



18
24
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
CAMPUS IZTACALA

Evaluación de la capacidad de degradación de
un cultivo mixto de cianobacterias sobre cuatro
hidrocarburos (m- y p-xileno, tolueno y
naftaleno)

T E S I S

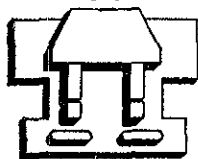
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

SILVIA JULIETA ROJAS TELLEZ

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



IZTACALA LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEX.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

258951 1998



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 está 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.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo:

A mi padre, Ing. Víctor Manuel Rojas Olvera, por enseñarme el valor del trabajo y a disfrutar de él cada día.

A mi madre, Ma. de la Luz Téllez Gutiérrez, por sus consejos, amor y dedicación para enseñarme a ser valiente y afrontar cualquier problema de la vida.

Con cariño para mis hermanas, Luz Mayte y Paola Karina.

A mi pequeña prima, Mitzin, quien a formado parte importante de mi familia y por ser alguien muy especial para mí.

Con mucho Amor para Carlos, por su motivación, apoyo y cariño, para que lograra cumplir esta meta.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Susana Saval y al Instituto de Ingeniería, por la donación de las muestras con las que se realizó este trabajo.

Al Dr. Felipe Vázquez Gutiérrez, responsable del Lab. de Físicoquímica del ICMYL, por haber depositado en mi su confianza para realizar diversos trabajos durante mi estancia en el instituto.

Al Dr. Alejandro López Cortés, del CIBNOR La Paz BCS, por sus comentarios y sugerencias, para mejorar el contenido de la tesis y por enseñarme un poco más del mundo de las cianobacterias.

A la Lic. en Ocean. Quím. Ana Judith Marmolejo Rodríguez, por su ayuda, orientación y consejos respecto a cromatografía de gases.

A los integrantes del Lab. de Físicoquímica del ICMYL, por su amistad y colaboración durante el tiempo en que se realizó este trabajo.

A mi asesor, M. en C. Jorge Manuel Romero Jarero, quien contribuyó a mi formación profesional y por impulsarme a realizar mi trabajo mejor cada día.

A mis compañeros del Lab. de Microbiología Marina, Armando, Noemí, Maribel, Rosa, José Luis, Perla, David y Daniel por su invaluable amistad, apoyo y consejos durante mi estancia en el laboratorio. Y por los buenos momentos que compartimos juntos.

Al proyecto DGAPA IN50076, por su apoyo económico.

CONTENIDO

	<u>Pags.</u>
I. Resumen	4
II. Introducción	5-6
III. Antecedentes	7-17
III.1. Características de las cianobacterias.	
III.1.1. Descripción morfológica del grupo.	
III.1.2. Condiciones de cultivo.	
III.1.3. Usos de las cianobacterias.	
III.2. Composición química del petróleo.	
III.2.1 Características físicas, químicas y vías de degradación.	
III.2.1.1 Naftaleno.	
III.2.1.2 Tolueno	
III.2.1.3 Xilenos.	
III.3. Biodegradación por cianobacterias y microalgas.	
IV. Objetivos	18
V. Material y método	19-23
V.1. Obtención de muestras.	
V.2. Aislamiento	
V.2.1. Identificación de bacterias en muestras originales.	
V.2.2. Aislamiento de cianobacterias.	
V.2.3. Comprobación del aislamiento.	
V.3 Identificación.	
V.3.1 Preparación de muestras para microscópio electrónico.	
V.4 Crecimiento en diferentes medios de cultivo.	
V.5 Prueba de biodegradación de hidrocarburos.	

	<u>Pags.</u>
VI. Resultados	24-26
VII. Análisis	27-31
VIII. Conclusiones	32
IX. Sugerencias	33
X. Cuadros y figuras	34-58
XI. Anexos	59-63
Anexo 1. Preparación de buffer fosfatos.	
Anexo 2. Medios de cultivo para cianobacterias.	
XII. Referencias bibliográficas	64-72

I. RESUMEN

La industria petrolera es una importante fuente de contaminación en zonas oceánicas y costeras. En el Golfo de México se concentra alrededor del 80 % de la actividad extractiva del petróleo y un 90 % de las instalaciones para su proceso. El impacto ecológico causado por derrames y fugas en los procesos de extracción, transporte y procesamiento del petróleo ha impulsado la búsqueda de nuevas tecnologías para la restauración de medios afectados. En el área de Minatitlán, Veracruz, se observó actividad de microorganismos hidrocarbonoclasticos presentes en sedimento y agua de la laguna de Santa Alejandrina. En dicho lugar se colectaron muestras, de las cuales se realizó el aislamiento y determinación de las cianobacterias: *Pseudanabaena acicularis* (filamentosa), *Synechococcus elongatus* y *Chroococcus dispersus* var *minor* (unicelulares), por ser el grupo de mayor abundancia. Dichas especies fueron sometidas a un periodo de cultivo por 30 días en cuatro diferentes medios de cultivo (Bg 11, Cg 10, F/2 y MN), determinando las curvas óptimas de crecimiento. Se seleccionó el medio Bg 11 y se procedió a evaluar la capacidad de degradación de las cianobacterias sobre *m*- y *p*-xileno, tolueno y naftaleno. Se observó que *P. acicularis* y *C. dispersus* pueden degradar tolueno, *m*- y *p*-xileno a una concentración de 10 µl/200 ml, sin afectar el crecimiento o la fotosíntesis; mientras que el naftaleno (2 mg/200 ml) resulta ser inhibitorio para las especies unicelulares y causa despigmentación en *P. acicularis*. La presencia de los hidrocarburos en el medio de cultivo, después de 25 días de incubación, se realizó por cromatografía de gases. El crecimiento de cianobacterias en la laguna Santa Alejandrina, marca el inicio de la biorestauración del cuerpo de agua por vía natural. Dichas especies ejercen dos funciones dentro del sistema, aportan oxígeno por vía fotosintética para la transformación de complejas mezclas de hidrocarburos y participan en la degradación de algunos derivados; colaborando a una biodegradación más eficiente, en menor tiempo y de manera natural.

