción de biomasa.

La caracterización se realizó tomando como base los estudios realizados por (Olsson-Liljequist *et al.*, 1997), después de su identificación por su composición de ácidos grasos celulares.

3.1. Toma de muestras.

3.1.1. Muestras líquidas.

Se colectaron muestras de efluentes de cuatro industrias ubicadas en Toluca, estado de México “Química de México, Reichhold”; “Silanece, S.A.”; “Resinas Mega Aditivos” y “Productos Jeto, S.A. de C.V.” Estas muestras fueron colectadas de la toma de alcantarillado del parque industrial en el punto de descarga, y se tomaron con un dispositivo, el cual consistió de un frasco estéril conectado a una cuerda que acciona una compuerta al llegar a la profundidad deseada, esto es, el límite fijado a la cuerda. Se acciona la compuerta y el agua contaminada entra al frasco.

3.1.2. Muestras de suelo.

Se eligió la parte adyacente a la industria, esto es, junto a la salida de los vertidos. La muestra se tomó con una espátula estéril y se vertió a un frasco estéril.

3.1.3. Transporte y conservación en el laboratorio.

Las muestras se transportaron a temperaturas entre 4 y 6 °C. En estas condiciones, el análisis bacteriológico se inició en un tiempo de 8 horas máximo después de colectadas las muestras (Colin, 1994).

3.2. Aislamiento de las bacterias y obtención de cepas puras.

3.2.1. Aislamiento de muestras líquidas.

Una vez colectada la muestra, se tomó una alícuota de 1 mL y se pasó por un sistema de filtración sobre membranas de nitrocelulosa. Se colocó el filtro en un medio nutritivo sólido “Luria Bertani” (LB) (Anexo A 7.1.1) y se incubó a una temperatura de 35 °C (Baumann, 1998). La biomasa obtenida en el filtro fue lavada con una solución de suero fisiológico

(cloruro de sodio 0.9%) y se sembró en un medio mineral sólido (Anexo A 7.1.2) conteniendo fenol como única fuente de carbono y energía, incubando a 35 °C hasta la aparición de colonias.

Para el aislamiento se utilizó una técnica de replicación en serie, utilizando placas de metal con 120 pozos. Estas placas fueron previamente esterilizadas y llenadas con agua destilada estéril. Se tomó con una aguja de metal estéril una colonia y se colocó en cada pozo (realizando el procedimiento para cada colonia diferente), posteriormente se introdujo un replicador de metal a la placa y, cuidadosamente se colocó en las cajas con medio mineral (MM) conteniendo fenol a una concentración de $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ como fuente de carbono y energía, así como en cajas conteniendo medio LB, en paralelo.

Las colonias resultantes en el medio MM sólido, se resembraron por estría en un medio LB sólido y posteriormente se diferenciaron por morfología. Cada colonia resultante se inoculó en medios de sales minerales con fenol como fuente de carbono y fuente de energía, así como también en medios LB con el fin de eliminar bacterias contaminantes, repitiendo el ciclo hasta la obtención de cepas puras.

3.2.2. Aislamiento de muestras sólidas.

Se tomó aproximadamente 1g de muestra con una espátula estéril y se resuspendió en 3 mL de agua destilada estéril, para resuspender las bacterias existentes en la muestra. Posteriormente se procedió a realizar los ciclos anteriormente descritos.

3.3. Caracterización de cepas puras degradadoras de fenol.

3.3.1. Caracterización morfológica.

Las cepas puras fueron inoculadas en medios LB sólidos estériles a 35°C. La incubación se llevó a cabo durante 24 horas, tiempo en el cual se realizaron frotis bacterianos tomando una

asada de una colonia bacteriana, se disolvió en una gota de agua estéril cuidando de que la muestra no quedara muy densa y se fijó con calor. Se realizó la tinción de Gram (Bryan *et al.*, 1986) (Anexo A 7.2.1) para cada cepa aislada, y posteriormente la identificación morfológica de las cepas a través de un microscopio óptico Olympus modelo BH-2, con contraste de fases con un objetivo de x100.

3.3.2. Caracterización bioquímica.

3.3.2.1. Ensayos bacteriológicos comunes.

Se llevaron a cabo una serie de pruebas bacteriológicas (Mc Fadin, 1993) para la caracterización de las cepas puras degradadoras de fenol. Primero las bacterias resultantes se sembraron en un medio de Agar Hierro Kligler, a partir de este medio se tomaron muestras para la aplicación de las siguientes pruebas bioquímicas (Anexo A 7.3). Pruebas de catalasa y oxidasa, óxido fermentación de glucosa, indol, incubaciones a dos temperaturas y pruebas de movilidad. Así como también, la capacidad del microorganismo para utilizar diferentes fuentes de carbono y energía fue probada en medios de sales minerales líquidos (Anexo A 7.4). Los resultados fueron comprobados con el manual Bergey's (Holt *et al.*, 1994)

3.4. Identificación microbiana.

3.4.1. Análisis del perfil de ácidos grasos.

La composición de ácidos grasos fue analizada por Microbial ID, Inc, (Newark, Del.). Se obtuvieron 10 cepas puras, de las cuales se eligieron 3 cepas basándose en sus diferencias coloniales en los medios MM y LB, las cepas aisladas fueron cultivadas y saponificadas para la liberación de los ácidos grasos de los lípidos, los lípidos fueron metilados y extraídos. Los ácidos grasos de 9 a 20 carbonos de longitud fueron analizados por cromatografía de gases. El procesamiento de las muestras incluyó los siguientes pasos (Sasser, 1990).

Saponificación: 1.0 mL de un agente de saponificación (mezcla de 45 g de hidróxido de sodio, 150 mL de metanol y 150 mL de agua destilada) se adicionó a cada tubo de prueba conteniendo 40 mg de la cepa pura, la cual fue previamente crecida en un medio de tripticasa de soya.

Metilación: Los tubos ya fríos se destaparon y se les adicionaron 2 mL del agente de metilación (325 mL de ácido hidrocórico 0.6 N y 275 mL de alcohol metílico). Posteriormente se taparon los tubos y se calentaron por 10 ± 1 minuto a 180 ± 1 grados centígrados.

Extracción: A los tubos fríos, se les adicionaron 1.25 mL de una mezcla de hexano y metil-ter-butyl éter (1:1), se taparon y se agitaron suavemente por 10 minutos. Posteriormente se separó la fase acuosa, la cual fue desechada y el sobrenadante (fase orgánica) fue usada para los análisis por cromatografía de gases.

Análisis por Cromatografía de Gases: Las muestras metiladas fueron inyectadas en un cromatógrafo de gases HP 5890 (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, California.) equipado con un detector de ionización de flama y una columna capilar de sílica de 25 m X 0.2 mm fusionado con fenil-metil silicona. La rampa de temperatura se programó de 170-270 a 5 °C por minuto. Siguiendo el análisis, un incremento ballístico a 300 °C permitió limpiar la columna durante un periodo de 2 minutos. Se utilizó nitrógeno como gas acarreador e hidrógeno como compensador de gas y aire para mantener la flama. Una mezcla de ácidos grasos saturados de cadena larga de 9 a 20 carbonos de longitud y cinco hidroxiácidos se utilizaron para la calibración estándar. Con la ayuda de una base de datos, el perfil de los ácidos grasos de las muestras bacterianas analizadas se compararon con el análisis de otras cepas bacterianas ya conocidas.

3.5. Análisis de la sensibilidad microbiana.

Se realizó la identificación de las cepas aisladas con base a una característica fenotípica por medio de un antibiograma, (Olsson-Liljequist *et al.*, 1997). Se utilizó un medio nutritivo LB sólido suplementado con antibióticos a diferentes concentraciones y en condiciones de esterilidad, se realizaron diluciones de las cepas bacterianas y se inocularon sobre el medio LB. Las incubaciones se realizaron a 35 °C. Los antibióticos utilizados fueron: Rifampicina, Ampicilina, Tetraciclina, Kanamicina, Estreptomina, Cloranfenicol, Gentamicina, Eritromicina, Ácido Nalidíxico a concentraciones de 5, 10, 30, 50, 100 y 300 µg para cada antibiótico (Towner, 1997).

Así mismo, se utilizaron multidiscos para bacterias Gram negativas (Sanofi Diagnostics Pasteur, S. A.) donde se incluyen doce antimicrobianos para el estudio *in vitro* de la sensibilidad bacteriana (Barry y Thornsberry, 1995), en estos se incluyen Cefalotina, Ceftriaxona, Cefotaxima, Netilmicina, Cloranfenicol y Amikacina a 30 µg, Trimetoprim Sulfametoxazol a 25 µg, Pefloxacin 5 µg, Gentamicina 10 µg, Carbenicilina 100 µg y Nitrofurantoína 300µg.

En cajas de Petri previamente preparadas con 25 mL de medio nutritivo sólido, se plateó 0.1 mL de inóculo bacteriano, se colocaron los discos con pinzas estériles y se presionó ligeramente para asegurar un contacto con la superficie. Después de 15 minutos de haber colocado los discos se invirtió la caja de Petri y se incubó a 35 °C por 24 horas. Las cepas se clasificaron en resistentes (R), intermedias (I) o susceptibles (S) dependiendo del diámetro del halo de inhibición alrededor de las colonias. Este halo se midió con un compás de calibración Vernier o con una regla. Los resultados se compararon con una tabla la cual está ya establecida por el fabricante API-10® Biomerieux (Barry y Thornsberry, 1985; Stanley, 1983) y siguiendo los criterios de National Committee for Clinical Laboratory Standart (NCCLS, 1993).

3.6. Determinación de la biomasa bacteriana.

3.6.1. Conteo de células totales por propagación en placa.

Siendo importante el estado fisiológico de las células, se utilizó la técnica del conteo en placa por propagación. A partir de un cultivo bacteriano, se realizaron una serie de 10 diluciones en suero fisiológico y se platearon duplicados de 0.1 mL de cada fracción sobre 25 mL de un medio sólido LB. El conteo de las colonias resultantes se realizó a las 24 horas de incubación a 35 grados centígrados para determinar el número total de células. Únicamente se tomaron en cuenta las diluciones que presentaban de 30 a 300 unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL). Los datos representan los promedios de los duplicados en conteo en placa.

3.6.2. Conteo de células viables por propagación en placa.

Se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento durante 72 horas, tomando muestras del cultivo cada tres horas a partir del tiempo cero (0 horas), realizando el procedimiento anterior.

3.7. Degradación microbiana del fenol.

3.7.1. Método fotométrico directo.

La Norma Mexicana establece el método para la determinación de fenoles totales en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. El método está basado en la destilación de los fenoles y la subsecuente reacción de éstos con 4-amino antipirina a un pH de 10 ± 0.1 en presencia de ferrocianuro de potasio, formando compuestos de un color amarillo intenso a rojo, los cuales son extraídos de la disolución acuosa con cloroformo, midiendo su absorbancia a una longitud de onda de 460 nm o bien leer directamente el complejo formado a 510 nm. Este método cubre intervalos de concentración de 0.001 a 0.250 mg·L⁻¹ y 0.5 mg·L⁻¹ (Andrew *et al.*, 1995; NMX-AA-050-SCFI.2001).

Las muestras analizadas fueron diluciones con concentraciones de 50 a 2000 mg·L⁻¹. La absorbancia se determinó en un espectrofotómetro Bausch & Lomb Spectronic 20. La curva estándar y las muestras fueron tratadas de la misma manera (Anexo A 7.5.1).

Se calculó la concentración de la muestra por medio de la ecuación obtenida de la curva de calibración, representada por la siguiente ecuación, con un coeficiente de determinación de 0.9903:

$$[\text{Fenol}] = 0.1846x + 0.1292$$

Donde:

0.1846 = Valor de la pendiente

0.1292 = Ordenada al origen

y = Concentración de fenol (mg·L⁻¹)

x = Absorbancia a 600 nm

3.7.2. Análisis por cromatografía de gases.

Por duplicado, se realizaron cinéticas de crecimiento de las cepas bacterianas. Las cepas bacterianas fueron inoculadas en 10 mL de MM líquido con fenol como única fuente de carbono y energía a diferentes concentraciones: 50, 100 150, 200, 250, 300, 500, 750, 1000, 1250 1500, 1750, 2000 y 2500 mg·L⁻¹ (Anexo A 7.4), y se incubaron durante 48 horas. Se tomaron fracciones de 0.5 mL a partir del tiempo cero por ciclos de cada tres horas. Las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 15 minutos para eliminarles la biomasa presente en las muestras. Posteriormente las muestras se analizaron en un cromatógrafo de gases HP5890 equipado con un detector de ionización de flama (FID) y una columna capilar AT-1000 de sílica de 25 mm X 0.2 mm fusionado con fenil-metil silicona. La temperatura del detector fue de 220 °C, la temperatura del inyector fue de 200 °C, y la temperatura de la columna fue de 180 °C, utilizando nitrógeno como gas acarreador con un flujo de 4 mL/minuto.

Las concentraciones de fenol utilizadas para la curva estándar fueron preparadas en las mismas condiciones de las muestras (Anexo A 7.5.2).

3.8. Degradación de compuestos organoclorados.

De las cepas bacterianas puras, por duplicado se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento, inoculando a las cepas en 10 ml de MM líquido con diferentes compuestos organoclorados: 4-Clorofenol, 2,4-Diclorofenol, 2,4,6-Triclorofenol y pentaclorofenol a concentraciones de 50 mg·L⁻¹, 75 mg·L⁻¹, 100 mg·L⁻¹ y 150 mg·L⁻¹ como única fuente de carbono y energía, e incubando a 35°C por 24 horas. Se tomaron fracciones de 0.5 mL a partir del tiempo cero. Las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 15 minutos para eliminar la biomasa presente en las muestras. Se realizó el análisis de degradación por cromatografía de gases HP5890 bajo las condiciones anteriormente descritas.

3.9. Análisis cinéticos.

3.9.1. Determinación de los parámetros cinéticos de crecimiento.

Para cada cepa identificada por su perfil de ácidos grasos, se evaluaron constantes cinéticas, entre éstas están la constante de saturación (K_s), la velocidad específica máxima de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$), a partir de los cultivos líquidos de MM con fenol como única fuente de carbono y fuente de energía a las concentraciones anteriormente descritas, bajo condiciones aerobias.

Las determinaciones de las constantes cinéticas se llevaron a cabo a partir de las velocidades específicas de crecimiento, considerando un crecimiento de tipo Monod (Monod, 1949).

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{s}{K_s + s}$$

Posteriormente, la ecuación de Monod se linealizó por medio de la ecuación de Lineweaver-Burk tomando los recíprocos para obtener la expresión:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{k_s}{\mu_{m\acute{a}x}} \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{m\acute{a}x}}$$

Donde:

- μ = Velocidad específica de crecimiento (h^{-1})
- $[S]$ = Concentración de sustrato ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
- $\mu_{m\acute{a}x}$ = Velocidad específica de crecimiento máximo
- k_s = Constante de Saturación ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) que representa la concentración de sustrato que produce la mitad de $\mu_{m\acute{a}x}$

3.9.2. Determinación de los parámetros cinéticos de degradación.

Se determinó el porcentaje de degradación tanto del fenol como de los compuestos organoclorados (2,4-DCP y 2,4,6-TCP) utilizando la siguiente ecuación.

$$D(\%) = \frac{C_i - C_f}{C_i} (100)$$

Donde:

- D = Eficiencia de degradación
- C_i = Concentración de sustrato ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) inicial
- C_f = Concentración de sustrato ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) final

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En este capítulo se muestran los datos obtenidos durante la realización de esta tesis. Se muestra con detalle las bacterias presentes en el aislamiento, hasta la obtención de las cepas puras. Por medio de pruebas bioquímicas y ensayos con agentes antimicrobianos, se llevó a cabo la identificación y caracterización de las bacterias procedentes de las industrias de transformación química e industrias papeleras ubicadas en Toluca, Estado de México. Así como la producción de biomasa como resultado de la mineralización del fenol.

4.1. Aislamiento e identificación de bacterias degradadoras de fenol.

A partir de muestras obtenidas de una industria papeleras, se lograron aislar aproximadamente 120 colonias bacterianas mostrando diferentes morfologías coloniales en medios enriquecidos sólidos (LB). Las cepas fueron seleccionadas por su capacidad para crecer en un medio de sales minerales (MM), en presencia de fenol ($300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) como única fuente de carbono y energía, e incubando a 35°C durante 48 horas.

En la Figura 6 se muestran algunas de las bacterias aisladas por replicación en serie. Se observa que no todas las bacterias que crecieron en medios LB, logran crecer en medios mínimos con fenol como fuente de carbono y energía, también se puede observar la diferencia morfológica de las colonias bacterianas en ambos medios. Algunas muestran una forma circular con elevación convexa de borde entero o de forma irregular, de elevación convexa y de borde ondulado o liso. En medio nutritivo LB se observan de color crema, redondas de borde liso, elevación convexa, brillosas, de consistencia cremosa; mientras que en medios MM con fenol se observan de un color crema verdoso, blancas o amarillas, redondas de borde liso, elevación convexa, brillosas semi translucidas. No todas las colonias bacterianas que

crecieron en un medio nutritivo lograron crecer en los medios mínimos con fenol, ya que hay ciertas bacterias que necesitan factores de crecimiento como vitaminas, purinas y pirimidinas, aminoácidos, entre otros.

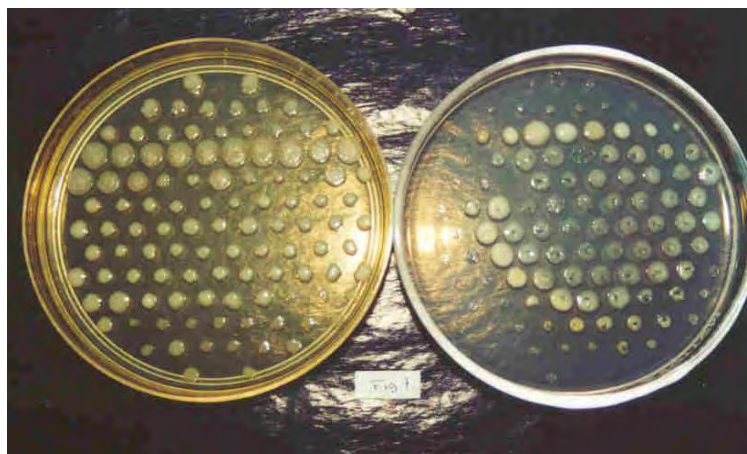


Figura 6. Aislamiento bacteriano en medio LB (izquierda) y en medio MM con fenol como única fuente de carbono y energía (derecha).