II. INTRODUCCIÓN

La industria petrolera es una de las principales vías de desarrollo para el país, sin embargo, también es una importante fuente de contaminación en zonas oceánicas y costeras (Mesta *et al*, 1993). Los grandes impactos ecológicos derivados de los derrames y fugas en los procesos de extracción, transporte y procesamiento del crudo son unas de las razones por las cuales se ha impulsado la búsqueda de nuevas tecnologías para la restauración de los medios afectados (Botello *et al*, 1995).

En el Golfo de México se concentra alrededor del 80 % de la actividad extractiva del petróleo y un 90 % de las instalaciones para su proceso (PEMEX, 1988). Ello, implica que los diversos cuerpos de agua presentes en la zona sean vulnerables a la contaminación por hidrocarburos.

Las zonas costeras suelen ser, la mayoría de las veces, las más contaminadas por el establecimiento de poblaciones humanas y petroquímicas que realizan descargas constantes a las costas, provocando que el sedimento de estos lugares almacene mayor cantidad de hidrocarburos (Traxler y Cundell, 1976; Floodgate, 1982).

En la Sonda de Campeche, en el período de 1971 a 1975 el 85 % de los derrames ocurrieron por incidentes de barcos petroleros (Danenberger, 1976). Este porcentaje puede considerarse nulo, pero no menos importante, si es comparado con los derrames de años siguientes: Ixtoc en 1979, Abkatum en 1986, Yun en 1987 y Och en 1988 (Pfaender y Buckley, 1982; Lizárraga-Partida *et al*, 1987; Yañez, 1994).

Cuando el petróleo se encuentra en contacto directo con el agua forma una pequeña película sobre la superficie que llega a medir 0.1 μm (Leahy y Colwell, 1990), a esta delgada capa le ocurren cambios por factores físicos, químicos y biológicos (Floodgate, 1995).

Los principales factores físicos son: la evaporación, remueve cerca de un 50 % de los hidrocarburos (Fingas, *et al* 1991), entre ellos el queroseno y la gasolina, quedando solo crudos viscosos que se evaporan en un 25 % (Prince, 1990); la fotooxidación, convierte los hidrocarburos en hidroxiperóxidos y estos a su vez son transformados a alcoholes, ácidos y otros compuestos oxigenados (Bobra y Tennyson, 1989).

La acción conjunta de estos factores degrada la capa de petróleo de 20 a 60 % en menos de 24 hrs (Regnier y Scott, 1975). Los hidrocarburos restantes son compuestos de alto peso molecular que se almacenan en el sedimento donde son degradados por microorganismos (Floodgate, 1995).

La biodegradación, es la vía natural por la cual algunos microorganismos liberan a la atmósfera de componentes aromáticos (Floodgate, 1995) y consiste en el rompimiento de los mismos a compuestos de menor peso molecular (Shwartz y Leathen, 1976). Está comiienza cuando se han evaporado componentes venenosos del petróleo (Colwell y Walker, 1977; Hill, 1982), pero aún así puede ser inhibida por factores como temperatura, disponibilidad de nutrimentos (fósforo y nitrógeno), alta demanda de oxígeno, concentración de los hidrocarburos, salinidad, presión, pH (Floodgate, 1982 y 1995; Leahy y Colwell, 1990).

Los microorganismos degradadores necesitan altas cantidades de oxígeno para romper las cadenas y anillos que forman el petróleo, es por eso que la biodegradación se considera un proceso aerobio (Pfaender y Buckley, 1982; Leahy y Colwell, 1990; Prince, 1990; Atlas, 1991; Fingas *et al*, 1991), aunque la vía anaerobia no está descartada (Neilson, 1994).

Las oxigenasas son enzimas, que permiten a los microorganismos realizar la oxidación de los hidrocarburos (Schwartz y Leathen, 1976). Estas se clasifican en: monooxigenasas, incorporan un átomo de oxígeno del sustrato y otro átomo reducido del agua, para oxidar sustratos parafínicos; diooxigenasas, catalizan la incorporación de ambos átomos de oxígeno dentro del sustrato y permiten la oxidación de compuestos aromáticos (Hill, 1982; Pfaender y Buckley, 1982; Leahy y Colwell, 1990; Atlas, 1991; Wilson y Jones, 1993).

Las bacterias, cianobacterias, levaduras, hongos filamentosos, protozoarios y algas agrupan la mayoría de los géneros degradadores de petróleo, un listado de los mismos se observan en el Cuadro 1 (Parkinson, 1973; Schwartz y Leathen, 1976; Cerniglia *et al*, 1980 (a); Floodgate, 1982; Girard, 1988; Wilson y Jones, 1993; Al Hasan *et al*, 1994).

De forma individual el metabolismo que realiza un sólo género es muy limitado, debido a la complejidad química del petróleo (Atlas, 1991), entonces la biodegradación requiere de la participación de varios microorganismos, para degradar grandes complejos aromáticos (Sorkhoh *et al*, 1995).

A medida que la contaminación se hace crónica, la búsqueda de organismos resistentes y con altos porcentajes de degradación, es más necesaria (Floodgate, 1995). Esta acción tiene como objetivo, lograr la biorestauración de zonas contaminadas por petróleo u otros derivados, en menor tiempo y de manera natural.

III. ANTECEDENTES

III.1 Características de las cianobacterias

III. 1.1. Descripción morfológica del grupo

Las cianobacterias son cosmopolitas, se observan en hábitats aéreos, terrestres y acuáticos (Fogg, 1978 b); adheridas a rocas, objetos inanimados, plantas (Bold, y Winne, 1989). Forman parte del fitoplanctón junto con una gran diversidad de microorganismos (Edward, 1989); pero son consideradas como primeras pobladoras (Kumar y Singh, 1979). Son microorganismos anaerobios facultativos fototróficos, característica que les permite crecer sobre aguas limpias o contaminadas (Edward, 1989), formando extensos mantos (Pentecost, 1984; López, 1990; Stal, 1991), sobre lodos, arenas, marismas y pantanos (Fogg, 1978 a).

Son unicelulares y filamentosas (Kumar y Singh, 1979). Las células de las especies unicelulares son esféricas (ej. *Chroococcus*) o cilíndricas (ej. *Synechococcus*), libres o encerradas dentro de un mucilago formando colonias como en el género *Gloeocapsa*. Los filamentos o tricomas se clasifican en simples (ej. *Oscillatoria*), ramificados (ej. *Westiella*) y no ramificados (ej. *Rivularia*), según Fogg, 1978 b; una verdadera ramificación, es la continuación celular del filamento. Las falsas ramificaciones son rompimientos del tricoma original (Edward, 1989).

El tamaño es importante para la identificación, varía según la forma, el diámetro va de 1- 20 μ y la longitud de 1 μ hasta 1 mm (Fogg, 1978 a).

El color característico es el verdeazul, aunque también pueden adquirir tonalidades negras, púrpura, rojas; debido a la presencia de varios pigmentos (Fogg, 1978; Van Baalen, 1978; Bold y Winne, 1989): la clorofila *a*, pigmento más abundante y de estructura similar a la de las plantas vasculares (Edward, 1989); β -caroteno y xantofilas, pigmentos amarillos; biliproteínas como las ficobilinas, pigmentos azules y las cromoproteínas, pigmentos rojos (Smith, 1966). Los pigmentos se encuentran agrupados dentro de pequeñas invaginaciones de membranas denominadas ficobilisomas (Fogg, 1978 a). Las cianobacterias, realizan fotosíntesis del tipo C_3 como las plantas vasculares (Edward, 1989).

Otra característica relacionada con las cantidades de pigmentos es la adaptación cromática, presente en algunas especies del género *Oscillatoria* (Smith, 1966); por ejemplo, asumen una coloración verde bajo luz roja, un color rojizo bajo luz verde y un color verdeazul bajo luz amarilla (Kumar y Singh, 1979). Cabe mencionar que la fotoquinesis y orientación fototáctica (Häder, 1987) de estos autótrofos, forma parte de los métodos de aislamiento (Allen, 1973).

El movimiento se realiza sobre substrato sólido y húmedo (Waterbury *et al.*, 1985; Bold y Winne, 1989), ocurre por la continua secreción de mucilago, de los poros de la pared celular (Lamont, 1969), o por microfibrillas ubicadas dentro de la vaina (Häder, 1987).

La vaina es una estructura que se localiza por fuera de la pared celular, es homogénea, fibrilar, variable en grosor y tiene la función de proteger a la célula de la pérdida de agua (Edward, 1989). La vaina, puede ser hialina o de colores (café, azul, rojo o amarillo), el color depende de las condiciones ambientales en donde se desarrolle la cianobacteria (Fogg, 1978 b).

Seguida de la vaina se encuentra la pared celular, estratificada en capas: una capa externa, una capa media densa de electrones y una capa interna de mucopolímeros también electrodensa (Fogg, 1978 b; Kumar y Singh, 1979). Las cianobacterias son Gram negativas por poseer una capa dentro de la pared celular, similar a la membrana externa de las bacterias Gram negativas (Van Baalen, 1978; Kumar y Singh, 1979; Edward, 1989).