4.2. Caracterización fenotípica de las colonias aisladas.

4.2.1. Morfología y características del crecimiento bacteriano.

Se eligieron 10 colonias de diferentes morfologías coloniales y que crecieron en fenol, y fueron resembradas por estría en medio LB y medio MM con fenol. En la Figura 7 (izquierda), se observan las colonias aisladas en medio nutritivo LB, presentan una morfología colonial de forma circular con elevación convexa, borde entero y liso, color crema, brillosas de consistencia cremosa, adheridas a la superficie del sustrato. En la Figura 7 (derecha) se observan las colonias aisladas en medio mineral con $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de fenol como única fuente de carbono y energía, donde las colonias se desarrollaron de color blanco translucido muy pequeñas, de borde liso y elevación convexa, en un promedio de 5 a 6 días.

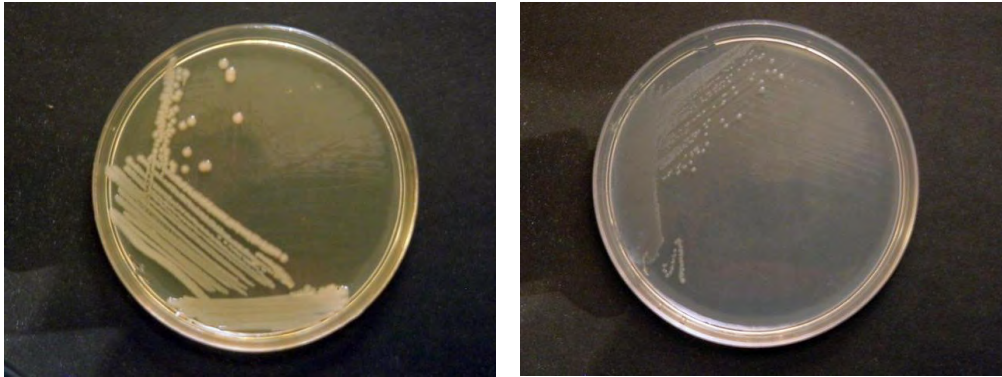


Figura 7. Morfología de colonias bacterianas aisladas en medio nutritivo LB (izquierda) y en un medio de sales minerales MM (derecha).

Utilizando la técnica de tinción de Gram las colonias aisladas fueron teñidas mostrando una tinción característica de bacterias Gram negativas, las cuales toman una forma de pequeños cocobacilos de 1.5-2.5 μm de longitud y de 0.9-1.6 μm de diámetro (Hoh, 1999). Durante su crecimiento en fase estacionaria muestran una forma esférica y generalmente se encuentran dispuestos en pares (cadenas de dos o tres cocobacilos) o en cadenas de longitud variable (Figura 8) y no forman esporas.

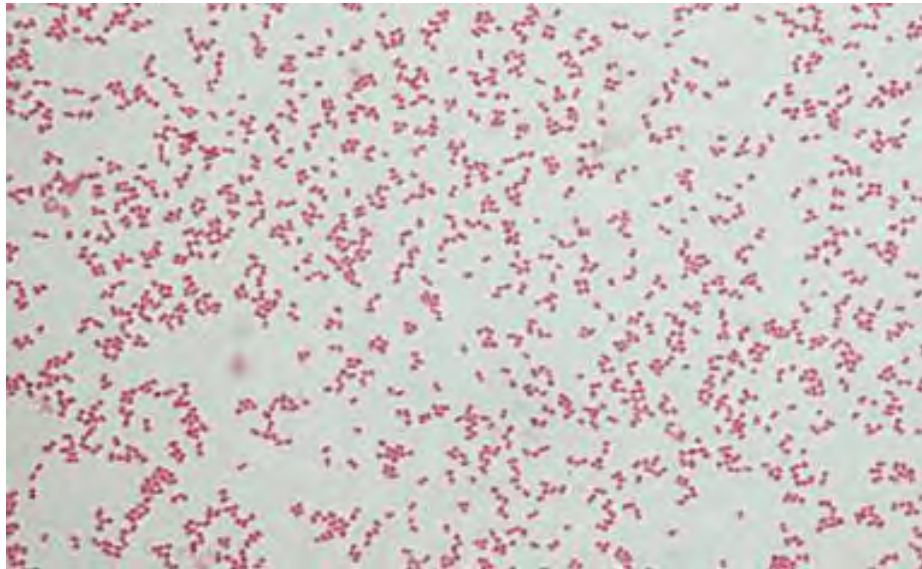


Figura 8. Microscopía óptica del crecimiento bacteriano de una de las cepas puras, aplicando tinción de Gram. (Magnificación 1000x).

De las 10 colonias aisladas, se seleccionaron tres cepas, las de mayor crecimiento en medio con fenol y a su vez las que presentaran morfologías coloniales diferentes. A las tres cepas seleccionadas, se procedió a su identificación taxonómica por medio de la composición de ácidos grasos de la membrana celular (Microbial ID. Inc, Nework, Del). Los resultados evidencian que las cepas bacterianas degradadoras de fenol se ubican dentro del género *Acinetobacter*. En la Tabla 5 se muestran los datos resumidos de lo reportado por Microbial ID, de la caracterización bacteriana. Los datos revelan que dos de las cepas aisladas en cultivos axénicos son pertenecientes a la especie de *A. calcoaceticus*, y la otra pertenece a la especie de *A. baumannii*. Ambas cepas mostraron la misma morfología de cocobacilos Gram negativos en la tinción de Gram. En el anexo A 7.6 se presenta el análisis completo del perfil de los ácidos grasos de cada una de las cepas aisladas.

La identificación de bacterias por el análisis de sus ácidos grasos celulares, se ha utilizado como una herramienta bioquímica (como marcador) que permite diferenciarlas sobre ésta base. Además, es posible establecer relaciones filogenéticas, taxonómicas y metabólicas, dadas por las interacciones medio ambientales de la bacteria. Así mismo, también se han utilizado como indicadores de la presencia o abundancia relativa de comunidades microbianas, como las que intervienen en la mineralización de suelos, ambientes marinos, compostaje, entre otros (Frostegard, 1993; Rajendran, 1994; Romano 2000; Shiosaki, 2001).

En la actualidad este análisis no es un método único de identificación microbiana, aunque con ayuda de claves morfológicas convencionales podemos establecer las relaciones filogenéticas y taxonómicas, además es conveniente complementarlos con estudios de metabolitos secundarios y técnicas moleculares entre otras.

Es importante señalar, que los resultados obtenidos en la identificación de los ácidos grasos de la membrana celular se aplican no sólo al estudio taxonómico del género *Acinetobacter*, sino que permite también ser implementados en todo tipo de bacterias y hongos. A demás, el análisis de ácidos grasos tiene la ventaja de ser un proceso de bajo costo y la identificación

requiere de un menor tiempo, si se compara con técnicas de DNA, esto abre la posibilidad de que sobre ésta técnica se amplíen la base de datos de bacterias u otros microorganismos identificados en diferentes ambientes en un menor tiempo posible.

El género *Acinetobacter* pertenece a la Familia *Neisseriaceae* (Juni, 1984) y se ha reportado que los miembros de éste género han sufrido una gran cantidad de cambios taxonómicos a lo largo de la historia lo cual ha impedido un estudio adecuado (Bouvet y Grimont, 1987).

Este grupo incluye en su taxonomía a 17 genoespecies de *Acinetobacter*, siendo de importancia clínica la especie de *A. baumannii* (Bouvet y Grimont, 1986; Gerner-Smidt, 1992). Sin embargo, Beacham *et al.*, (1996) han sugerido que ambas especies de *Acinetobacter* pueden referirse como un complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* debido a que ambas presentan características bioquímicas muy similares.

En años recientes se ha reportado que *Acinetobacter baumannii* es formalmente conocida como *Acinetobacter calcoaceticus* una subespecie *anitratus*, y pertenecen a especies bacterianas que son ampliamente distribuidas en el ambiente (Gerner-Smidt, *et al.*, 1991; Daniel *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1999).

Sin embargo, estudios taxonómicos moleculares proponen que *Acinetobacter* debe estar clasificada dentro de una nueva familia, *Moraxellaceae* (Rossau *et al.*, 1991 en Kevin, 2006), esta familia incluye a *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Psychrobacter* y organismos relacionados. Además estudios relacionados con las bases de 16S rRNA y ensayos de hibridización rDNA-DNA indican que *Acinetobacter* constituye una rama de la filogenia discreta en la superfamilia II de las Proteobacterias (Van Landschoot *et al.*, 1986; Rossau *et al.*, 1989 en Kevin, 2006).

Tabla 5. Caracterización bacteriana por su cadena de ácidos grasos.

Cepa 1							
AS	AT	AR	% R	TAmnt	No. Rf	DE	RECL
353880250	253592	252977	99.76	240815	9	0.002	0.001
		TSBA40 (rev.4.0)	<i>Acinetobacter</i>		0.587		
			<i>A. calcoaceticus</i>		0.587		
			<i>A. baumannii</i>		0.326		
Cepa 2							
AS	AT	AR	% R	TAmnt	No. Rf	DE	RECL
351244563	284427	283695	99.74	269915	9	0.002	0.002
		TSBA40 (rev.4.0)	<i>Acinetobacter</i>		0.737		
			<i>A. calcoaceticus</i>		0.737		
			<i>A. baumannii</i>		0.631		
			<i>A. radioresintens</i>		0.419		
			<i>Pseudomonas</i>		0.505		
Cepa 3							
AS	AT	AR	% R	TAmnt	No. Rf	DE	RECL
355326969	483632	481164	99.49	455074	10	0.002	0.001
		TSBA40 (rev.4.0)	<i>Acinetobacter</i>		0.702		
			<i>A. baumannii</i>		0.702		
			<i>A. calcoaceticus</i>		0.673		
			<i>A. radioresintens</i>		0.585		
			<i>Pseudomonas</i>		0.618		

Área del solvente (AR), Área total (AT), Área reconocida (AR), Porcentaje de reconocimiento (%R), Total AMNT (TAMNT) Número de referencia (NRf) Desviación estándar (DE), Referencia CL (RECL)

La taxonomía del género *Acinetobacter* ha sufrido diversos cambios a lo largo de la historia. Actualmente se aceptan 23 genoespecies (Poole, 2001), de éstas la de mayor interés es la especie *A. calcoaceticus* (genoespecie 1), *A. baumannii* (genoespecie 2), *Acinetobacter* sp. (genoespecie 3), *A. haemolyticus* (genoespecie 4), *A. junii* (genoespecie 5) y *A. lwffii* (genoespecie 8). El complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* consiste en cuatro genoespecies (genoespecies 1,2,3 y 13) genotípicamente distintas, pero fenotípicamente muy similares. (Vila, 1998; Vila, *et al.*, 2002).

4.3. Caracterización fenotípica del género *Acinetobacter*.

4.3.1. Características bioquímicas

Está reportado que en las células del género *Acinetobacter*, la movilidad no ocurre. Sin embargo, algunas pueden presentar movilidad por contracción, probablemente por la presencia de fimbrias polares (Holt *et al.*, 1999). Las pruebas bioquímicas de movilidad mostraron que, tanto *A. calcoaceticus* como *A. baumannii* son bacterias no móviles, debido a que presentaron crecimiento acentuado sobre la línea de inoculación.

La presencia de la enzima catalasa, se encuentra tanto en bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. Por lo general los organismos que contienen citocromo, presentan la enzima catalasa y por lo tanto pueden descomponer el peróxido de hidrógeno, (Mc. Fadin, 1993). Esta prueba demostró que ambas especies de *Acinetobacter* son bacterias catalasa positiva.

Todas las especies bacterianas aeróbicas obtienen su energía por la respiración, proceso responsable de la oxidación de diversos sustratos. El oxígeno molecular oxida un sustrato con la intervención del sistema de transporte de electrones. A pesar de que *A. calcoaceticus* como *A. baumannii* presentan la enzima citocromo, no pueden reducir el oxígeno molecular en peróxido de hidrógeno. Por lo que se consideran especies bacterianas oxidasa negativas, la prueba de fermentación de glucosa demostró que son bacterias no fermentativas. Todos los géneros de la familia Neisseriaceae presentan una prueba oxidasa positiva excepto el género *Acinetobacter*.

Se ha reportado que el género *Acinetobacter* presenta buen crecimiento en diversos medios de cultivo en las cuales se utilizan como fuente de carbono al levulinato, citracotonato, L-fenilacetato, L-fenilalanina, 4-hiroxibenzoato y L-tartrato; así mismo se ha reportado que el género *Acinetobacter* puede crecer a temperaturas de entre 33 a 35 °C, aunque la capacidad de crecer a 44 °C puede ser una característica distintiva entre *A. baumannii* y las otras

genoespecies de *Acinetobacter*, por lo que se consideran a ambas especies de *Acinetobacter* como un complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* (Gerner-Smidt, 1992). En la Tabla 6. Se muestran las características ensayadas para las bacterias *A. calcoaceticus* y *A. baumannii*, además se muestra el crecimiento en distintas fuentes de carbono y energía, así como los valores de temperatura óptimos para su crecimiento. Estas características son típicas del género *Acinetobacter*.

Las bacterias degradadoras de fenol, pertenecientes al género *Acinetobacter* fueron analizadas fenotípicamente de acuerdo a la susceptibilidad a diferentes concentraciones de antimicrobianos disponibles, tomando en cuenta el género, la especie y el sitio de donde se aisló el microorganismo. Se ha reportado el posible incremento de bacterias resistentes a los antibióticos, en aguas residuales tanto de plantas industriales como en industrias farmacéuticas (Towner, 1997). Guardabassi *et al.* (1998) han utilizado a *Acinetobacter* spp. como un indicador ambiental bacteriano.

Tabla 6. Características del género bacteriano *Acinetobacter*.

Características.	<i>A. calcoaceticus</i>	<i>A. baumannii</i>
Coloración de Gram.	Gram negativas.	Gram negativas.
Forma Celular.	Cocobacilos.	Cocobacilos.
Diámetro Celular (m)	1.5 µm de longitud.	1.5 µm de longitud.
Movilidad Celular.	-	-
*Hábitat.	Suelo y Agua.	Suelo y Agua.
Formación de Esporas.	-	-
*Fermentación de Glucosa	-	-
*Indol.	+	+
**Reducción de nitratos a nitritos	-	-
Factores ambientales de crecimiento:		
Oxígeno.	Aerobias Estrictas.	Aerobias Estrictas.
Temperatura Óptima.	35 °C	37 °C
*pH del Medio Optimo.	7.0	7.0
Crecimiento sobre:		
Fuente de carbono y energía.	<i>A. calcoaceticus</i>	<i>A. baumannii</i>
Fenol.	+	+
4-clorofenol.	-	-
2,4-diclorofenol.	+	+
2,4,6-triclorofenol.	+	+
Pentaclorofenol.	-	-
**Citrato Simons.	+	+

- No Crecimiento, + Crecimiento. *Holt *et al.*, 1999

* www.seimc.org, **www.biomath.jussieu.fr

4.3.2. Análisis de la sensibilidad a antibióticos para el género *Acinetobacter*

Las pruebas de susceptibilidad *in vitro* se midieron de manera semi cuantitativa, esta prueba clasifica a las cepas en resistentes o sensibles (Olsson-Liljequist *et al.*, 1997). La tabla 7 muestra las concentraciones de los diferentes antimicrobianos probados tanto a las especies bacterianas *A. calcoaceticus* como *A. baumannii* en medios nutritivos a 24 horas de incubación.

Tabla 7. Fenotipo de resistencia en las especies de *Acinetobacter*.

Antimicrobiano	Abr.	[µg/mL].	<i>A. calcoaceticus</i>	<i>A. baumannii</i>
Ampicilina.	AM	5	-	+
Ampicilina.	AM	10	-	+
Ampicilina.	AM	30	-	+
Ampicilina.	AM	50	-	-
Ampicilina.	AM	100	-	-
Ampicilina.	AM	300	-	-
Tetraciclina.	TC	5	+	+
Tetraciclina.	TC	10	+	+
Tetraciclina.	TC	30	+	+
Tetraciclina.	TC	50	-	-
Tetraciclina.	TC	100	-	-
Tetraciclina.	TC	300	-	-
Amoxicilina.	AMX	5	+	-
Amoxicilina.	AMX	10	-	-
Amoxicilina.	AMX	25	-	-
Amoxicilina.	AMX	30	-	-
Rifampicina.	RF	5	-	-
Rifampicina.	RF	10	-	-
Rifampicina.	RF	50	-	-
Rifampicina.	RF	300	-	-
Ácido Nalidixico.	AN	5	+	+
Ácido Nalidixico.	AN	30	-	-
Ácido Nalidixico.	AN	100	-	-
Gentamicina.	GM	5	-	-
Gentamicina.	GM	10	-	-
Gentamicina.	GM	30	-	-
Gentamicina.	GM	50	-	-
Gentamicina.	GM	100	-	-
Gentamicina.	GM	300	-	-
Estreptomicina.	STM	5	+	+
Estreptomicina.	STM	10	+	-
Estreptomicina.	STM	30	-	-
Estreptomicina.	STM	100	-	-
Eritromicina.	ER	6	+	-
Eritromicina.	ER	30	-	-
Kanamicina.	KM	5	-	+
Kanamicina.	KM	10	-	+
Kanamicina.	KM	30	-	-
Kanamicina.	KM	50	-	-
Kanamicina.	KM	100	-	-
Kanamicina.	KM	300	-	-
Cloranfenicol.	CL	10	+	+
Cloranfenicol.	CL	30	-	-
Cloranfenicol.	CL	50	-	-
Cloranfenicol.	CL	100	-	-
Cloranfenicol.	CL	300	-	-
Amikacina.	AK	30	S	S
Carbenicilina.	CB	10	R	R
Carbenicilina.	CB	100	R	R
Cefalotina.	CF	30	R	R
Cefotaxima.	CTX	30	R	R
Ceftriaxona.	CRO	30	R	S
Netilmicina.	NET	30	S	S
Nitrofurantoína.	NF	30	S	S
Nitrofurantoína.	NF	300	S	S
Pefloxacina.	PEF	5	S	S
Trimetoprim-sulfametoxazol.	SXT	25	S	S

+ cepa resistente considerada con $>100 \times 10^6$ células por ml; - cepa sensible no presenta crecimiento bacteriano (Stanley, 1993).