Dentro de la célula el ADN, es fibrilar y se encuentra disperso; la mayor cantidad se localiza en la región central, se le conoce como cromatoplasma (Fogg, 1978 b) y en tamaño es similar al de las bacterias (Edward, 1989). El ARN contiene ribosomas 70 S también semejantes a los ribosomas bacterianos (Fogg, 1978 a; Kumar y Singh, 1979).

A lo largo del tricoma se localizan una serie de células especializadas llamadas heterocistos, estos cuentan con una enzima fijadora de nitrógeno, la nitrogenasa, sensible al oxígeno (Fogg, 1978 b; Robin, y Whittick, 1987). Los heterocistos se localizan en posición intercalar o terminal (Fogg, 1978 b) y el número esta regulado por la concentración de molibdeno y nitrógeno en el medio (Edward, 1989). Los heterocistos son característicos de los ordenes Nostocales y Stigonematales (Fogg, 1978 a; Kumar y Singh, 1979).

Las cianobacterias poseen una serie de inclusiones celulares llamados gránulos:

1. Carboxisomas o cuerpos poliedricos, están presentes en la parte central de la célula en pequeñas unidades, contienen enzimas involucradas en la fijación de CO₂ (Fogg, 1978 a y b) y forman una reserva para la enzima ribulosa 1,5- difosfato carboxilasa (Edward, 1989).
2. Gránulos de glicógeno o poliglucanos, participan en la fotosíntesis y almacenan carbohidratos; almidón principalmente. Estos gránulos se encuentran entre los espacios de las invaginaciones donde se guardan los pigmentos (Edward, 1989).
3. Gránulos de cianoficina, tienen forma irregular, almacenan polipéptidos--ácido aspártico y arginina--el número de los gránulos varía en cuanto al ciclo de vida de las células (Fogg, 1978 b).

4. Cuerpos polifosfatados o gránulos de volutina, son esféricos y contienen lípidos (Edward, 1989).
5. Vacuolas de gas o vesículas de gas, son tubos cilíndricos con terminaciones cónicas. La membrana de las vesículas es hidrofóbica, permeable a los gases, rígida y mantiene una presión de 1 atm (Edward, 1989). El número de vacuolas varía según la intensidad de luz (Kumar y Singh, 1979) y se relacionan con la flotación; entre mayor sea el número de vacuolas, las células se encontrarán más cerca de la superficie (Smith, 1966). Las vacuolas de gas son características en las especies planctónicas como *Anabaena*, *Oscillatoria* y *Phormidium* (Fogg, 1978 a).

La vía de reproducción es principalmente asexual (Smith, 1966). Las cianobacterias unicelulares se reproducen por bipartición y los filamentos por fragmentación (Kumar y Singh, 1979); existen otras formas reproductivas como:

1. Hormogonios, es la fragmentación del tricoma por medio de necridios, muerte de una célula (Fogg, 1978 a), o por discos de separación (Smith, 1966), al separarse del filamento poseen movimiento propio (Edward, 1989).
2. Acinetos, especie de esporas que se forman bajo condiciones desfavorables. Son esféricos, de pared delgada, acumulan grandes cantidades de gránulos de cianoficina (reservas proteínicas), son resistentes a: altas temperaturas, desecación, materiales tóxicos (Fogg, 1978 b). Característicos en los géneros *Nostocales* y *Stigonematales* (Edward, 1989).
3. Exoesporas, se liberan de las partes finales de los filamentos (Fogg, 1978 b).
4. Endoesporas se forman dentro de la célula (Fogg, 1978 b).
5. Nanocitos, son endoesporas que se forman por la división celular (Fogg, 1978 b).

Por último es importante mencionar la facilidad de las cianobacterias para formar asociaciones simbióticas extracelulares con otros organismos como: hongos, diatomeas, protozoarios, esponjas marinas, raíces de cicadas, líquenes, helechos (Fogg, 1978 a; Edward, 1989).

III. 1. 2. Condiciones de cultivo

Las cianobacterias pueden crecer en ambientes adversos: altas o bajas temperaturas, poca intensidad de luz, desecación y bajas concentraciones de nutrientes (Kumar y Singh, 1979).

Los elementos básicos que requieren las cianobacterias para el crecimiento, son: nitrógeno, fósforo, azufre, potasio, sodio, magnesio, calcio, molibdeno, carbono e hidrógeno, aunque la concentración de estos varía según la necesidad nutricional de cada especie (Robin, y Whittick, 1987).

Los parámetros fisicoquímicos varían según las especies, pero los más comunes son los siguientes:

1. Temperatura, entre los 28 y los 40 °C (Fogg, 1978 a; Van Baalen, 1978)
2. pH, neutro (7.5) a alcalino (8.5), según Fogg, 1978 a.
3. Intensidad de luz, son necesarios de 800 a 1000 lux, para matraces de 250 a 500 ml (Le Borgne, 1991).
4. Agitación constante, en caso de volúmenes pequeños (80- 500 ml) una agitación periódica es suficiente (Le Borgne, 1991).

Son sensibles a antibióticos como la penicilina (Van Baalen, 1978), bacitracina, colchicina, polimixina A y B, estreptomycin y terramicina (Fogg, 1978 b). El cloranfenicol, evita la formación de proteínas en los ribosomas (Edward, 1989).

III. 1. 3. Usos de las cianobacterias

Por su alto índice proteico (Ramos y Salazar, 1990), las cianobacterias, se utilizan como alimento para animales domésticos y humanos; entre los géneros más cultivados están: *Spirulina*, *Nostoc* (Edward, 1989) y *Prototheca* (Robin, y Whittick, 1987).

Extractos de *Spirulina* son utilizados como sustituto del suero y para la producción de vitamina B₁₂ (Ramos y Salazar, 1990). *Phormidium* es un género productor de ficobiliproteínas, cuyas propiedades fluorescentes permiten la utilización para el marcaje de anticuerpos monoclonales y diferentes detecciones inmunológicas. Los carotenos, xantofilas y ficocianinas, producidos por ciertas especies de cianobacterias, tienen gran demanda para la industria alimenticia, cosmética y textil.

En la agricultura, por la capacidad fijadora de nitrógeno, se les utiliza para formar simbiosis con plantas de importancia comercial, como por ejemplo los arrozales (Kumar y Singh, 1979). También son consideradas estabilizadoras de sedimentos, evitando la erosión y manteniendo la temperatura de los suelos y la aireación (Fogg, 1978).

Se crecen en bioreactores fotosintéticos (Feuillade y Feuillade, 1979) para procesos biotecnológicos (Regan, 1992); como la producción de hidrógeno (Ramos y Salazar, 1990) u obtención de toxinas (Robin, y Whittick, 1987).

Recientemente se han utilizado en la limpieza de aguas residuales, gracias a que solo requieren la materia orgánica para su crecimiento (Oswald, 1992), obteniéndose una remoción de sales y una gran cantidad de biomasa útil (Ramos y Salazar, 1990). Su utilizan para medir metales pesados como el cobalto, níquel, cobre, cadmio y pesticidas (Robin, y Whittick, 1987).

III.2 Composición química del petróleo

El petróleo se define como un derivado orgánico, compuesto por una mezcla de hidrocarburos, los cuales a su vez, están compuestos por oxígeno, azufre, nitrógeno y metales: níquel, vanadio, fierro y cobre (Lobban *et al*, 1985); esta composición varía de acuerdo a su origen geológico y geográfico (Girard, 1988).

La fracción líquida del petróleo es el aceite crudo, constituido por hidrocarburos y una porción de componentes de otra estructura química como: tiesteres, tiofenos tioles y asfaltenos (Morgan y Watkinson, 1994). Los hidrocarburos se dividen según los grupos químicos fundamentales y en base a las estructuras de los mismos, en dos grupos de compuestos: el primero contiene a los alcanos o parafinas (lineales y ramificados), cicloalcanos y aromáticos; en el segundo se encuentran compuestos oxigenados con nitrógeno, azufre como ácidos nafténicos y fenoles (Floodgate, 1982; Girard, 1988).

El porcentaje de cada grupo es variable, por lo que se ha determinado una composición aproximada para un crudo promedio (Girard, 1988). Los hidrocarburos más pesados predominan en las fracciones asfálticas, mientras que los compuestos insaturados representan una fracción pequeña. El ciclopentano y el ciclohexano son prevalentes en la mezcla, al igual que los componentes multianillados. Los aromáticos son los componentes más importantes, pues forman cadenas a partir del benceno constituyendo los llamados hidrocarburos poliaromáticos (Morgan y Watkinson, 1994).

En el grupo de los aromáticos se encuentran el benceno, tolueno, naftaleno, xilenos (*m-,p-,o-*) y fenoles, cuya toxicidad es muy elevada para plantas y animales (Lobban *et al*, 1985). Los hidrocarburos aromáticos simples, de bajo peso molecular, suelen ser más fácilmente biodegradados (Walker *et al*, 1976). Aunque, compuestos como los naftalenos, fenantrenos, antracenos e hidrocarburos aromáticos polinucleares representan mayor complejidad para la biodegradación (Atlas, 1991). De lo anterior, se puede deducir que los grados y tasas de degradación, dependen de la composición química del petróleo; por eso algunos crudos son más fácilmente degradables que otros (Girard, 1988).

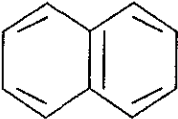
La biodegradación del petróleo depende de cuatro factores fundamentales:

- 1.- La complejidad química del petróleo.
- 2.- Las propiedades físicas de cada hidrocarburo.
- 3.- La resistencia de los microorganismos biodegradadores a compuestos aromáticos de bajo peso molecular, pues estos exhiben cierta toxicidad sobre las membranas celulares (Morgan y Watkinson, 1994). No obstante, estos pueden ser metabolizados en bajas concentraciones.
- 4.- A factores ambientales como temperatura, oxígeno, nutrientes, presión, pH y salinidad (Girard, 1988; Leahy y Colwell, 1990).