R= resistente cuyo diámetro de halo de inhibición fue de ≤ 14 mm y S= sensible cuyo diámetro es ≥ 17 mm. (Barry y Thomsberry, 1985; Giono, 1993)

En la Tabla 8 se muestra un resumen de la resistencia a diferentes antibióticos después de las 24 horas de incubación. Se observa que las dos especies bacterianas *A. calcoaceticus* como *A. baumannii* manifiestan la misma resistencia a seis antibióticos (Cloranfenicol 10 µg, Tetraciclina 10 y 30 µg, Acido Nalidíxico 5 µg, Carbenicilina 100 µg, Cefalotina 30 µg, Cefalotaxina 30 µg), sin embargo difieren en otros seis (para *A. calcoaceticus*: Estreptomycin 10 µg, Eritromicina 6 µg, Ceftriaxona 30 µg, Amoxicilina 5 µg. y para *A. baumannii*: Ampicilina 10 y 30 µg, y Kanamicina 10 µg).

Tabla 8. Resistencia a antibióticos en dos especies de *Acinetobacter* después de 24 horas de incubación.

<i>A. calcoaceticus</i>	<i>A. baumannii</i>
Cloranfenicol 10 µg.	Cloranfenicol 10 µg.
Tetraciclina 10 y 30 µg.	Tetraciclina 10 y 30 µg.
Acido Nalidíxico 5 µg.	Acido Nalidíxico 5 µg.
Carbenicilina 100 µg.	Carbenicilina 100 µg.
Cefalotina 30 µg.	Cefalotina 30 µg.
Cefalotaxina 30 µg.	Cefalotaxina 30 µg.
Ampicilina 10 y 30 µg.	Estreptomycin 10 µg.
Kanamicina 10 µg.	Eritromicina 6 µg.
	Ceftriaxona 30 µg.
	Amoxicilina 5 µg.

Por lo que, en este estudio la especie *A. baumannii* fue la especie más resistente a los antibióticos, así mismo, también fue más resistente que *A. lwffii* (Vila, *et al.*, 2002). Algunos estudios han demostrado que la membrana externa de *A. baumannii* es menos permeable a los antimicrobianos (Navia *et al.*, 2002). Sato y Nakae (2002) analizaron la permeabilidad de la membrana externa de *A. calcoaceticus* y demostraron que el coeficiente de permeabilidad a las cefalosporinas y penicilinas era de 2 a 7 veces menor comparado con *P. aeuroginosa*. Por

tanto, los autores sugieren que una causa de la resistencia intrínseca que presenta *A. calcoaceticus* a los antibióticos puede ser atribuida a la presencia de un escaso número de porinas que además poseen un tamaño de poro pequeño (Magnet *et al.*, 2001; Ribera *et al.*, 2002). Sin embargo, no se descarta que la expresión constitutiva a niveles bajos de uno o varios sistemas de expulsión activa contribuya a la resistencia intrínseca basal que presenta *A. baumannii* a diversos agentes antimicrobianos.

En la actualidad, también se ha demostrado que *A. baumannii* es resistente a la mayoría de betalactámicos, en especial a las penicilinas y cefalosporinas (Bou *et al.*, 2000; Danes *et al.*, 2002). En *A. baumannii* se ha encontrado que un tipo de betalactamasas tipo OXA, de clase molecular D, inactivan a la amoxicilina, amoxicilina más ácido clavulánico, ticarcilina y piperacilina, aunque algunas de estas enzimas pueden tener alguna actividad frente a ceftriaxona, eritromicinas y ceftazidimas (Afzal-Shah *et al.*, 2001; Donald *et al.*, 2002). Además, se ha demostrado que *A. baumannii* puede sintetizar carbapenemasas de clase B tipo IMP que presentan una amplia actividad frente a betalactámicos (Chu *et al.*, 2001; Navia *et al.*, 2002).

A demás en otros estudios, se ha observado que existe una gran prevalencia en la resistencia a cloranfenicol 30 µg, amoxicilina 10 µg y oxitetraciclina 30 µg en especies de *Acinetobacter* spp. provenientes de efluentes industriales (Bergogne-Berezin, 1996).

Generalmente, es de gran importancia asegurar la selección y diseminación de bacterias resistentes en la naturaleza, ya que deberían evitarse para asegurar un tratamiento efectivo contra enfermedades infecciosas en humanos y mantener un balance ecológico que favorezca la predominancia de floras bacterianas susceptibles en la naturaleza. Por un lado, las aguas residuales de las plantas industriales podrían ser fuentes de aislados de bacterias resistentes a antibióticos presente en esos residuos industriales (Guardabassi, *et al.*, 1998), por la exposición prolongada a esos compuestos de la microbiota existente en el lugar de vertido. Por otro lado, estas características de resistencia a antibióticos ayudarán a seleccionar la

efectividad en las bacterias conjugadas, en estudios futuros acerca de la transferencia horizontal de información genética, por medio de plásmidos conjugativos que codifiquen para la degradación de compuestos recalcitrantes en bacterias heterólogas.

4.4. Parámetros cinéticos.

Los parámetros cinéticos para el crecimiento de *A. calcoaceticus* y *A. baumannii* se llevaron a cabo empleando cultivos en medios de sales minerales conteniendo fenol a concentraciones iniciales de 0 a 2250 mg·L⁻¹. Los resultados de esta prueba se observan en la figura 9, en ésta se muestran las curvas típicas de un crecimiento microbiano, para ambas especies de *Acinetobacter*. Así mismo, se observa que tanto para *A. calcoaceticus* como para *A. baumannii*, el mayor crecimiento se da a una concentración de 250 mg·L⁻¹ y 750 mg·L⁻¹ de fenol, respectivamente. *A. calcoaceticus* llega a una fase de crecimiento estacionario a las 74 horas y *A. baumannii* a las 80 horas.

También se observa que por arriba de las concentraciones de sustrato (1000 mg·L⁻¹) para *A. calcoaceticus* y *A. baumannii*, el crecimiento microbiano se inhibe. Así mismo se observó que a estas concentraciones de 1000 mg·L⁻¹, la velocidad de crecimiento es similar al que se observa cuando se lleva a cabo un cultivo utilizando un medio nutritivo LB (control), y que a concentraciones mayores (1250 a 2500 mg·L⁻¹) la velocidad de crecimiento están por debajo del control en ambas especies de *Acinetobacter*, figura 10.

Se ha reportado que este efecto de inhibición de sustrato (fenol) se presenta tanto en cultivos puros (Hill y Robinson, 1995; Yang and Humphrey, 1995) como en sistemas de lodos activados (D'Adamo *et al.*, 1984; Pawlowsky y Howell, 1993) y en cultivos mixtos (Saéz y Rittmann, 1993; Lallai *et al.*, 1998) a concentraciones por arriba de los 800 mg·L⁻¹. En estos trabajos, se evaluó dicho fenómeno de inhibición utilizando la ecuación de Haldane, y en la cual se obtuvo una k_i de 284 mg·L⁻¹.

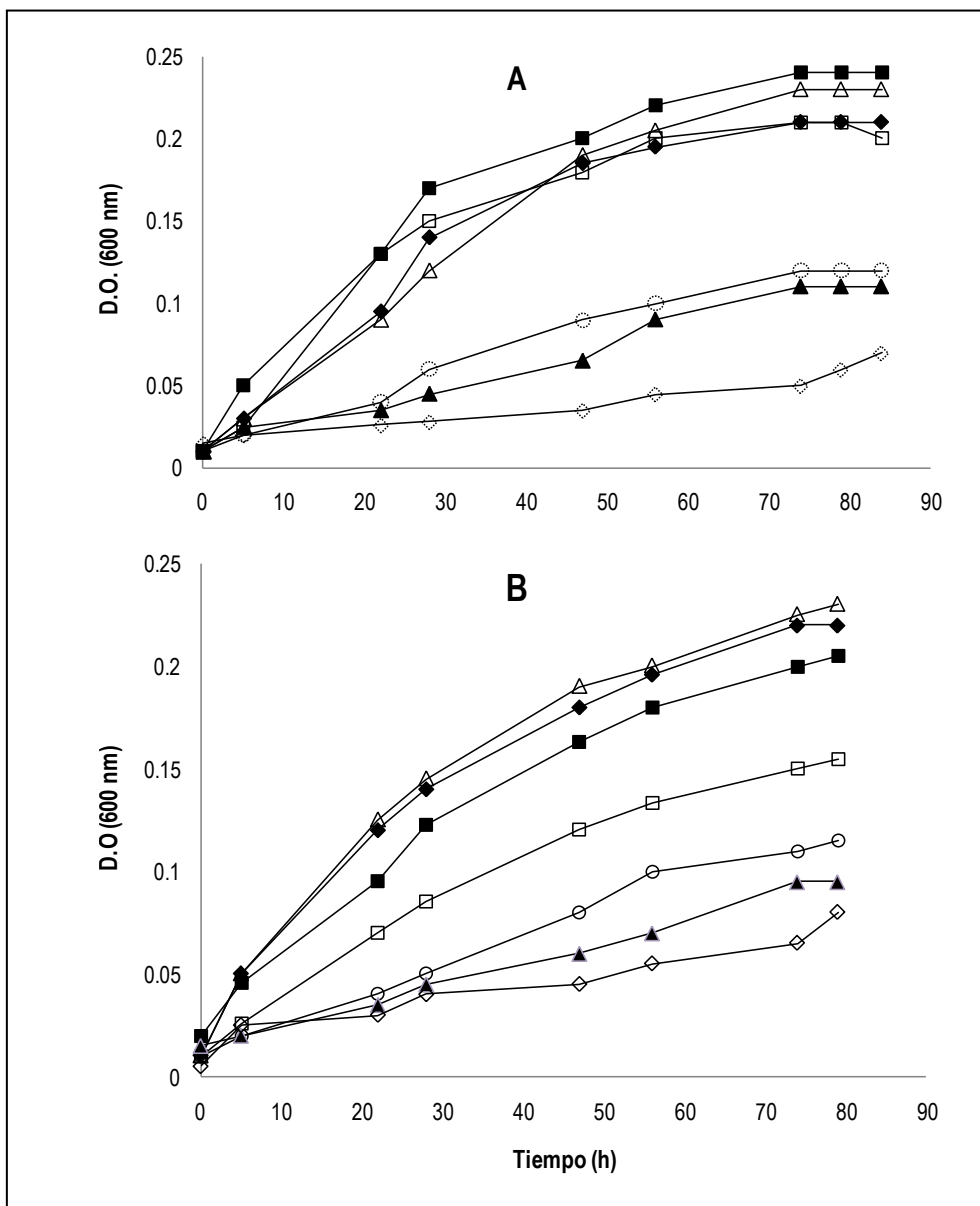


Figura 9. Crecimiento bacteriano de (A) *A. calcoaceticus* y (B) *A. baumannii*, a 35°C, pH 7.0 en un medio mineral conteniendo fenol como única fuente de carbono y energía a diferentes concentraciones: (□) 100 mg·L⁻¹, (■) 250 mg·L⁻¹, (◆) 500 mg·L⁻¹, (Δ) 750 mg·L⁻¹, (▲) 1000 mg·L⁻¹, (◇) 1250 mg·L⁻¹.

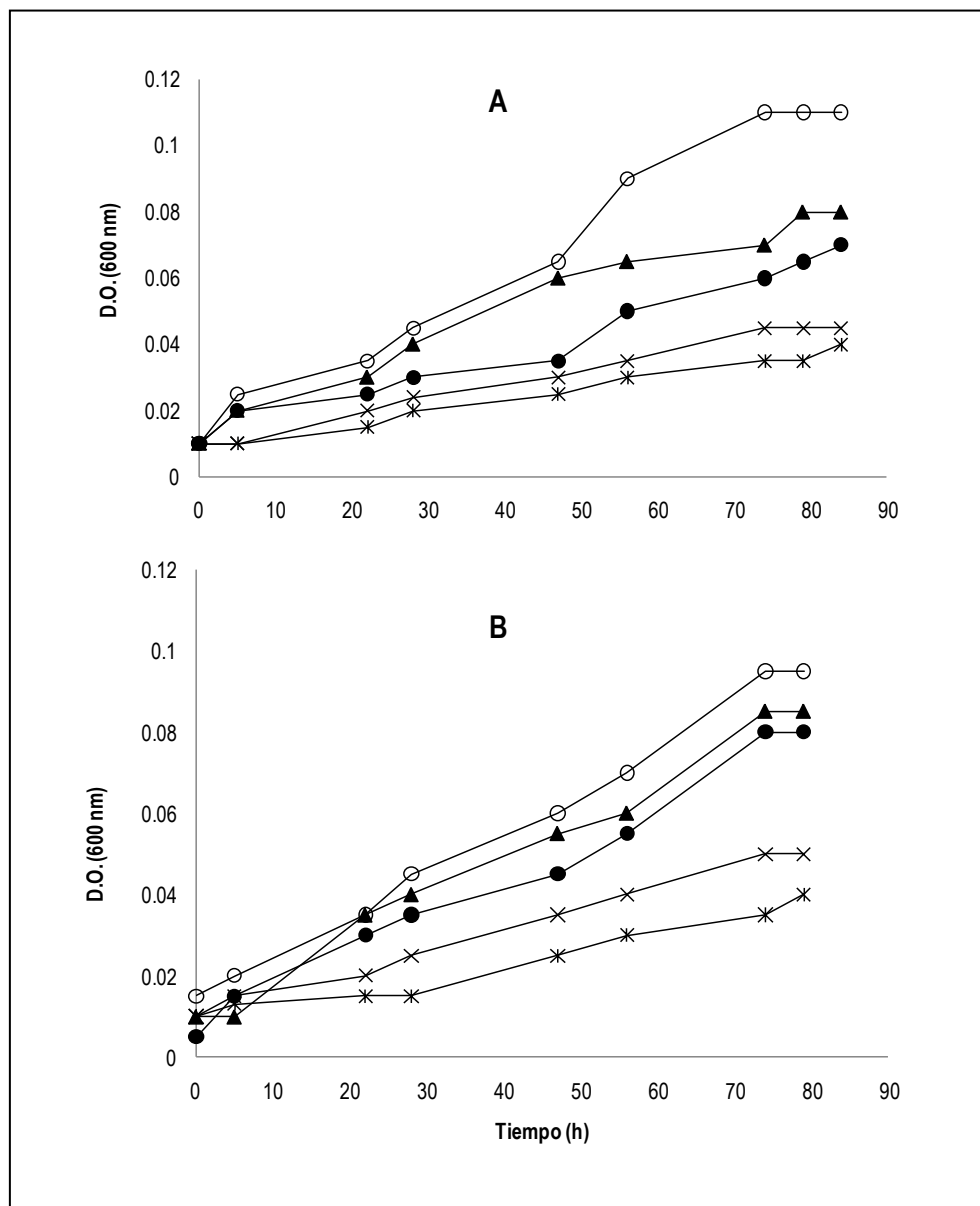


Figura 10. Crecimiento bacteriano en medio de cultivo LB de (A) *A. calcoaceticus* y (B) *A. baumannii*, a 35°C, pH 7.0 en un medio mineral conteniendo fenol como única fuente de carbono y energía a concentraciones de: (▲) 1000 mg·L⁻¹, (●) 1500 mg·L⁻¹, (×) 2000 mg·L⁻¹, (*) 2500 mg·L⁻¹, (o) Control

La inhibición del crecimiento al aumentar las concentraciones de sustrato en ambas cepas, puede atribuirse a la acumulación de intermediarios metabólicos, cuando el fenol es

mineralizado a través de la vía *meta* como ocurre con *P. putida* (Allsop *et al.*, 1993; Oh *et al.*, 1994). Mörsen y Rehm (1990) monitorearon los cambios de la concentración del intermediario en relación a la degradación del fenol, encontrando que la producción y acumulación de intermediarios metabólicos durante la degradación se da cuando las concentraciones del ácido 2-hidroximucónico semialdehído (2-HMAS), primer producto de la vía del catecol alcanza un máximo cuando el fenol es completamente degradado.

Para determinar la velocidad específica de crecimiento, μ , a las diferentes concentraciones de fenol, se consideró el periodo de crecimiento exponencial. En la figura 11, se muestra la linealización de la ecuación 1 para cada concentración inicial de fenol, en esta gráfica las pendientes representan la velocidad específica de crecimiento. Para las concentraciones de fenol no mostradas en la gráfica se realizó el mismo procedimiento para el cálculo de la velocidad específica de crecimiento.

En la tabla 9, se muestran los valores de μ , de las curvas de crecimiento mostradas en la figura 11 y en la cual se observa que a concentraciones hasta $750 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ éstas se mantienen constantes, y que a concentraciones mayores de $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ los valores de μ disminuyen significativamente con respecto al control. Esto quizá puede deberse a la presencia de metabolitos secundarios generados durante el crecimiento de los microorganismos en los medios de sales minerales conteniendo fenol como sustrato limitante.