III.2.1 Características físicas, químicas y vías de degradación

III.2.1.1 Naftaleno

El naftaleno, también conocido como naftalina, es un hidrocarburo aromático, cuyas características se muestran en el siguiente cuadro:

<u>Estructura química:</u>	<u>Características físicas:</u>	<u>Usos:</u>
 <p>(Stecher <i>et al</i>, 1968)</p>	<p>Número de carbonos: 10 fórmula química: C₁₀ H₈ Peso molecular: 128.18 g/mol Punto de fusión: 79-81 °C Punto de ebullición 218 °C Densidad: 1.5 Soluble en: metanol, etanol, benceno, tolueno, aceite de olivo, cloroformo, tetracloruro de carbono y disulfuro de carbono, pero insoluble en agua (Stecher <i>et al</i>, 1968).</p>	<p>Sirve como carburante y disolvente; materia prima para fabricar perfumes, colorantes, materias plásticas, curtido de pieles; en la manufactura del indigo y para la fabricación de resinas (naftoles); en celuloides y lubricantes de aceites para motor (Maluquer <i>et al</i>, 1974; Galiana <i>et al</i>, 1987). Se utiliza como antiséptico y para la fabricación de insecticidas (Stecher <i>et al</i>, 1968).</p>

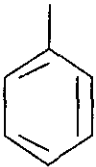
La biodegradación del naftaleno ha sido estudiada por varios autores (Daly *et al*, 1972; Cerniglia *et al*, 1980 b; Atlas, 1991), en diferentes géneros de microorganismos.

Las rutas propuestas por Girard (1988) y Smith (1994), para la degradación del naftaleno, empleada por bacterias y levaduras se observa en la Figura 1, la primera reacción se lleva a cabo por medio de la dioxigenación de la molécula (*cis*-1,2-dihidrodiol), gracias a las enzimas dioxigenasas. Según Cerniglia *et al* (1980 b), las cianobacterias siguen la misma vía.

En años recientes (Neilson, 1994), se descubrió la vía utilizada por hongos, misma que siguen organismos eucariontes (Daly *et al*, 1972), transformando el naftaleno a *trans*-1,2- dihidrodiol; entonces se propuso realizar estudios en los diferentes géneros biodegradadores de hidrocarburos para comparar las vías de transformación (Morgan y Watkinson, 1994 y Smith, 1994).

III.2.1.2 Tolueno

El tolueno conocido como metilbenceno o alquilbenceno, es un hidrocarburo aromático, líquido, incoloro, inflamable e insoluble en agua, otras de sus características se citan a continuación:

Estructura química:	Características físicas:	Usos:
<p style="text-align: center;">CH₃</p>  <p style="text-align: center;">(Stecher <i>et al</i>, 1968)</p>	<p>Número de carbonos: 7 fórmula química: C₇H₈ Peso molecular: 92.13 g/mol Punto de fusión: -95 °C Punto de ebullición 111 °C Densidad: 0.87 Soluble: en alcohol, cloroformo, eter, acetona, ácido acético glacial y disulfuro de carbono(Stecher <i>et al</i>, 1968).</p>	<p>Se utiliza como solvente de grasas, resinas y otras sustancias orgánicas; en la preparación de colorantes, sacarina, barnices, toilita, ciertas gasolinas para aviones y termómetros que permiten medir bajas temperaturas (Maluquer <i>et al</i>, 1974).</p>

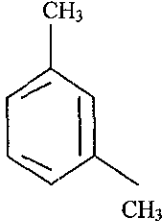
El tolueno tiene dos vías de degradación, en donde el ataque enzimático inicial puede ser directamente en el anillo aromático o al grupo metil, sin embargo, la oxigenación del anillo aromático es la más común (Girard, 1988) como se muestran en la Figura 2; en la ruta, las dioxigenasas comienzan la transformación de el tolueno a dihidrodiool (Smith, 1994).

III.2.1.3 Xilenos

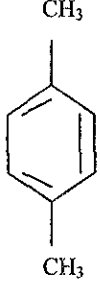
El xileno bruto, xilol ó dimetilbenceno (C₈H₁₀), altamente volátil, es una mezcla de tres isómeros: *m*-xileno, *p*-xileno y *o*-xileno; siendo el primero el más abundante (Stecher *et al*, 1968). Los xilenos son líquidos incoloros, solubles en la mayoría de los solventes orgánicos, pero insolubles en agua (Maluquer *et al*, 1974); sirven como solventes. En microscopía, se utilizan para impregnar tejidos animales y vegetales para aumentar la transparencia.

El estudio de la transformación de los xilenos depende de la posición de los grupos metil en el anillo, es por eso que el *p*-xileno es más fácilmente degradado que el *m*- y el *o*-xileno (Neilson, 1994). Por otra parte el *m*-xileno es el componente más abundante de los tres compuestos en el petróleo (Stecher *et al*, 1968; Girard, 1988), de ahí la importancia de su estudio.

El *m*-xileno es un hidrocarburo aromático, insoluble en agua. Las características de este compuesto se describen a continuación:

<u>Estructura química:</u>	<u>Características físicas:</u>	<u>Usos:</u>
 <p>(Smith, 1994)</p>	<p>Número de carbonos: 8 Peso molecular: 106.17 g/mol Punto de fusión: -48 °C Punto de ebullición 139 °C Densidad: 0.863-0.864 Soluble en: alcohol, eter y otros líquidos orgánicos (Stecher <i>et al.</i>, 1968).</p>	<p>Se utiliza en la obtención del ácido isoftálico, el cual se usa para la obtención de resinas (Maluquer <i>et al.</i>, 1974; Galiana <i>et al.</i>, 1987).</p>

El *p*-xileno posee una estructura molecular:

<u>Estructura química:</u>	<u>Características físicas:</u>	<u>Usos:</u>
 <p>(Smith, 1994)</p>	<p>Número de carbonos: 8 Peso molecular: 106.17 g/mol Punto de fusión: 13 °C Punto de ebullición 138 °C Densidad: 0.86</p>	<p>Se utiliza para fabricar tergal, ácido tereftálico y para la fabricación de fibras de poliéster como el dacrón (Maluquer <i>et al.</i>, 1974).</p>

Las rutas de degradación de ambos compuestos se observan en las Figuras 3 y 4 (Smith, 1994).

III. 3 Biodegradación por cianobacterias y microalgas

Las investigaciones sobre la biodegradación del petróleo, iniciaron con el estudio de algunos géneros de bacterias (Parkinson, 1973; Traxler y Cundell, 1976; Colwell y Walker, 1977; Pfaender y Buckley, 1982; Fusey y Oudot, 1984; Lizarraga *et al*, 1987; Girard, 1988; Prince, 1990; Atlas, 1991; Fingas *et al*, 1991; Stabnikova *et al*, 1995), hongos y levaduras (Flodgate, 1982; Hill, 1982).

Cuando los derrames petroleros comenzaron a ser constantes, los estudios se centraron en los efectos que podían causar los hidrocarburos sobre el fitoplancton (base de todas las cadenas alimenticias). **Gordon y Prouse (1973)** observaron que el fitoplancton puede utilizar los hidrocarburos como fuente de energía, dependiendo de tres factores: las condiciones ambientales que prevalescan, las especies predominantes en el fitoplancton según la estación del año y la toxicidad del petróleo, en base a su composición y concentración en el medio acuático; provocando la inhibición ó la estimulación del crecimiento y la fotosíntesis.

Dunstan y colaboradores (1975) comprobaron que la estimulación ó inhibición del crecimiento, causado por componentes aromáticos de bajo peso molecular como el xileno, tolueno y benceno, sobre algunos géneros de microalgas; depende de la concentración ($\mu\text{g/l}$) de los hidrocarburos. Las concentraciones bajas estimulan el crecimiento, mientras que concentraciones altas lo retardan o lo inhiben según la dispersión y volatilización que tengan estos componentes en el medio acuático.

Gaur y Kumar (1981) realizaron el análisis químico de tres crudos y un combustóleo, probandolos sobre el crecimiento de *Anacystis nidulans* (cianobacteria), *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornatum* y *Oocystis* sp (microalgas). Los tres crudos a concentraciones bajas (5-10 $\mu\text{l}/10$ ml), provocaban retardo en el crecimiento. Las concentraciones altas (30 $\mu\text{l}/10$ ml), lo inhibían totalmente. El combustóleo, con un alto porcentaje de naftalenos y bifenilos, fue el más tóxico. *Chlorella vulgaris* y *Oocystis* sp. presentaron mayor resistencia a dicha toxicidad, según los autores por haber sido recolectadas en un río contaminado con descargas industriales donde adquirieron modificaciones fisiológicas, genéticas y enzimáticas.

Batterton y colaboradores (1978), estudiaron la toxicidad de cuatro tipos de petróleo y cinco gasolinas sobre dos microalgas y una cianobacteria (*Agmenellum quadruplicatum*). Los crudos (30 $\mu\text{l}/20\text{ml}$) y tres gasolinas (10 $\mu\text{l}/20\text{ml}$) fueron menos tóxicos para la cianobacteria pues solo causaban retraso en el crecimiento. Las otras dos inhibían la fotosíntesis. Por medio de un análisis químico observaron que las gasolinas con mayor porcentaje de naftalenos, toluenos, dibenzotiofenos y fenantrenos son menos tóxicas.

En 1976 Winters y colaboradores caracterizaron las partes solubles de cuatro gasolinas y su efecto sobre microalgas, diatomeas y cianobacterias (*Agmenellum quadruplicatum* y *Coccolithis elabens*). La parte soluble de las gasolinas se componía por naftalenos, bencenos, fenoles, anilinas e indoles; causando inhibición en el crecimiento de solo de las microalgas y las diatomeas. Cuando la parte soluble contenía mayor concentración de naftalenos, bencenos y toluenos (0.1 a 10µg/l) solo retrasaba el crecimiento. Las gasolinas con un mayor porcentaje de fenoles (100µg/l) causaban inhibición.

Al conocer que las concentraciones bajas de hidrocarburos no inhiben el crecimiento y fotosíntesis de algas y cianobacterias, se utilizaron compuestos marcados para conocer la incorporación de los mismos al sistema celular y los productos obtenidos de la biodegradación.

Ellis (1977) demostró que los componentes fenólicos (¹⁴C-Fenol y el ¹⁴C-catecol), en concentraciones bajas (0.5 µmolar), pueden ser removidos del medio acuático más rápido (48 horas) que los componentes aromáticos; por algunas microalgas y cianobacterias (*Anabaena cylindrica* y *Phormidium foveolarum*).