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad \text{ecuación 1}$$

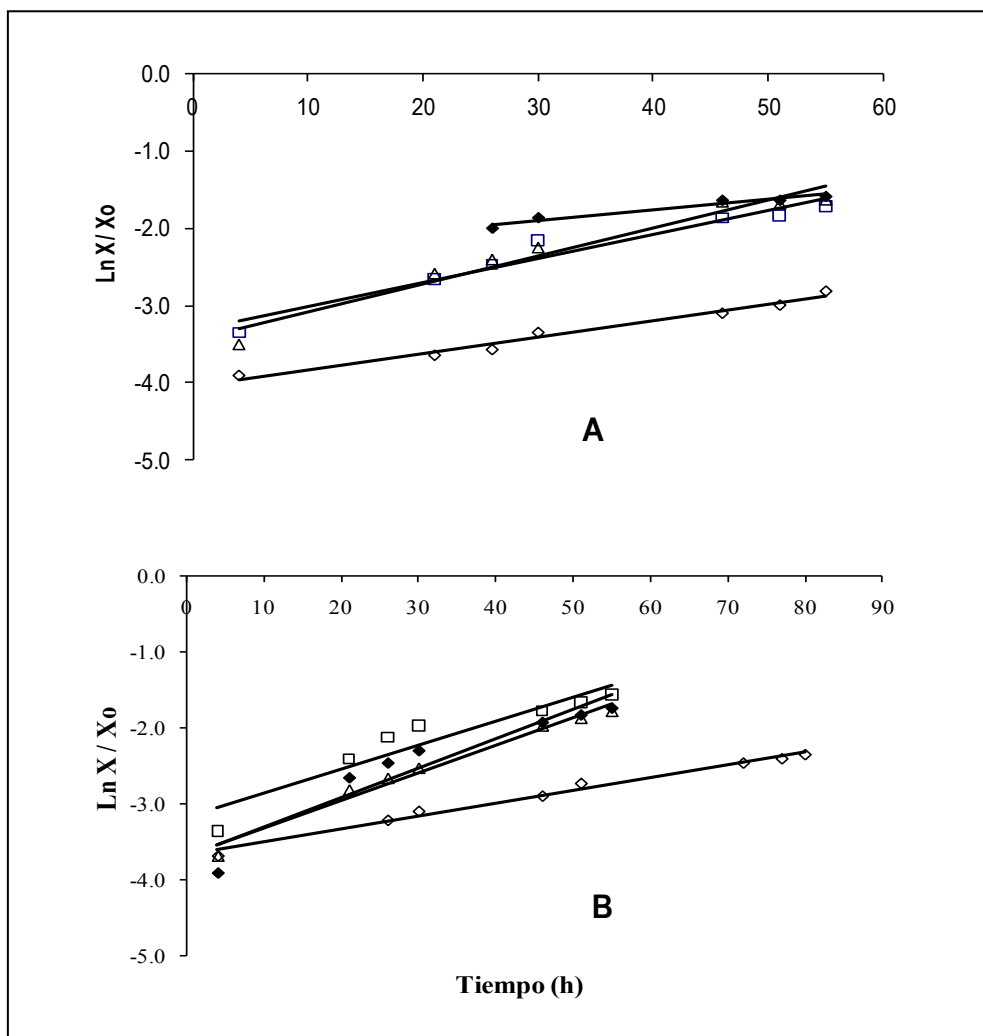


Figura 11. Logaritmo de la densidad óptica a 600 nm como una función del tiempo para diferentes concentraciones de fenol. (A) *A. calcoaceticus*, (B) *A. baumannii* (determinación de la velocidad específica de crecimiento). (□) 250 mg·L⁻¹, (◆) 500 mg·L⁻¹, (△) 750 mg·L⁻¹, (◇) 1250 mg·L⁻¹.

Tabla 9. Velocidades iniciales de las curvas de crecimiento de ambas especies de *Acinetobacter*.

[Fenol en mg·L ⁻¹]	<i>A. calcoaceticus</i>	<i>A. baumannii</i>
Control	0.0871	0.0698
250	0.1013	0.0586
500	0.0868	0.0500
750	0.0818	0.0513
1000	0.0442	0.0278
1250	0.0403	0.0151
1500	0.0136	0.0149
2250	0.0260	0.0169

Para determinar $\mu_{\max}$ y K_s , se utilizó la linealización de la ecuación de Monod (Figura 12). En esta figura el valor de la pendiente corresponde a $K_s/\mu_{\max}$ y la ordenada al origen $1/\mu_{\max}$. Los valores de las constantes cinéticas para *A. calcoaceticus* y *A. baumannii* se muestran en la tabla 10, en la cual se puede observar que los valores de $\mu_{\max}$ para ambas especies de *Acinetobacter*, están dentro de los valores reportados, ya que se ha observado estos valores de $\mu_{\max}$ en cultivos puros creciendo en fenol están de 0.29 a 0.9 h⁻¹ dependiendo del microorganismo y del medio utilizado (Hill y Robinson, 1995; Wang *et al.*, 1996; Wang y Loh, 1999). Otros estudios también han reportado que para *Acinetobacter* sp. el valor de $\mu_{\max}$ es de 0.85 h⁻¹ a 200 mg·L⁻¹ de fenol (Hao *et. al.*, 2002), mientras que para *P. putida* ATCC 49451 la $\mu_{\max}$ reportada fue de 0.9 h⁻¹ y K_s de 6.93 mg·L⁻¹ a una concentración de 100 mg·L⁻¹ de fenol (Wang y Loh, 1999). Monteiro *et al.*, (2000) encontraron que para *P. putida* DMS 548 se obtuvo una $\mu_{\max}$ de 0.436 h⁻¹ con una K_s de 6.19 mg·L⁻¹ a una concentración de 1 a 100 mg·L⁻¹ de fenol. Otros estudios reportan que para *A. terreus* y *G. candidum* el valor de $\mu_{\max}$ es de 0.06 h⁻¹ y 0.047 h⁻¹ respectivamente, siendo la K_s para *A. terreus* de 11351 mg·L⁻¹ y para *G. candidum* de 3830 mg·L⁻¹ a una concentración de 475 mg·L⁻¹ de fenol tanto para *Aspergillus terreus* y *Geotrichum candidum* (García *et al.*, 1997).

Así mismo puede observarse que, no hay diferencia significativa de los valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ en ambas especies y que la afinidad hacia el sustrato es mayor para *A. baumannii*, por lo que, este microorganismo podría ser un buen candidato para el tratamiento aerobio de aguas residuales con contenidos fenólicos de hasta $750 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

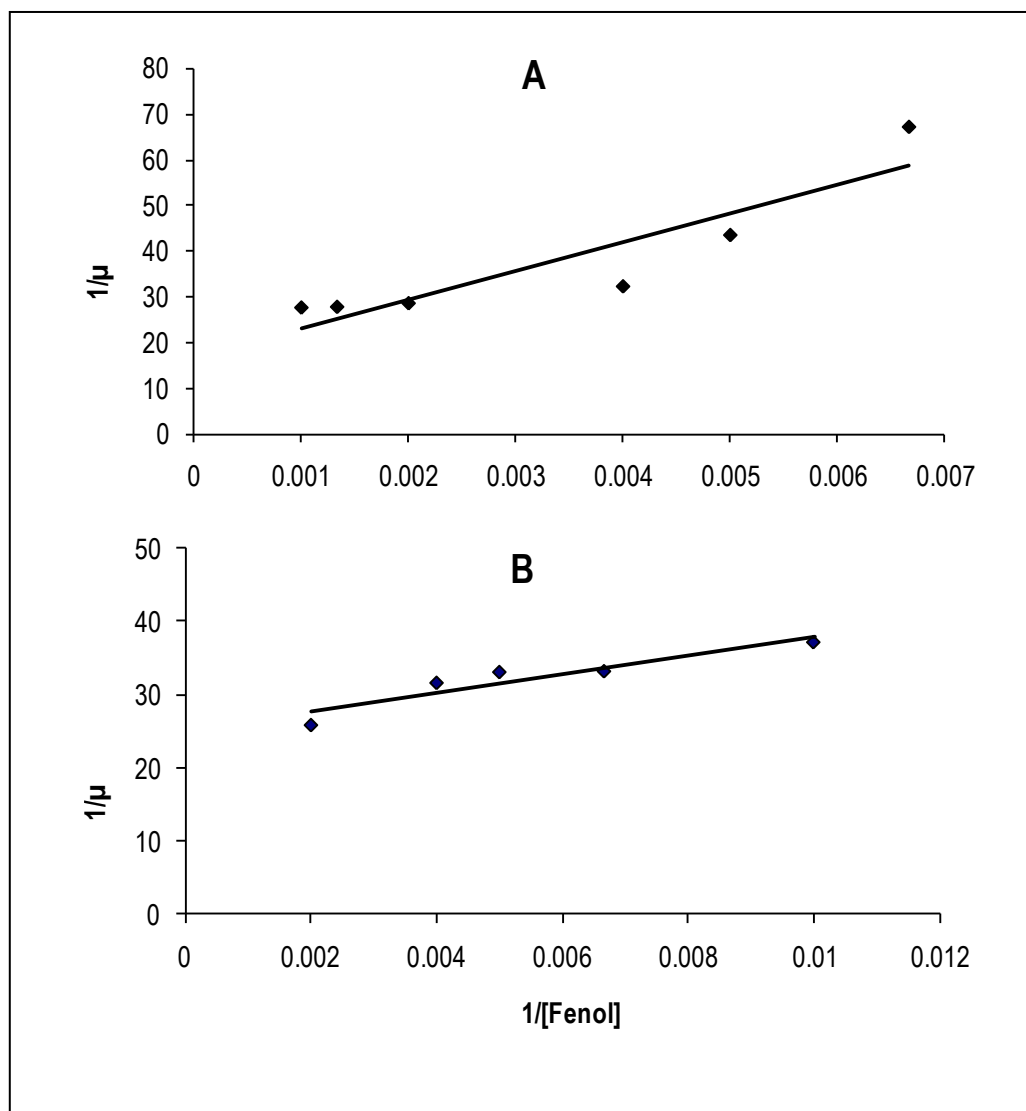


Figura 12. Linearización de las velocidades iniciales de las concentraciones de fenol por Lineweaver-Burk. (A) *A. calcoaceticus* (B) *A. baumannii*, obteniendo una $Y=1114.6x+4.5299$ con una $R^2=0.945$, y $Y=1084.72x+5.5015$ con una $R^2=0.925$, respectivamente.

Tabla 10. Comparación de las constantes cinéticas entre ambas especies del género *Acinetobacter*.

Constantes Cinéticas	<i>A. calcoaceticus</i> ⁽¹⁾	<i>A. baumannii</i> ⁽¹⁾
$\mu_{max} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.221	0.182
$K_s \text{ (mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{)}$	247.15	197.16

⁽¹⁾ Datos cinéticos obtenidos en este estudio.

4.5. Crecimiento bacteriano en compuestos organoclorados.

En la figura 13, se muestra el crecimiento bacteriano de las cepas *A. calcoaceticus* y *A. baumannii* en medios minerales con 2,4-Diclorofenol y con el 2,4,6-Triclorofenol a una concentración de 50 mg·L⁻¹. Puede observarse que *A. baumannii* crece mejor en ambos compuestos que *A. calcoaceticus*. Ambas cepas bacterianas no logran crecer con 4-clorofenol como única fuente de carbono y energía, a pesar de que es un compuesto menos complejo, Así mismo, ninguna de las dos cepas bacterianas crece en presencia del pentaclorofenol que es un compuesto más complejo que el 2,4-Diclorofenol y el 2,4,6-Triclorofenol. La biodegradabilidad de estos compuestos clorados podría deberse a la estabilidad de los mismos,

En la figura 14 se muestran las velocidades específicas de crecimiento para *A. calcoaceticus* y *A. baumannii* utilizando 2,4-Diclorofenol y 2,4,6-Triclorofenol, tomando la fase exponencial del crecimiento.

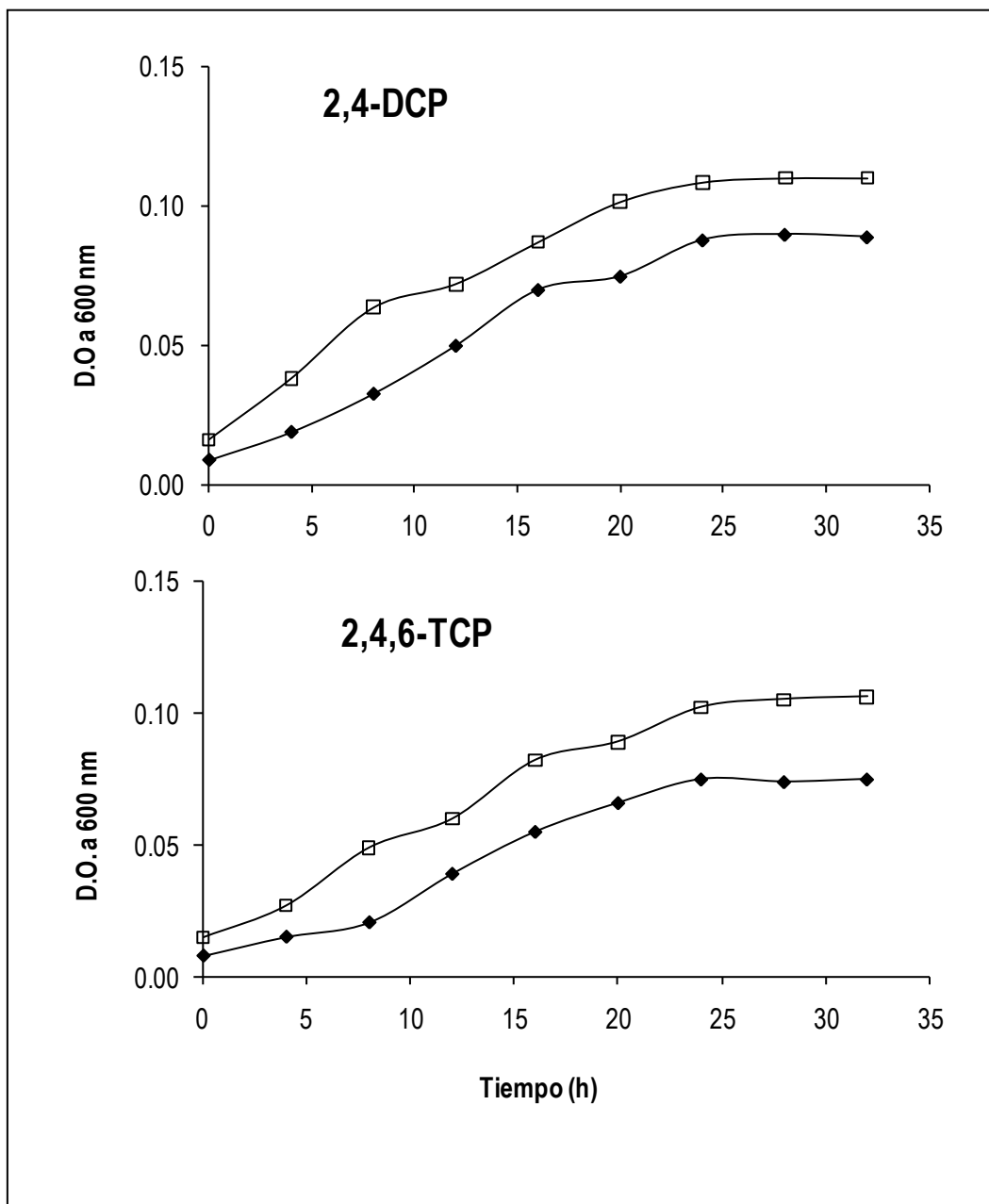


Figura 13. Crecimiento bacteriano a 35°C, pH 7.0 sobre un medio mineral conteniendo 2,4-Diclorofenol y 2,4,6-Triclorofenol como única fuente de carbono y energía a 50 mg·L⁻¹. *A. baumannii* (□) y *A. calcoaceticus* (♦).

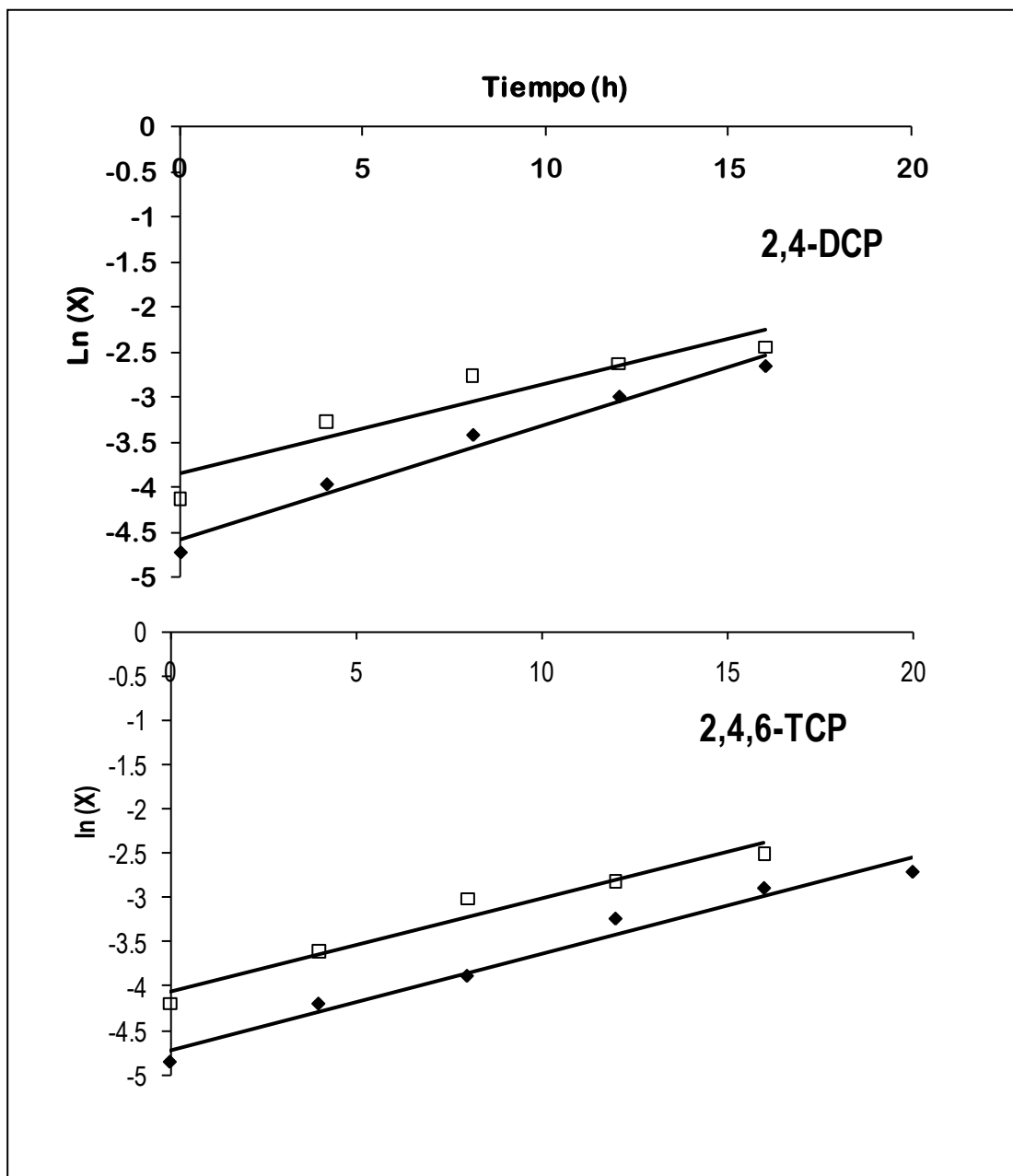


Figura 14. Logaritmo de la densidad óptica a 600 nm como una función del tiempo para 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol a $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. *A. baumannii* (□) y *A. calcoaceticus* (◆) (determinación de la velocidad específica de crecimiento), obteniendo para el 2,4-DCP una $Y=0.1006x-3.8521$ con una $R^2=0.8725$ y una $Y=0.1272x-4.5727$ con una $R^2=0.9750$ respectivamente; y para el 2,4,6-TCP una $Y=0.1084x-4.068$ con una $R^2=0.9588$ y una $Y=0.1087x-4.7209$ con una $R^2=0.9730$ respectivamente.

En estudios anteriores se ha encontrado que especies de microorganismos no logran degradar el compuesto organoclorado 2,4-diclorofenol como única fuente de carbono aunque tengan la capacidad de deshalogenarlo, ya que muchos clorofenoles actúan como desacopladores de citocromos clásicos y por tanto no siempre son usados como fuentes de carbono y energía debido a la toxicidad a concentraciones de sustrato bajas ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) Koh *et al.*, 1997. Sin embargo, en este estudio se probó que tanto *A. calcoaceticus* como *A. baumannii* lo degradan a una concentración de $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, además de que tienen la capacidad de degradar el 2,4,6-Triclorofenol a la misma concentración. Las curvas de consumo de estos clorofenoles se muestran en la Figura 15.

Se ha demostrado que los monoclorofenoles presentan gran similitud en el comportamiento de sus reacciones, ya que el *o*-Clorofenol como es el caso de los 2-Clorofenoles presentan un poco más de resistencia a la degradación, debido al momento dipolar originado por la posición del cloro cerca del grupo funcional hidroxilo (OH.) director de la reactividad del núcleo aromático (Wade, 2001), esto puede explicar la importancia de la estructura en el proceso degradativo mostrando que la tendencia seguida al incrementar la cantidad de sustituyentes, es incrementar la estabilidad del núcleo aromático y por lo tanto aumentar la resistencia a la degradación. En tanto que el *p*-Clorofenol (4-Clorofenol), presenta una fácil degradación debido a que su momento dipolar es cero por la posición del átomo de cloro en sentido opuesto al grupo rector, lo que origina una molécula simétrica, esto favorece la desactivación del núcleo aromático y promueve una mejor velocidad al reaccionar con un catalizador, utilizando un sistema por fotocátalisis, que en condiciones aerobias en cultivos puros se incrementa la estabilidad del grupo aromático y la resistencia a la degradación también se incrementa (Arriaga *et al.*, 1999). La posición en *meta* del átomo de cloro posee un valor intermedio de momento dipolar entre el isómero *orto* y *para*, originando una resistencia intermedia.

Cuando se emplean compuestos más complejos como el 2,4-Diclorofenol un compuesto menos clorado que el 2,4,6-Triclorofenol, el 2,4-Diclorofenol se degrada más fácilmente

(Morrison y Grzechulska y Morawski, 2002) debido a que el grupo hidroxilo (OH^-) es un fuerte director *orto-para*, y en éste compuesto dichas posiciones están parcialmente ocupadas, lo que favorece que la nube electrónica esté cargada hacia un lado del núcleo y por tanto ayude a que se logre más fácilmente el rompimiento de anillo bencénico, mientras, que el 2,4,6-Triclorofenol que es una molécula que marca el grupo OH^- originando una nube electrónica homogénea que hace a esta molécula muy estable dificultando su degradación.

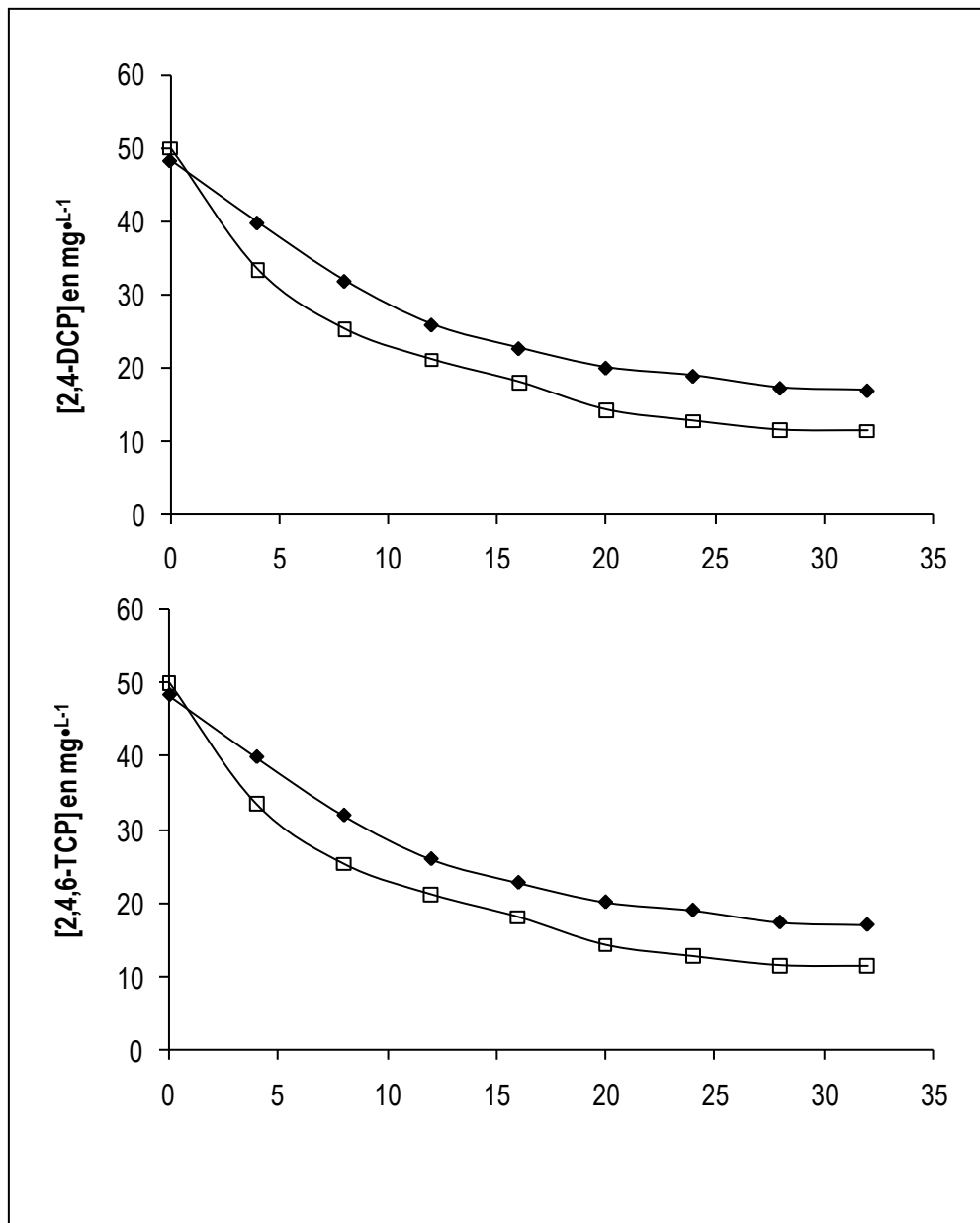


Figura 15. Consumo de compuestos organoclorados a 35°C, pH 7.0 sobre un medio mineral conteniendo 2,4-Diclorofenol y 2,4,6-Triclorofenol como única fuente de carbono y energía a 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. *A. baumannii* ($\square$) y *A. calcoaceticus* ($\blacklozenge$).

El porcentaje de degradación para *A. calcoaceticus* y para *A. baumannii* son del 60.66 y 74.40 por ciento para el 2,4-Diclorofenol; así como 43.68 y 65.13 por ciento para el 2,4,6-Triclorofenol, respectivamente. En la tabla 11 se muestran los porcentajes de degradación tanto para fenol como para los clorofenoles para ambas especies bacterianas. Se observa que el porcentaje de degradación de fenol, para todas las concentraciones ensayadas, es superior al 70 por ciento. En tanto que el porcentaje de degradación para el 2,4-Diclorofenol y para el 2,4,6-Triclorofenol es mayor para la cepa *A. baumannii* a 50 mg·L⁻¹. Para este compuesto, en concentraciones mayores (75, 100,150 mg·L⁻¹) no hubo degradación en ambas cepas. Así mismo, para el 4-Clorofenol y el pentaclorofenol no hubo degradación a ninguna de las concentraciones ensayadas.

Tabla 11. Comparación de los porcentajes de degradación entre las especies de *Acinetobacter*.

[Fenol] inicial (mg·L ⁻¹)	Porcentaje de degradación	
	<i>A. calcoaceticus</i>	<i>A. baumannii</i>
50	85.55	87.91
100	86.40	77.65
150	77.04	87.99
200	87.45	86.59
250	86.13	78.32
300	78.05	70.54
500	71.18	70.31
[2,4-DCP] inicial (mg·L ⁻¹)		
50	60.66	74.40
[2,4,6-TCP] inicial (mg·L ⁻¹)		
50	43.68	65.13

5. CONCLUSIONES.

El fenol puede degradarse de manera aerobia. El perfil del análisis de los ácidos grasos celulares en las tres cepas aisladas de los efluentes industriales, mostraron que pertenecen al género *Acinetobacter*, dos de ellas pertenecen a la especie *calcoaceticus* y una a la especie *baumannii*.

A. calcoaceticus y *A. baumannii* manifiestan la misma resistencia a seis antibióticos (cloranfenicol 10 µg, tetraciclina 10 y 30 µg, ácido nalidíxico 5 µg, carbenicilina 100 µg, cefalotina 30 µg, cefalotaxina 30 µg), sin embargo difieren en otros seis (para *A. calcoaceticus*: estreptomicina 10 µg, eritromicina 6 µg, ceftriaxona 30 µg, amoxicilina 5 µg. y para *A. baumannii*: ampicilina 10 y 30 µg, y kanamicina 10 µg). Estos resultados pueden ser características importantes para la identificación de las cepas, en los procesos de conjugación bacteriana.

El fenol, como única fuente de carbono y energía puede ser degradado por *A. calcoaceticus* a una concentración de 250 mg·L⁻¹ y *A. baumannii* a una concentración de 750 mg·L⁻¹, concentraciones a las que se obtiene el máximo crecimiento. En cultivos alimentados con fenol para *A. calcoaceticus* y *A. baumannii* (35 °C y 37 °C a pH de 7.9, respectivamente), La μ_{max} encontrada fue de 0.221 y 0.182 h⁻¹ y la K_s de 247.15 y 197.6 mg·L⁻¹ respectivamente.

Ambas especies de *Acinetobacter*, crecen en 2,4-Diclorofenol y 2,4,6-Triclorofenol a una concentración de 50 mg·L⁻¹, donde las velocidades específicas de crecimiento a esta concentración fueron de 0.1272 h⁻¹ para *A. calcoaceticus* y 0.1006 h⁻¹ para *A. baumannii*, ambas creciendo en 2,4-diclorofenol, y de 0.1087 h⁻¹ para *A. calcoaceticus* y 0.1048 h⁻¹ para *A. baumannii* creciendo en 2,4,6-triclorofenol.

Ambas especies de *Acinetobacter* pueden degradar el 2,4-Ciclorofenol a una concentración de $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, con una eficiencia de degradación del 60.66% y del 74.70% respectivamente. Así mismo, también lograron degradar el 2,4,6-Triclorofenol en un porcentaje de degradación del 43.68% y 65.13% respectivamente, a la misma concentración, por lo que se concluye que *A. baumannii* fue el microorganismo con mayor eficiencia de degradación, tanto del fenol como de los compuestos clorados.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Afzal-Shah M, Woosford N. y Livermore DM. (2000). **Characterization of OXA-25, OXA-26 and OXA-27, molecular class D β -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*.** *Antimicrobiological Agents Chemother.* **45**:583-588.

Alexander M. (1985). **Biodegradation of organic chemicals.** *Environmental Science Technology.* **19**:106-111.

Alexander M. (1991). **Biodegradation and bioremediation.** 2nd. Edition. Academic Editorial. San Diego, United States. Pág. 453-459.

Allsop PJ, Chisti Y, Moo-Young M, y Sullivan GR. (1993) **Dynamics of phenol degradation by *Pseudomonas putida*.** *Biotechnology and Bioengineerin.* **41**:572-580.

Andrew D. Eaton, Leonore S, Clescer I. y Arnold E. Greenberg. (1995). **Standard methods for the examination of water and wastewater.** 19th ed. Ed. American Publisher Health Association. Washington, DC. pp. 200-205.

Anselmo AM, Cabral J. y Novais JM. (1989). **The adsorption of *Fusarium flocciferum* spores on particles and their use in the degradation of phenol.** *Applied of microbiology and Biotechnology.* **31**:200-203.

Anselmo AM. y Novais JM. (1992). **Degradation of phenol by immobilized mycelium of *Fusarium flocciferum* in continuous culture.** *Water Science and Technology.* **3**(1):161-168.

Antai SP. y Crawford DL, (1983). **Degradation of phenol by *Streptomyces setonii*.** *Canadian. Journal of Microbiology.* **29**:142-143.

Apalahati JHA. y MS. Salkinoja-Salonen. (1987). **Pechlorination and para-hydroxylation of polichlorination phenols by *Rhodococcus chlorophenolic*.** *Journal of Bacteriology.* **169**(2):675-681.

Atlas R. (1991). **Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective.** *Biotechnology and Bioengineering*. **36**:539-545.

Atlas R. y Bartha, R. (2002). **Ecología microbiana y microbiología ambiental.** 4ª. Edición, Editorial Pearson Educación, SA. España. Págs 596-603.

Atlas R. y Bartha, R. (2005). **Ecología microbiana y microbiología ambiental.** 5ª. Edición, Editorial Pearson Educación, SA. España. Págs 620-629.

Autenrieth RL, Bonner JS, Akgerman A. y Mc Greary EM. (1991). **Biodegradation of phenolic wastes.** *Journal of Hazardous Material*. **28**:29-53.

Balfanz T. y HJ Rehm. (1991). **Biodegradation of 4-chlorophenol by absorptive immobilized *Alcaligenes* sp A7-2 in soil.** *Applied of microbiology and Biotechnology*. **35**:662-668.

Barry Al. y Thornsberry C. (1985). **Susceptibility test diffusion test procedures.** *Manual of clinical microbiology*. 4th ed. Ed. En: E. Lenn ette. American Society for Microbiology. Washington, DC. pp. 978-987.

Baumann P. (1998). **Isolation of *Acinetobacter* from soil and water.** *Journal of Bacteriology*. **96**:39-42

Bayly RC. y Wigmore GJ. (1973). **Metabolism of phenol and cresol by mutants of *Pseudomonas putida*.** *Journal Bacteriology*. **113**:1112-1120.

Beacham AM, Seviour RJ, Lindrea KC. y Livingston I. (1996). **Genospecies diversity of acinetobacter isolates obtained from a biological nutrient removal pilot plant of a modified UCT configuration.** *Water Research*. **24**(1):23-29.

Benefield Larry D. y Clifford W. Randall. (1987). **Biological process design for wastewater treatment.** *Fundamentals of microbiology*. Inprint. Inc. Charlottesville, Virginia. pp. 24-41.

Bergogne-Berezin E. y Towner KJ. (1996). ***Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical and epidemiological features.** *Clinical of Microbiology Review*. **9**:148-165.

Bettmann H. y HJ. Rehm. (1985). **Continuous degradation of phenol(s) by *Pseudomona putida* P8 entrapped in interspecies comparisons and correlations.** *Resource of Journal of Water Pollution Control Federal*. **63**(3):198-207.

Bohloold BB, EL. Schmidt y C. Beasley. (1977). **Nitrification in the intertidal zone: influence or effluent type and effect of tannin on nitrifiers.** *Applied and Environmental Microbiology*. **34**(5):523-528.

Borja R, Martín A, Alonso V, García I. y Banks CJ. (1995). **Influence of different aerobic pretreatment on the kinetics of anaerobic digestion of olive mill wastewater.** *Water Research*. **29**:289-295.

Borja R, Martín A, Maestro R, Luque M. y Durán M. (1993a). **Improvement of the kinetics of anaerobic digestion of vinasse by the removal of phenolic compounds.** *Biotechnology Letters*. **15**:311-316.

Bossert, I y Bartha, R. (1984). **The fate of petroleum in soil ecosystems.** *Petroleum Microbiology*. Macmillan Publishing Co. New York. Págs. 434-476.

Bou G, Martínez Beltrán, Jiménez de Anta MT, y Vila J. (2000). **Cloning, nucleotide sequencing and analysis of the gene encoding an AmpC beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **44**:428-432.

Bouvet PMJ. y Grimont PAD. (1987). **Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*.** *Annals Microbiological Institute Pasteur*. **138**:569-578

Bouvet PMJ. y Grimont PAD. (1986). **Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov. *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter lwoffii* sp. nov.** *International Journal System Bacterial*. **36**:228-240

Bouvet PMJ. y Jeanjean S. (1989). **Delineation of new proteolytic genomic species in the genus *Acinetobacter*.** *Resource of Microbiology*. **140**:291-299.

Bryan Arthur H, Bryan Charles A. y Bryan Charles G. (1986). **Bacteriología, principios y prácticas.** 6ª. ed. Ed. CECSA. 86-88 pp.

Bucher F. y R. Hofer. (1993). **Histopathological effects of sublethal exposure to phenol on two variously pre-stressed populations of bullhead (*Cottus gobio* L.).** *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. **51**(2) :309-316.

Buholzer F. (1995). Proc. Br. **Insectic. Fungic.** Conference. **2**:659.

Buikema AL, MK McGinniss y J Cairns JR. (1979). **Phenolics in aquatic ecosystems: a selected review or recent literature.** *Marine Environment and Resources*. **2** :87-121.

Chitra S, Sekaran G, Padmavathi S. y Chandrakasan G. (1995). **Removal of phenolic compounds from wastewater using mutant strain of *Pseudomonas pictorum***. *Journal of General and Applied Microbiology*. **41**:229-237.

Chu YW, Afzal-Shah M, Houang ET, Pelepou MF, Lyon DJ. y Woodford M. (2001). **A novel metallo- β -lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp.** Collected in Honk Kong between 1994-1998. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **45**:710-714.

Clarke PH. y Richmond MH. (1998). **Genetics and Biochemistry of *Pseudomonas* 1**. Ed. Springer. London. 226-232 pg.

CNA, Comisión Nacional del Agua, (2004), **Estadísticas del agua en México**, SEMARNAT-CNA, Sistema Unificado de Información Básica del Agua (SUIBA). pp. 51-68.

Colin R. (1994) **Biochemistry of microbiol degradation**. Kluwer Academic Publishers, U.S.A. 112-119.

D'Adamo PD, Rozich AF. y Gaudy AF Jr. (1984). **Analysis of growth data with inhibitory carbon sources**. *Biotechnology and Bioengineering*. **26**:397-402.

Dagley S. (1978). **Pathway for the utilization of organic growth substrates**. In I.C. Gunsalus (ed), *The Bacteria*, vol. VI Bacterial Diversity Academic Press. New York, N.Y. 305-388

Danes C, Navia MM, Ruiz J, Marco F, Jurado A, Jiménez de Anta MT y Vila J. (2002). **Distribution of beta lactamases in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates and the effect of SYN 2190 (AmpC Inhibitor) in the MICs of different beta-lactam antibiotics**. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **44**:1556-1561

Daniel Catherine, Stéphanie Haentjens, Marie-Christine Bissinger, y René J. Courcol. (1999). **Characterization of the *Acinetobacter baumannii* fur regulator: cloning and sequencing of the fur homolog gene**. *FEMS Microbiology Letters*. **170**:199-209.

Desouky Abd-El-Haleem, Usama Beshay, Abdou O. Abdelhamid, Hassan Moawad y Sahar Zaki. (2003). **Effects of mixed nitrogen sources on biodegradation of phenol by immobilized *Acinetobacter* sp. strain W-17**. *African Journal of Biotechnology*. **2**(1):8-12.

Dipple A. (1996). **Polynuclear aromatic carcinogens**. C.E. Searle edition, ACS Monograph Series 3. American Chemical Society. Washington, D. C. pp. 245-314

Donald HM, Scaife W, Amyes SGB y Young HK. (2000), **Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA β -lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **44**:196-199.

Eckenfelder WW y Ford DL. (1970). **Water pollution control**. Ed. Mc Graw - Hill. México. pp.529-545.

Enrhard HM. y HJ Rehm. (1985). **Phenol degradation by microorganism adsorbed on activated carbon**. *Applied of Microbiology and Biotechnology*. **21**:32-36.

Ehrt S, Schirmer F. y Hillen W. (1995). **Genetic organization, nucleotide sequence and regulation of expression of genes encoding phenol hydroxylase and catechol 1,2-dioxygenase in *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250**. *Molecular Microbiology*. **18**:13-20.

EPA (**Environmental Protection Agency**). (2000). *Toxicological Review Phenol*, CAS No. **108-95-2**. Washington DC. United States.

Falck Schirmer, Sabine Ehrt y Wolfgang Hillen. (1997). **Expression, inducer spectrum, domain structure, and function of MopR, the regulator of phenol degradation in *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250**. *Journal of Bacteriology*. **179**(4):1329-1336.

Filiz B Dilek y Celal F Gökçay. (1996). **Microbiology of actived sludge treating wastewater containing Ni(II) and CR (VI)**. *Water Science Technology*. **34**(5-6):183-191.

Flerov, BA. (1973). **Phenol intoxication in fish**. *Abstract: Chemical Abstracts*. **80**:78848r.

Foster D Snell y Leslie S Ettre. (1990). **Enciclopedia of industrial chemical analysis**, Volume **9**:511-528.

Frostegard, A. (1993). **Phospholipid fatty acid composition, biomass and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals**. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**(11):3605-3617.

García García I, JL Bonilla Venceslada, PR Jiménez Peña y E. Ramos Gómez. (1997). **Biodegradation of phenol compounds in vinasse using *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum***. *Water Research*. **3**(8):2005-2011.

Gerner-Smith P. (1992). **Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex**. *Journal of Clinical Microbiology*. **30**:2680-2685.

Gerner-Smith P, Tjernberg I. y Ursin I. (1991). **Reliability of phenotypic test for identification of *Acinetobacter* species**. *Journal of Clinical Microbiology*. **29**:277-282.

Giono Cerezo Silva. (1993). **Prueba de Bauer-Kirby para sensibilidad a los antimicrobianos**. *Infectología*. **III**(7):325-328.

Godjevargova TZ, Aleksieva D, Ivanova y N. Shivarova. (1998). **Biodegradation of phenol by *Trichosporon cutaneum* cells covalently bound to polyamide granules.** *Process of Biochemistry*. **33**(8):831-835.

Gonzales G, Herrera MG, García MT. y Peña MM. (2001). **Biodegradation of phenol in a continuous process: comparative study of stirred tank and fluidized-bed biorreactors.** *Bioresource Technology*. **76**:425-251.

Guardabassi Luca, Petersen Andreas, Olsen John E. y Dalsgaard A. (1998). **Antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. Isolated from sewers receiving waste from a hospital and a pharmaceutical plant.** *Applied and Environmental Microbiology*. **64**(9):3499-3502

Gurujeyalakshumi G. y Oriel P. (1989). **Isolation of phenol degrading bacillus *Stearothermophilus* and partial characterization of the phenol hydroxylase.** *Applied Environment Microbiology*. **55**:500-502

Häggbloom MM. (1992). **Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds.** *FEMS Microbiology Review*. **103**:29-72.

Häggbloom MM. y Vallo RJ. (1995). **Bioremediation of chlorophenol waste. Microbial transformation and degradation of toxic chemicals.** Young and CE (de). Wiley-Ciss. Inc NewYork. 389-434.

Hannaford AM. y kvek C. (1999). **Aerobic batch degradation of phenol using immobilized *Pseudomonas putida*.** *Acta Microbiologica Polonica*. **44**:285-296.

Hao Oliver J, Kim Michael H, Seagren Eric A. y Kim Hyunook. (2002). **Kinetics of phenol and chlorophenol utilization by *Acinetobacter* species.** *Chemosphere*. **46**:797-807.

Herbert HP Fang, Tong Chen, Yu-You Li. y Ho-Kwong Chui. (1996). **Degradation of phenol in wastewater in an upflow anaerobic sludge blanket reactor.** *Water Research*. **30**(6):1353-1360.

Herbert HP Fang y On-Chim Chan. (1997). **Toxicity of phenol towards anaerobic biogranules.** *Water Research*. **31**(9):2229-2242.

Herbert HP Fang y Zhou G-M. (2002). **Degradation of phenol and p-cresol in reactors.** *Water Science and Technology*. **42**(5-6):237-244.

Hernández PI, Aguilar PJ, López SE y Schifter SI. (2001) **Descomposición de fenol en medio acuoso con peróxido de hidrógeno catalizada por cenizas provenientes de la combustión de carbón mineral.** *Catalizadores y adsorbentes para la protección ambiental*

en la región iberoamericana. Subprograma VI. 2a. Edición. Editorial CYTED, Madrid, España. Págs.153-158.

Hill GA. y Robinson CW. (1995). **Substrate inhibition kinetics: phenol degradation by *Pseudomonas putida*.** *Biotechnology and Bioengineering*. **17**:1599-1615.

Hoh PF. (1999). **Monitoring of an alkaline 2,4,6-TCP-degrading enrichment culture by DNA finger printing methods and isolation of the responsible organism, nocardioides sp. strain M6.** *Applied of Environmental Microbiology*. **63**(1):4145-4149.

Hollender J, Dott W. y Hopp J. (1994). **Regulation of chloro and methylphenol degradation in *Comamonas testosterone* JH5.** *Applied and Environmental Microbiology*. **60**:2330-2338.

Hollender Juliane, Hopp Johanna y Dott Wolfgang. (1997). **Degradation of 4-clorophenol via the meta cleavage pathway by *Comamonas testosterone* JH5.** *Applied and Environmental Microbiology*. **63**(11):4567-4572.

Holt John g., Noel R. Krieg, Peter HA Sneath, James T. Staley y Staley T. Williams. **Bergey's manual of determinative bacteriology.** Ninth edition. Williams & Wlkins Editorial. 1994, Baltimore, USA. 71-94, 151-157.

Holt M., Laine MM. y Kirsten SJ. (1999). **Straw compost and bioremediated soil as inocula for the bioremediation of chorophenol-contaminated soil.** *Applied and Environmental Microbiology*. **62**(5):1507-1513.

Hughes E.J.L. y Bayly RC. (1983). **Control of catechol meta-cleavage pathway in *Alcaligenes eutrophus*.** *Journal Bacteriology*. **154**:1363-1370

Hugges SM. y Cooper DG. (1996). **Biodegradation of phenol using the self-cycling fermentation (SCF) process.** *Biotechnology and Bioengineering*. **51**:112-119.

Ibarra M. y R. Rodríguez. (1993). **Biodegradación de compuestos clorofenólicos por *Pseudomonas* sp. RA2.** *Biotecnología*. Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A. C. **3**(3/4):AM119-AM122.

IPCS (International Programme on chemical safety. (1994). *Environmental Health Criteria* **161**: Phenol. Finland, United States, pág 151-155.

Jianmin D, Guowei G. y Chonghua Z. (1993). **Anaerobic biodegradation of phenol: bacterial acclimation and system performance.** *Water Science Technology*. **28**:17-22.

Joseph V. y A. Joseph. (1999). **Acclimation of algal species following exposure to phenol.** *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. **62**:87-92.

Juni E. (1994). **Interspecies transformation of Acinetobacter: Genetic evidence for a ubiquitous genus.** *Journal of Bacteriology*. **112**:917-931.

Kevin Towner. (2006). **Prokaryotes.** Chapter The genus *Acinetobacter*. **6**:746-758.

Keweloh H, J. Heipierper y HJ Rehm. (1989). **Protection of bacteria against toxicity of phenol by immobilization in calcium alginate.** *Applied of microbiology and Biotechnology*. **31**:383-385.

Kim, M.H. y Hao, O.J., (1999). **Cometabolic degradation of chlorophenols by Acinetobacter species.** *Water Reserch*. **33**:562-574.

Kirkt T. Semple and Ronald B. Cain. (1996). **Biodegradation of phenols by the alga Ochromonas danica.** *Applied and Environmental Microbiology*. **62**(4):1265-1273.

Knoll G. y J. Winter. (1989). **Degradation of phenol via carboxylation to benzoate by a defined, obligate syntrophic consortium of anaerobic bacteria.** *Applied of Microbiology and Biotechnology*. **30**:318-324.

Kobayashi T, Hasinaga T, Mikami E. y Suzuki T. (1989). **Methanogenic degradation of phenol and benzoate in acclimated sludges.** *Water Science and Technology*. **21**(4/5):55-56

Koh Sung-Cheol, McCullar Michael V. y Focht Dennis D. (1997). **Biodegradation of 2,4-Dichlorophenol through a distal meta-fission pathway.** *Applied and Environmental Microbiology*. **63**(5):2054-2057.

Kondrateva, L., Keretnikova, E. y Rapoport, V. (2001). **Degradation of phenol compounds by microbial communities of the Amur stuary.** *Journal Marine Biology*. **6**(27):353-361.

Kopperman HL, RM. Carlson y R. Caple. (1974). **Aqueous chlorination and ozonation studies. Structure-toxicity correlations of phenolic compounds to Daphnia magna.** *Chemico-Biological Interactions*. **9**:213-225.

Kumaran, P. y Paruchi, L. (1997). **Kinetics of phenol biotransformation.** *Water Reerch*. **31**:11-22.

Leahy JC. y Colwell RR. (1990). **Microbial degradation of hydrocarbons in the environment.** *Microbiological Review*. **54**:305-315.

- Li J-K, Humphrey AE. (1989). **Kinetics and fluorometric behavior of a phenol fermentation.** *Biotechnology Letters*. **11**:177-182.
- Lin JH. Wang y R. Hickey. (1990). **Degradation kinetics of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*.** *Biotechnology and Bioengineering*. **35**:1125-1139.
- Lin SH. y Chuang TS. (1994). **Combined treatment of phenolic wastewater by wet air oxidation and activated sludge.** *Technology Environmental Chemistry*. **44**:243-258.
- Madigan, M., Martinko, J. y Parker, J. (2003). **Biología de los microorganismos.** 10a. edición. Editorial Prentice Hall. Madrid-España. 130-140; 151, 630-657.
- Magnet S, Courvalin P. y Lambert T. (2001). **Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454.** *Antimicrobiological Agents and Chemotherapy*. **45**:3375-3380.
- Martínez L, Ramos-Comenzana A, García MP y Garrido SE. (1992). **Biodegradation of phenolic compounds in olive mill waste water by *Aspergillus terreus*.** *Grasas y Aceites*. **43**:75-81.
- Mc Faddin Jean F. (1993). **Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica.** ed. Médica Panamericana. 35-49 pp.
- Méndez L, V. Miyashiro, R. Rojas, M. Cotrado y N. Carrasco. (2004). **Treatment of residual waters by means of activated muds.** *Revista del Instituto de Investigaciones de la Facultad de ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y geográfica*. **7**(14):74-83.
- Monod J. (1949). **The growth of bacterial cultures.** *Annual Review of Microbiology*. **3**:371-393.
- Monteiro Álvaro AMG, Rui AR Boaventura y Alírio E. Rodrigues. (2000). **Phenol biodegradation by *Pseudomonas putida* DSM 548 in a batch reactor.** *Biochemical Engineering Journal*. **6**:45-49.
- Monroy O, Fama G, Meraz M, Montoya L. y Macarie H. (2000). **Anaerobic digestion for wastewater treatment in México: state of the technology.** *Water Research*, **34** (6): 1803-1816.
- Mörsen A. y Rehm H-J. (1987). **Degradation of phenol by a mixed culture of *Pseudomonas* and *Cryptococcus elinovii* adsorbed on activated carbon.** *Applied of Microbiological and Biotechnology*. **26**:283-284.

Mörsen. y Rehm HJ. (1987). **Degradation Pseudomonas and Cryptococcus adsorbed on activated carbon.** *Applied of Microbiology and Biotechnology*. **26**:283-288.

Mörsen A. y Rehm H-J. (1990). **Degradation of phenol by a defined mixed culture immobilized by adsorption on activated carbon and sintered glass.** *Applied of Microbiological and Biotechnology*. **33**:206-212

Mulugeta Kibret, Walter Somitsch y Karl-Heinz Robra. (2000). **Characterization of a phenol degrading mixed population by enzyme assay.** *Water Research*. **34**(4):1127-1134

Murcia. (2007). **Riesgo químico, accidentes graves, fenol.** Murcia, España. 101-105.

Nannipieri P. and Bollag JM. (1991). **Use of enzymes to detoxify pesticide-contaminated soils and waters.** *Journal of Environmental Quality*. **20**:510-517.

NAS, National Academy of Sciences. (1993). **Polycyclic aromatic hydrocarbons: evaluation of sources and effects.** National Academy Press, Washington, D.C. pp.28-36.

Navia MM, Ruíz J. y Vila J. (2002). **Characterization of an integron carrying a new class D-lactamase (OXA-37) in Acinetobacter baumannii.** *Microbiological of Drug Resistance*. **44**:428-432.

NCCLS, National Committee for clinical laboratory standars. (1993). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.** Approved Standard M7-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Villanova, Pa.

Neujahr H. y Gaal A. (1999). **Phenol hydroxylase from yeast: purification and properties of the enzyme from Trichosporon cutaneum.** *European Journal of Biochemistry*. **35**:386-400.

Neuhauser, E.F., P.R. Durkin, M.R. Malecki y M. Anatra. (1986). **Comparative toxicity of ten organic chemicals to four earthworm species.** *Comparative Biochemistry Physiology*. **83C**:197-200.

Neuhauser, E.F. y C.A. Callahan. (1990). **Growth and reproduction of the earthworm Eisenia fetida exposed to sublethal concentrations of organic chemicals.** *Soil Biology and Biochemistry*. **22**:175-179

Ng LC, Poh CL. y Shingler. (1995). **Aromatic effector activation of the NtrC-like transcriptional regulator PhhR limits the catabolic potential of the (methyl)phenol degradative pathway it controls.** *Journal of Bacteriology*. **175**:1485-1490.

NMX-AA-050-SCFI-2001. **Análisis de agua - determinación de fenoles totales en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas - método de prueba.**

Nybroe N, Jorgensen PE. y Henze M. (1992). **Enzymatic activities in wastewater and activated sludge.** *Water Research.* **26**:579-584.

Oh Y-S, Sharcefdeen Z, Baltzis BC. y Bartha R. (1994). **Interactions between benzene, toluene, and p-xylene (BTX) during their biodegradation.** *Biotechnology and Bioengineering.* **44**:453-458.

Olsson-Liljequist BP, Lasrson M. Walder. y H. Miörner. (1997). **Methodology for susceptibility testing.** *Scand. Journal of Infectology Disease.* **105**:13-23.

Pawlowsky U. y Howell JA. (1993). **Mixed culture biooxidation of phenol. I. Determination of kinetics parameters.** *Biotechnology and Bioengineering.* **15**:889-896.

Poole K. (2001). **Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa and related organisms.** *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology.* **3**:255-264.

Ramvalho RS (1993) **Tratamiento de aguas residuales.** Ed. Reverte. México. pp. 321-235.

Rahalkar SB, Joshi SR. y Shivraman N. (1993). **Photometabolism of aromatic compounds by Rhodopseudomonas palustris.** *Current Microbiology.* **26**:1-9.

Rajendran, N. (1994). **Characterization of microbial community structure in the surface sediment of Osaka Bay, Japan by phospholipids fatty acid analysis.** *Applied and Environmental Microbiology.* **60**(1):428-294.

Razo, D. (2003). **Biorremediación de suelos contaminados con fenol.** Tesis de Licenciatura en Químico Farmacobiología. Universidad de las Américas de Puebla. Facultad de Ciencias Básicas. Departamento de Química y Biología. Puebla, México.

Ribera A, Ruíz J, Jiménez de Anta, M. T. y Vila, J. (2002). **Effect of an efflux pump inhibitor on the MIC of nalidixic acid for Acinetobacter baumannii and Stenotrophomonas maltophilia clinical isolates.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* **49**:471-1.

Richards SR, Hastwell C. y Davies M. (1994). **The comparative examination of 14 activated sludge plants using enzymatic techniques.** *Water Pollution Control.* **38**:300-313.

Riccio ML, Franceschini N Boschi, L Carravelli B, Cornaglia G. y Fontana R. (2000). **Characterization of the metallo- β -lactamase determinant of Acinetobacter baumannii AC-**

54/97 reveals the existence of blaIMP allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. collected in Honk Kong between 1994-1998. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **44**:1229-1235.

Rochkind-Dubinsky ML, Saylor GS. y Blackburn JW. (1987). **Microbiological decomposition of chlorinated aromatic compounds.** *Applied environmental microbiology*. **55**:2648-2652.

Rodríguez, A. y Tores, C. (2001). **Evaluación de la capacidad degradadora de fenol por *Pseudomonas fluorescens* P4 inmovilizada en soportes orgánicos para el desarrollo posterior de un sistema bioanalítico.** Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Departamento de Microbiología. Bogotá, Colombia.

Romano, I. (2000). **Lipid profile: a useful chemotaxonomy marker for classification of a new cyanobacterium in *Spirulina* genus.** *Phytochemistry*. **54**:289-294.

Saez P. (1992). **Biodegradación anaeróbica de fenol y 4-clorofenol por una especie de *Pseudomonas*.** XXIII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. La Habana Cuba. pp. 187-196.

Saéz P. y B. Rittmann. (1991). **Biodegradation kinetics of 4-chlorophenol, and inhibitory co-metabolic.** *Resource Journal Water Pollution Control Federal*. **63**(6):838-847.

Saéz PB. y Rittmann BE. (1993). **Biodegradation kinetics of a mixture containing a primary substrate (phenol) and na inhibitory co-metabolite (4-chlorophenol).** *Biodegradation*. **4**:3-21.

Saharsbudhe SR. y Modi VV. (1987). **Degradation of Chlorinates aromatic compounds.** *Microbiological Sciences*. **4**:300-303.

Sasser. (1990). **Identification of bacteria by gas chromatography or cellular fatty acids.** Technical note # 101. MIDI, 115 Barksdle Prof. Center, Nework, Del. 19711.

Sato Zhang and Nakae Kavamura. (2002). **A novel class D β -lactamase (OXA-24) with carbapemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain.** *Antimicrobial Agents Chemother*.**44**:1556-1561.

Scheiner, S. y Gurevitch, J. (2001). **Desing and analysis of ecological experiments.** 2nd Edition. Oxford University Press Editorial. England. 415-420.

Schirmer Falck, Ehrt Sabine y Hillen Wolfgang. (1997). **Expression, inducer spectrum, domain structure, and function of MopR, the regulator of phenol degradation in *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250.** *Journal of Bacteriology*. **179**(4):1329-1336.

- Schmidt E. (1987). **Response of a chlorophenols degrading mixed culture to charging loads of phenols, chlorophenol and cresol.** *Applied of Microbiology and Biotechnology*. **27**:94-99.
- Schultz W. y JN Dumont. (1977). **Cytotoxicity of synthetic fuel products on *Tetrahymena pyriformis*. I. Phenol.** *Journal of Protozoology*. **24**(1):164-172.
- Sembiring T. y J. Winter. (1989). **Anaerobic degradation of o-phenylphenol by mixed and pure cultures.** *Applied of Microbiology and Biotechnology*. **30**:246-432.
- Shiosaki, K.R (2001). **Biochemical markers in taxonomy of the genus *Cunninghamella*.** *Revista Iberoamericana d Micología*. **18**:123-127.
- Sims P. (1990). **The metabolic activation of chemical carcinogens.** *British Medical Bulletin*. **36**:11-18.
- Singleton I. (1994). **Microbial metabolism of xenobiotics: fundamental and applies research.** *Journal of Chemistry Technology and Biotechnology*. **59**:9-23.
- Smith AW, Freeman S, Minett WG. y Lambert, PA. (1999). **Characterization of a siderophore from *Acinetobacter calcoaceticus*.** *FEMS Microbiology Letters*. **70**:29-32
- Stanley Raphael S. (!993). **Lynch's Medical Laboratory Technology.** Ed. W.B. Saunders. USA. Pp.434-440
- Stephen Boyd A, Shelton Daniel R, Berry Duane. y Tiedje James. (1983). **Anaerobic biodegradation of phenolic compounds in digested sludge.** *Applied and Environmental Microbiology*. **46**(1):50-54
- Sylvia, D. (2005). **Principles and applications of soil microbiology.** Prentice Hall. Nex Jersey, United States. 640-649.
- Tiedje James M. (2000). **Anaerobic degradation of phenol and related aromatics.** *Linköping Studies in Arts and Science*. **212**(1):728-733
- Tisler, T. y Konca, J. (1995). **Relative sensivity of some selected aquatic organisms to phenol.** *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. **54**:717-723.
- Tjernberg I. y Ursin J. (1989). **Clinical strain of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridation.** *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*. **97**:595-605.

Torres Bustillos Luis Gilberto. (1994). **Eliminación de fenoles y clorofenoles en agua por medio de microorganismos inmovilizados.** *Instituto de Ingeniería Ambiental. UNAM*, 4(2):49-65.

Torres Alvarado Rocío y Calva B. Laura Georgina. (2002). **Compuestos fenólicos: origen, distribución y efectos en los ecosistemas marinos.** *Contactos*, 44: 31-43.

Towner KJ. (1997). **Clinical importance and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp.** *Journal Medical Microbiology*. 46:721-746.

Tsutsui, T., N. Hayashi, H. Maizumi, J. Huff y Barbett, JC. (1997). **Benzene, catechol, hydroquinone and phenolinduced cell transformation, gene mutations, chromosome aberrations, aneuploidy, sister chromatid exchanges and unscheduled DNA synthesis in Syrian Hamster embryo cell.** *Mutation Research*, 373:113-123.

Vila Jordi. (1998). **Mechanisms of antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*.** *Review Medical of Microbiology*. 9:87-97.

Vila Jordi y Marco Francesc. (2002). **Lectura interpretada del antibiograma de bacilos Gramnegativos no fermentadores.** *Enfermed Infections and Microbiology Clinical*. 20(6):304-312.

Vila J, Ribera A, Marco F, Ruiz J, Mensa J, Chávez J, Hernández G, y Jiménez de Anta MT. (2002). **Activity of clinafloxacin, compared with six other quinolones, against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates.** *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 49:471-477.

Wang K-W, Baltzis BC. y Lewandowski GA. (1996). **Kinetics of phenol biodegradation in the presence of glucose.** *Biotechnology and Bioengineering*. 51:87-94

Wang Si-Jing y Loh Kai-Chee. (1999). **Modelling the role of metabolic intermediates in kinetics of phenol biodegradation.** *Enzyme and Microbial Technology*. 25:177-184

Werstmeier F. y Rehm HJ. (1985). **Biodegradation of 4-chlorophenol by entrapped *Alcaligenes* sp. A7-2.** *Applied of Microbiology and Biotechnology*. 22:301-305.

Werstmeier F. y Rehm HJ. (1987). **Degradation of 4-chlorophenol in municipal wastewater by adsorptive immobilized *Alcaligenes* sp. A7-2.** *Applied of Microbiology and Biotechnology*. 26:78-83.

Wiley John & Sons. (1986). **Encyclopedia of chemical Technology**, Kirk-Othmer, Fifth Edition. Editorial VCH. Germany. Volume 7:1-8.

Wiley John y Sons. (1993). **Encyclopedia of chemical Technology**, Kirk-Othmer, Fourth Edition. Editorial VCH. USA. Volume 6:156-166.

www.Biomath.jussieu.fr. **The International Development Research Care**. Alfredo Fonseca. 28 de Enero. 2008

www.fenoquímica.com.mx **Departamento de control ambiental, seguridad e higiene**, acuerdo NOM-018-STPS-2000, 25 de enero de 2001.

www.insht.es N° CAS. **106-48-9. International Chemical Safety Cards (WHO/IPCS/ILO) Fichas Internacionales de Seguridad Química. 4 CP**, ICSC: 0850, 28 de Diciembre de 2007.

www.insht.es N° CAS **120-83-2 International Chemical Safety Cards (WHO/IPCS/ILO) Fichas Internacionales de Seguridad Química. 2,4-DCP**, ICSC: 0438, 28 de Diciembre de 2007.

www.insht.es N° CAS **95-95-4. International Chemical Safety Cards (WHO/IPCS/ILO) Fichas Internacionales de Seguridad Química. 2,4,6-TCP**, ICSC: 0879, 28 de Diciembre de 2007.

www.seimc.org **Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Química. Procedimientos en Microbiología Clínica: Procedimientos Básicos para el Estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos**. José A. García Rodríguez. 15 de Marzo de 2000.

www.segulab.com N° CAS **108-95-2. International Chemical Safety Cards (WHO/IPCS/ILO) Fichas Internacionales de Seguridad Química. Fenol**, ICSC: 0070, 28 de Diciembre de 2007.

www.segulab.com N° CAS **95-57-8. International Chemical Safety Cards (WHO/IPCS/ILO) Fichas Internacionales de Seguridad Química. Clorofenol**, ICSC: 0849, 28 de Diciembre de 2007.

Yang RD. y Humphrey AE. (1995). **Dynamic and steady state studies of phenol biodegradation in pure and mixed cultures**. *Biotechnology and Bioengineering*. **17**:1211-1235

Young L. y Rivera MD. (1985). **Methanogenic degradation of four phenolic compounds**. *Water Research*. **19**:1325-1337.

Yupanqui V. (2001) **Exposición en el curso de Gestión efluentes de líquidos en la Universidad Nacional Agraria**. La Molina. Lima.

Zache G. y HJ. Rehm. (1989). **Degradation of phenol by coimmobilized entrapped mixed culture.** *Applied of Microbiology and Biotechnology*. **30**:426-432.

Zilli M, Converti A, Iodi A, del Borghi M. y Ferracolo G. (1993). **Phenol removal from waste gases with a biological filter by *Pseudomonas putida*.** *Biotechnology and Bioengineering*. **41**:693-699.

Zuniga Martha C, Durham Don R, y Rod A. Welch. (1981). **Plasmid-and Chromosome-Mediated Dissimilation of Naphthalene and Salicylate in *Pseudomonas putida* PMD-1.** *Journal of Bacteriology*. **147**(3):836-843.

7. ANEXOS.

En este capítulo se detallan los diferentes medios de cultivo, tanto para el aislamiento como para los ensayos de degradación de los diferentes tipos de xenobióticos, así como las técnicas utilizadas en el desarrollo de la tesis, entre las técnicas estudiadas están la identificación morfológica (Tinción de Gram) y las diferentes pruebas bioquímicas como la catalasa, oxidasa, oxido fermentación de glucosa entre otras.

Para el análisis de las degradaciones de fenol, se presentan las curvas estándares en donde se obtuvo una $Y = 0.1846x + 0.1192$ con una $R^2 = 0.99$ para el método fotométrico directo y para el análisis por cromatografía de gases se obtuvo una $Y = 1083.8x - 4765$ con una $R^2 = 0.99$ para las concentraciones altas de fenol y una $Y = 198.84x - 14343$ con una $R^2 = 0.99$ para las concentraciones bajas de fenol

A.7.1 Medios de cultivo para el aislamiento bacteriano.

A.7.1.1 Medio Luria Bertani sólido y líquido (LB).

Componentes del medio	
Bacto triptona o Triptona de caseína.	10 g.
Extracto de Levadura.	5 g.
Cloruro de Sodio (NaCl_2).	10 g.
Agar Bacteriológico.	12 g.
Agua Destilada.	1 L.

Desarrollo:

1. Disolver bien todos los reactivos y esterilizar por 20 minutos a 191 grados centígrados.

2. Llenar las cajas petri con 25 mL del medio y guardar en refrigeración hasta su utilización.

Para el medio líquido se utilizan los componentes arriba mencionados exceptuando el agar bacteriológico y sin esterilizar el medio. Se toma 9 mL del medio y se adicionan a tubos de ensaye para cultivo. Finalmente se esteriliza a 121 grados centígrados por 20 minutos.

A.7.1.2 Medio Mineral Sólido y Líquido.

El medio mineral está compuesto por cuatro componentes, los cuales formaran soluciones stock. A continuación se detalla la composición de cada uno de los componentes:

Componentes del medio							
Componente 1.		Componente 2.		Componente 3.		Componente 4.	
MnCl ₂	40 mg	(NH ₄) ₂ SO ₄	2g	FeSO ₄	2.5mg/100mL	CaCl ₂	0.13g / L
H ₃ BO ₃	13.2 mg	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2g	Tomar			
ZnSO ₄	60 mg	H ₂ O	950 mL	3.125mL	en 50 mL		

Desarrollo:

1. Disolver cada componente por separado y esterilizar a 121 grados centígrados a 1 atmósfera de presión por 15 minutos.
2. Una vez estériles los componentes, se adicionará el volumen respectivo según se muestra en la tabla para llevarlo a un volumen final de 1 litro.

Tomar de cada componente:	
Componente 1.	25 mL
Componente 2.	950 mL
Componente 3.	5 mL
Componente 4.	20 mL
Fenol a la concentración deseada	

3. Se adicionan a las cajas 25 mL del medio aproximadamente y se guardan en refrigeración a una temperatura de 4 grados centígrados hasta su utilización.

Para el medio mineral líquido se realiza el mismo procedimiento anteriormente descrito sin esterilizar y eliminando el agar bacteriológico. Se toman 9 mL del medio y se adicionan a tubos de ensaye para cultivo. Se esteriliza durante 15 minutos a 121 grados centígrados, posteriormente se almacenan en refrigeración a una temperatura de 4 grados centígrados hasta su posterior utilización.

A.7.2 Morfología bacteriana

A.7.2.1 Técnica de tinción de Gram

A. Preparación de los colorantes.

1. Cristal violeta:
 - a. Solución A: Disolver 1 g de cristal violeta en 10 mL de alcohol etílico
 - b. Solución B: Disolver 0.4 g de oxalato de amonio en 40 mL de agua destilada
 - c. Mezclar la solución A y B y guardar en la oscuridad durante 24 horas. Filtrar con papel Whatman No. 42
2. Solución de lugol: en un matraz aforado de 50 ml colocar 20 ml de agua destilada y disolver primero 0.2 g de yoduro de potasio, posteriormente disolver en la misma solución 0.1 g de yodo, agitar vigorosamente con un agitador magnético y tapado para evitar respirar lo vapores que emanen. Aforar con agua destilada.
3. Decolorantes: colocar en una probeta de 50 mL, 30 mL de alcohol etílico y 20 mL de acetona. Poner esta solución en una piseta (puede ser solamente alcohol etílico),
4. Safranina: en 5 mL de alcohol etílico disolver 0.125 g de safranina, aforar a 50 mL con agua destilada
5. Azul de metileno: Disolver 0.25 g de azul de metileno en 50 mL de agua destilada.

B. Preparación del frotis:

1. Esterilizar con el mechero el asa bacteriológica hasta el rojo vivo.
2. Enfriar el asa atrás del mechero y tomar una muestra del cultivo bajo condiciones estériles.
3. Colocar en el centro del portaobjetos una gota de agua destilada estéril y la muestra del cultivo
4. Fijar suavemente la muestra con calor (no dejar la muestra sobre la flama por tiempos prolongados, de lo contrario, los microorganismos se deforman).

C. Coloración:

1. Cubrir el frotis con dos gotas de solución de cristal violeta. Esperar un minuto.
2. Lavar con agua destilada el exceso de colorante.
3. Cubrir el frotis con dos gotas de solución de lugol y esperar un minuto.
4. Lavar nuevamente con agua destilada.
5. Lavar con el decolorante hasta que ya no fluya más tintura.
6. Lavar con agua nuevamente.
7. Aplicar al frotis dos gotas de solución de safranina y esperar 30 segundos.
8. Lavar con agua y dejar secar la preparación al aire.
9. Observar al microscopio haciendo previamente la iluminación de Köhler con el objetivo de 10x y observar las muestras con el objetivo de inmersión (100x).

Nota: Lavar perfectamente entre cada aplicación de colorantes, para evitar contaminación en la muestra

D. Interpretación:

- Las bacterias Gram positivas se tiñen de azul a violeta.
- Las bacterias Gram negativas presentan coloración rojiza.

A.7.3 Pruebas bioquímicas.

A.7.3.1 Agar hierro Kliger (AHK).

Componentes del medio			
Extracto de Carne.	3 g	Sulfato de Ferroso.	0.2 g
Extracto de levadura.	3 g	Cloruro de Sodio.	5 g
Peptona de Caseína.	15 g	Tiosulfato de Sodio.	0.3 g
Proteasa peptona.	5 g	Rojo de Fenol como Indicador.	0.024 g
Lactosa.	10 g	Agar Bacteriológico.	12 g
Dextrosa.	1 g	Agua Destilada.	1000 mL
Sulfato de Ferroso.	0.2 g	PH del Medio.	7.4

Desarrollo:

1. Disolver perfectamente los componentes del medio y distribuir en tubos de cultivo, aproximadamente 5 mL del medio en cada tubo, esterilizar durante 15 minutos a 121 grados centígrados.
2. Enfriar en posición vertical (pico de flauta) con una capa basal profunda.

A.7.3.2 Prueba de la enzima oxidasa.

Para determinar la presencia de enzimas oxidasas.

A. Reactivos y desarrollo:

1. Reactivo de Kovacz: Diclorohidrato de tetrametil-*p*-fenilendiamina al 1%.
2. Adicionar directamente 2 o 3 gotas del reactivo a las colonias bacterianas que se desarrollan en un medio en placa.
3. No inundar toda la placa con el reactivo
4. No invertir la placa
5. Observar cambios de color de 5 a 10 segundos

B. Interpretación:

- Colonias oxidasa positiva toman un color negro purpúreo en 10 segundos.

- Desarrollo tardío del color después de 60 segundos indica una prueba oxidasa negativa.

A.7.3.3 Prueba de la enzima catalasa.

Prueba de comprobación de la presencia de la enzima catalasa.

A. Reactivos y desarrollo:

1. Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) al 30%.
2. Con un asa bacteriológica recoger el centro de una colonia pura de 18 a 24 horas de incubación y colocarla en un portaobjeto.
3. Agregar una gota de H_2O_2
4. Observar la inmediata formación de burbujas (liberación de gas).

B. Interpretación:

- Prueba positiva: formación inmediata de burbujas bien visibles (formación de O_2).
- Prueba negativa: No hay formación de burbujas.

A.7.3.4 Oxido fermentación de glucosa.

Prueba para determinar el metabolismo oxidativo o fermentativo de un hidrato de carbono.

A. Reactivos:

Medio básico de Hught y Leifson a pH de 7.1	
Peptona	2 g
Cloruro de Sodio (NaCl).	5 g
Fosfato de Potasio (K_2HPO_4)	0.3 g
Agar bacteriológico.	3 g
Azul de Bromotimol.	0.03-0.08 g
Agua Destilada.	1000 mL

B. Desarrollo:

1. Se esteriliza el medio durante 15 minutos a 121 grados centígrados, y se deja enfriar en posición vertical.

2. Se realizan inoculaciones de pruebas estándar en dos tubos.
3. Se realiza el crecimiento de cultivos puros de 18 a 24 horas en AHK.
4. Se toma una aguja para inoculación y se pican ambos tubos aproximadamente hasta 0.6 mm del fondo.
5. Se cubren los tubos con 1 a 2 mL de vaselina o parafina fundida y estéril para excluir el oxígeno.
6. Se incuba a 35 grados centígrados por 48 horas.

C. Interpretación:

- Se registra la producción de gas y/o ácido así como la reacción de movilidad.

A.7.3.5 Indol

Prueba para determinar la capacidad de un organismo para desdoblar el indol de la molécula de triptofano.

A. Reactivos:

1. Preparación de medio básico con peptona, cloruro de sodio y triptofano.
2. Incubar a 35 grados centígrados por 24 horas.
3. Agregar reactivo de Kovaks o de Ehrlich.

B. Interpretación:

- Prueba positiva: un anillo rojo en la superficie del medio en la capa alcohólica.
- Prueba negativa: no se produce color en la capa alcohólica, toma color del reactivo de Erlich (amarillo).
- Variable ($\pm$): un color anaranjado en la superficie del medio.

A.7.3.6 Movilidad.

Prueba para determinar si un organismo es móvil o inmóvil y si las bacterias presentan movilidad por medio de flagelos.

A. Reactivos:

	10g
Tryptona.	
Cloruro de sodio.	5g
Agar-Agar.	5g
Agua Destilada.	1 L
Tiempo de Esterilización a 121 °C.	15 min

➤ Adicionar 5 ml por tubo y enfriar en posición vertical

B. Desarrollo:

1. Con una aguja de inoculación (sin asa), tomar una muestra de la colonia a estudiar.
2. Introducirla en el centro del tubo en forma vertical y sacándola de la misma manera.
3. Inocular el medio a 35 grados centígrados por 24 horas.

C. Interpretación:

- Prueba positiva: los organismos móviles migran de la línea de siembra y se difunden en el medio, provocando turbidez, puede mostrar crecimiento en forma de estrías venosas.
- Prueba negativa: el crecimiento bacteriano acentuado sigue la línea de siembra, el medio se mantiene claro, indicando que no hay movilidad bacteriana.
- El medio control (no inoculado) no presenta crecimiento, y se mantiene claro.

A.7. 4 Medios para el análisis del crecimiento y degradación bacteriana.

Los medios de sales minerales líquidos (A 7.1.2) suplementados con diversas fuentes de carbono a diferentes concentraciones (todo en condiciones de esterilidad) se muestran a continuación:

Fuente de Carbono	Concentración en mg / L
Fenol.	50, 100, 150, 200, 250, 300, 500, 550, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000 y 2250.
4-Clorofenol.	50, 100 y 200.
2,4-Diclorofenol.	50, 100 y 200.
2,4,6-Tetraclorofenol.	50, 100 y 200.
Pentaclorofenol.	50, 100 y 200.

A.7.5 Curvas estándares para la degradación bacteriana.

A.7.5.1 Curva estándares para la determinación de fenol por el método fotométrico directo.

CURVA DE LA DETERMINACIÓN DE FENOL.						
Concentración [mg·L ⁻¹]	Agua (ml)	Fenol (μl)	NH ₄ OH (μl)		4-amino antipirina (μl)	K ₃ Fe(CN) ₆ (μl)
0.0	10	0	250		100	100
0.1	9.998	2	250	Ajustar	100	100
0.2	9.996	4	250	pH	100	100
0.3	9.994	6	250	7.9	100	100
0.4	9.992	8	250	± 0.1	100	100
0.5	9.990	10	250		100	100
7.5	9.985	15	250		100	100
10	9.980	20	250		100	100

1. Los componentes se adicionan en orden de izquierda a derecha.
2. Se incuban por un tiempo de 15 minutos a temperatura ambiente y se leen a una λ de 500 nm

➤ Nota: para ajustar el pH a 7.9 se utiliza un buffer de fosfatos a pH de 6.8

A.7.5.2. Curva estándares para la determinación de fenol cromatografía de gases

Para la curva estándar se llevó a cabo en medios líquidos de sales minerales con fenol a concentraciones de 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 400, 500, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 y 2000 mg·L⁻¹. En la tabla 12 se muestran los valores de la recta, así como de los valores del coeficiente de determinación de cada una de las curvas estándares, tanto del fenol, como de los compuestos 2,4-Diclorofenol y 2,4,6-Triclorofenol por cromatografía de gases a las diferentes concentraciones ensayadas.

Tabla 12. Ecuación de la recta y coeficiente de determinación de las curvas estándares de fenol, 2,4-Diclorofenol y 2,4,6-Triclorofenol por cromatografía de gases.

Concentración del compuesto	Ecuación de la recta $Y = mx + b$	Coeficiente de Determinación R^2
Fenol a [0 a 50 mg·L ⁻¹]	1083.8x-4765	0.99
Fenol a [100 a 2000 mg·L ⁻¹]	198.84x-14343	0.99
2,4-DCP a [0 a 50 mg·L ⁻¹]	1673.6x+2900.6	0.99
2,4,6-TCP a [0 a 50 mg·L ⁻¹]	380.1x-51.867	0.99

A.7.6 Análisis completo del perfil de ácidos grasos de las cepas aisladas en cultivos axénicos

Sherlock Version: 2.98

DATA:C98C16503A

17-DEC-98 01:00:38

ID: 4180 UN-ORSTOM-12 (78 PSF, 1 RR)
Bottle: 40 SAMPLE [TSBA40]

Date of run: 17-DEC-98 00:35:54

RT	Area	Ar/Ht	Respon	ECL	Name	%	Comment 1	Comment 2
1.714	353880250	0.028	. . .	7.007	SOLVENT PEAK	. . .	< min rt	
2.712	906	0.023	. . .	8.939		. . .	< min rt	
3.212	187	0.024	. . .	9.908		. . .		
3.260	559	0.024	1.181	10.000	10:0	0.27	ECL deviates -0.000	Reference -0.001
3.912	1335	0.029	1.121	10.918	Sum In Feature 2 . .	0.62	ECL deviates 0.004	12:0 ALDE ?
3.970	615	0.028	1.116	11.000	11:0	0.29	ECL deviates 0.000	Reference -0.000
4.906	14234	0.032	1.064	12.000	12:0	6.29	ECL deviates 0.000	Reference -0.000
5.473	1256	0.032	1.042	12.486	unknown 12.484 . . .	0.54	ECL deviates 0.002	
6.072	574	0.032	1.022	13.000	13:0	0.24	ECL deviates -0.000	Reference -0.001
6.320	5988	0.035	1.016	13.179	12:0 2OH	2.53	ECL deviates 0.002	
6.703	9916	0.035	1.007	13.456	12:0 3OH	4.15	ECL deviates 0.002	
7.454	1499	0.043	0.990	13.999	14:0	0.62	ECL deviates -0.001	Reference -0.002
8.189	1566	0.047	0.978	14.473	Sum In Feature 1 . .	0.64	ECL deviates 0.003	13:0 3OH/15:1 i I/H
9.007	3872	0.041	0.966	15.001	15:0	1.55	ECL deviates 0.001	Reference -0.000
9.825	5495	0.043	0.956	15.489	Sum In Feature 2 . .	2.18	ECL deviates 0.001	14:0 3OH/16:1 ISO I
9.926	394	0.033	0.955	15.550	16:0 N alcohol . . .	0.16	ECL deviates 0.000	
10.378	51627	0.044	0.950	15.820	Sum In Feature 3 . .	20.37	ECL deviates -0.002	16:1 w7c/15 iso 2OH
10.680	45161	0.043	0.947	16.000	16:0	17.76	ECL deviates 0.000	Reference -0.001
12.058	11138	0.047	0.935	16.794	17:1 w8c	4.33	ECL deviates 0.002	
12.417	6976	0.045	0.932	17.001	17:0	2.70	ECL deviates 0.001	Reference -0.001
13.061	428	0.036	. . .	17.366		. . .		
13.779	79754	0.047	0.923	17.773	18:1 w9c	30.55	ECL deviates 0.004	
13.871	9398	0.047	0.922	17.825	18:1 w7c	3.60	ECL deviates 0.002	
14.179	1620	0.045	0.920	17.999	18:0	0.62	ECL deviates -0.001	Reference -0.003
*****	1566	. . .	. . .	. . .	SUMMED FEATURE 1 . .	0.64	15:1 ISO H/13:0 3OH	13:0 3OH/15:1 i I/H
*****	. . .	. . .	. . .	. . .		. . .	15:1 ISO I/13:0 3OH	
*****	6829	. . .	. . .	. . .	SUMMED FEATURE 2 . .	2.80	12:0 ALDE ?	unknown 10.928
*****	. . .	. . .	. . .	. . .		. . .	16:1 ISO I/14:0 3OH	14:0 3OH/16:1 ISO I
*****	51627	. . .	. . .	. . .	SUMMED FEATURE 3 . .	20.37	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO 2OH/16:1w7c

Solvent Ar	Total Area	Named Area	% Named	Total Amnt	Nbr Ref	ECL Deviation	Ref ECL Shift
353880250	253592	252977	99.76	240815	9	0.002	0.001

TSBA40 [Rev 4.0] Acinetobacter 0.587
A. calcoaceticus 0.587
A. baumannii 0.326

Sherlock Version: 2.98

DATA:C98C16503A

17-DEC-98 01:25:28

ID: 4181 UN-ORSTOM-12 (79 PSF. 2 RR
Bottle: 41 SAMPLE [TSBA40]

Date of run: 17-DEC-98 01:00:42

RT	Area	Ar/Ht	Respon	ECL	Name	%	Comment 1	Comment 2
1.714	351244563	0.028	. . .	7.004	SOLVENT PEAK	. . .	< min rt	
2.712	813	0.023	. . .	8.936		. . .	< min rt	
3.262	788	0.029	1.181	10.000	10:0	0.35	ECL deviates 0.000	Reference 0.002
3.912	1131	0.027	1.121	10.917	Sum In Feature 2 . .	0.47	ECL deviates 0.003	12:0 ALDE ?
3.972	435	0.023	1.116	11.000	11:0	0.18	ECL deviates 0.000	Reference 0.001
4.906	15570	0.032	1.064	11.999	12:0	6.14	ECL deviates -0.001	Reference -0.000
5.475	1543	0.037	1.042	12.486	unknown 12.484 . . .	0.60	ECL deviates 0.002	
6.075	509	0.033	1.022	13.001	13:0	0.19	ECL deviates 0.001	Reference 0.002
6.319	6210	0.037	1.016	13.178	12:0 2OH	2.34	ECL deviates 0.001	
6.704	10683	0.038	1.007	13.456	12:0 3OH	3.98	ECL deviates 0.002	
7.400	458	0.029	0.992	13.960	unknown 13.957 . . .	0.17	ECL deviates 0.003	
7.454	1351	0.037	0.990	13.998	14:0	0.50	ECL deviates -0.002	Reference -0.002
8.189	1216	0.042	0.978	14.473	Sum In Feature 1 . .	0.44	ECL deviates 0.003	13:0 3OH/15:1 i I/H
9.007	2600	0.039	0.966	15.001	15:0	0.93	ECL deviates 0.001	Reference -0.000
9.824	5856	0.041	0.956	15.489	Sum In Feature 2 . .	2.07	ECL deviates 0.001	14:0 3OH/16:1 ISO I
9.927	743	0.034	0.955	15.551	16:0 N alcohol . . .	0.26	ECL deviates 0.001	
10.378	58961	0.044	0.950	15.820	Sum In Feature 3 . .	20.76	ECL deviates -0.002	16:1 w7c/15 iso 2OH
10.679	57103	0.044	0.947	16.000	16:0	20.04	ECL deviates -0.000	Reference -0.002
12.059	11410	0.048	0.935	16.795	17:1 w8c	3.95	ECL deviates 0.003	
12.416	6873	0.046	0.932	17.001	17:0	2.37	ECL deviates 0.001	Reference -0.001
13.069	731	0.044	. . .	17.371		. . .		
13.779	96674	0.049	0.923	17.774	18:1 w9c	33.04	ECL deviates 0.005	
13.873	1933	0.038	0.922	17.827	18:1 w7c	0.66	ECL deviates 0.004	
14.177	1648	0.047	0.920	17.999	18:0	0.56	ECL deviates -0.001	Reference -0.004
*****	1216	. . .	. . .	. . .	SUMMED FEATURE 1 . .	0.44	15:1 ISO H/13:0 3OH	13:0 3OH/15:1 i I/H
*****	. . .	. . .	. . .	. . .		. . .	15:1 ISO I/13:0 3OH	
*****	6988	. . .	. . .	. . .	SUMMED FEATURE 2 . .	2.54	12:0 ALDE ?	unknown 10.928
*****	. . .	. . .	. . .	. . .		. . .	16:1 ISO I/14:0 3OH	14:0 3OH/16:1 ISO I
*****	58961	. . .	. . .	. . .	SUMMED FEATURE 3 . .	20.76	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO 2OH/16:1w7c

Solvent Ar	Total Area	Named Area	% Named	Total Amnt	Nbr Ref	ECL Deviation	Ref ECL Shift
351244563	284427	283695	99.74	269915	9	0.002	0.002

TSBA40 [Rev 4.0] Acinetobacter 0.737
A. calcoaceticus 0.737
A. baumannii 0.631
A. radioresistens 0.419
Pseudomonas 0.505
P. flectens 0.505

Sherlock Version: 2.98

DATA:C98C16503A

17-DEC-98 01:50:47

4182

UN-ORSTOM-12 (80 PSF. 3 RR

Date of run: 17-DEC-98 01:25:32

Bottle: 42

SAMPLE [TSBA40]

RT	Area	Ar/Ht	Respon	ECL	Name	%	Comment 1	Comment 2
1.714	355326969	0.028	. . .	7.007	SOLVENT PEAK	. . .	< min rt	
2.712	990	0.022	. . .	8.940		. . .	< min rt	
3.261	899	0.026	1.181	10.001	10:0	0.23	ECL deviates 0.001	Reference 0.001
3.911	1370	0.028	1.121	10.917	Sum In Feature 2 . .	0.34	ECL deviates 0.003	12:0 ALDE ?
3.970	509	0.025	1.116	10.999	11:0	0.12	ECL deviates -0.001	Reference -0.001
4.906	20528	0.032	1.064	12.000	12:0	4.79	ECL deviates -0.000	Reference -0.000
5.474	1839	0.034	1.042	12.486	unknown 12.484 . . .	0.42	ECL deviates 0.002	
6.073	571	0.036	1.022	13.000	13:0	0.13	ECL deviates -0.000	Reference 0.000
6.319	8228	0.036	1.016	13.178	12:0 2OH	1.83	ECL deviates 0.001	
6.703	13745	0.038	1.007	13.455	12:0 3OH	3.03	ECL deviates 0.001	
7.455	2917	0.050	0.990	13.999	14:0	0.63	ECL deviates -0.001	Reference -0.001
8.189	1458	0.043	0.978	14.473	Sum In Feature 1 . .	0.31	ECL deviates 0.003	13:0 3OH/15:1 i I/H
8.914	462	0.038	. . .	14.940		. . .		
9.008	4165	0.042	0.966	15.001	15:0	0.88	ECL deviates 0.001	Reference 0.001
9.629	613	0.048	. . .	15.372		. . .		
9.826	7922	0.044	0.956	15.489	Sum In Feature 2 . .	1.66	ECL deviates 0.001	14:0 3OH/16:1 ISO I
9.929	1080	0.039	0.955	15.551	16:0 N alcohol . . .	0.23	ECL deviates 0.001	
10.379	99106	0.045	0.950	15.820	Sum In Feature 3 . .	20.65	ECL deviates -0.002	16:1 w7c/15 iso 2OH
10.681	102881	0.041	0.947	16.000	16:0	21.37	ECL deviates 0.000	Reference -0.000
11.778	508	0.040	0.938	16.632	17:0 ISO	0.10	ECL deviates 0.002	Reference 0.002
12.059	18285	0.047	0.935	16.794	17:1 w8c	3.75	ECL deviates 0.002	
12.417	11183	0.044	0.932	17.000	17:0	2.29	ECL deviates 0.000	Reference -0.001
13.066	1392	0.048	. . .	17.368		. . .		
13.436	829	0.038	0.925	17.577	18:3 w6c (6,9,12) .	0.17	ECL deviates 0.000	
13.782	176938	0.046	0.923	17.774	18:1 w9c	35.80	ECL deviates 0.005	
13.872	3198	0.042	0.922	17.825	18:1 w7c	0.65	ECL deviates 0.002	
14.179	3004	0.046	0.920	17.998	18:0	0.61	ECL deviates -0.002	Reference -0.003
*****	1458	. . .	. . .	. . .	SUMMED FEATURE 1 . .	0.31	15:1 ISO H/13:0 3OH	13:0 3OH/15:1 i I/H
*****		. . .	. . .	. . .		. . .	15:1 ISO I/13:0 3OH	
*****	9292	. . .	. . .	. . .	SUMMED FEATURE 2 . .	2.00	12:0 ALDE ?	unknown 10.928
*****		. . .	. . .	. . .		. . .	16:1 ISO I/14:0 3OH	14:0 3OH/16:1 ISO I
*****	99106	. . .	. . .	. . .	SUMMED FEATURE 3 . .	20.65	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO 2OH/16:1w7c

Solvent Ar	Total Area	Named Area	% Named	Total Amnt	Nbr Ref	ECL Deviation	Ref ECL	Shift
355326969	483632	481164	99.49	455974	10	0.002		0.001

TSBA40 [Rev 4.0] Acinetobacter 0.702

A. baumannii 0.702

A. calcoaceticus 0.673

A. radioresistens 0.585

Pseudomonas 0.618

P. flectens 0.618