Cerniglia y colaboradores (1980 a), demostraron la oxidación del ¹⁴C-naftaleno (35 µg/30ml) por microalgas y cianobacterias. Estos microorganismos crecen fotoautotróficamente en presencia del hidrocarburo, produciendo seis metabolitos secundarios; siendo el 1-naftol (C₁₀H₈O) el más abundante. Las cianobacterias obtuvieron el mayor porcentaje (2.4 %) en el metabolismo del naftaleno. Anteriormente (1979), los mismos autores, encontraron que la cianobacteria *Agmenellum quadruplicatum*, metaboliza el ¹⁴C-naftaleno (2.2 µmolar), por la misma vía que las bacterias; comenzando la transformación del hidrocarburo a un compuesto *cis*-dihidrodiol.

Las cianobacterias son parte fundamental del fitopláncton, estas forman mantos en los sedimentos de los cuerpos acuáticos (López, 1990). Los mantos, albergan una gran variedad de bacterias, hongos, levaduras, protozarios, microlagas (Pentecost, 1984; Sorkhoh *et al*, 1995); es por eso que dichos mantos tienen una relevancia ecológica (Stal, 1991; López y Tovar, 1992). El oxígeno producido en su mayoría por las cianobacterias, es utilizado por ellas y los microorganismos biodegradadores para oxidar, en forma más eficiente, los hidrocarburos (Sorkhoh *et al*, 1992 y 1995).

La cianobacteria *Oscillatoria* sp; es una de las principales formadoras de mantos (Stal, 1991). Cerniglia y colaboradores (1980 b), estudiaron el metabolismo del naftaleno (0.3 mg/30ml) en dicho género, ya que en experimentos anteriores obtuvo los mayores índices del metabolismo de este hidrocarburo (4.8 % en 24 hrs). Nuevamente el metabolito más abundante fue el 1- naftol cuya formación envuelve la incorporación de oxígeno molecular. Esto sugiere que la cepa *Oscillatoria* sp. posee buenos mecanismos para iniciar una oxidación exitosa del naftaleno.

En 1992 Sorkhoh y colaboradores, reportaron la presencia de mantos de cianobacterias (formados principalmente por *Microcoleus sp*), sobre densas capas de petróleo en las costas de Kuwait; después de la Guerra del Golfo. Después de los derrames todas las formas de vida superior se vieron fuertemente afectadas, mientras que los mantos comenzaron a aflorar. En los mantos, se encontraba una gran variedad de bacterias degradadoras de petróleo. Este hecho, según los autores, es el primer paso para lograr la biorremediación.

Al Hasan *et al* (1994), realizaron el aislamiento de *Microcoleus chthonoplastes* y *Phormidium corium* de los mantos de cianobacterias mencionados por Sorkhoh (1992); estas especies pueden utilizar *n*-alcanos o petróleo crudo transformandolos a ácidos grasos. Los autores proponen a las cianobacterias como microorganismos importantes para la biodegradación y como agentes invaluable para propósitos de biorremediación.

En la laguna costera de Santa Alejandrina, ubicada en Minatitlán, Veracruz; se observó la formación de mantos de cianobacterias con posible actividad hidrocarbonoclástica. Es por eso que el presente estudio tiene como objetivos, formar un cultivo axénico con las especies de cianobacterias presentes en la laguna y evaluar la capacidad degradativa de las mismas, sobre tres hidrocarburos aromáticos: *m*- y *p*-xileno, tolueno y naftaleno.

IV. OBJETIVOS

A) GENERALES

- 1.- Obtener un cultivo mixto de cianobacterias de muestras de agua y sedimento, colectadas en la laguna costera de Santa Alejandrina.
- 2.- Evaluar la capacidad de degradación del cultivo mixto obtenido, sobre tres hidrocarburos aromáticos: *m*- y *p*-xileno, tolueno y naftaleno.

B) PARTICULARES

- 1.- Identificar y aislar las cianobacterias presentes en las muestras colectadas, para formar un cultivo mixto.
- 2.- Seleccionar un medio de cultivo que favorezca el crecimiento de las cianobacterias en estudio.
- 3.- Evaluar mediante cromatografía de gases la degradación de los hidrocarburos por parte de las cianobacterias.

V. MATERIAL Y MÉTODO

V.1 Obtención de Muestras

Se trabajaron muestras de agua y sedimento de la laguna costera de “Santa Alejandrina”, ubicada en Minatitlán, Veracruz; la localización geográfica de dicha laguna se encuentra en la Figura 5. Esta laguna presenta contaminación por hidrocarburos, debido a las continuas descargas de aguas residuales y derrames, provenientes de la refinería Lazaro Cardenas, cercana al lugar.

Todos los medios de cultivo utilizados en este trabajo se esterilizaron en autoclave por 15 minutos a 15 lb/in². La cristalería se sometió a calor seco en horno (Robertshaw 15697) a 160 °C por dos horas. Las vitaminas, aminoácidos y antibióticos se agregaron por filtración (Métodos Normalizados, 1989), con una jeringa estéril (de 10 ml) y un acrodisco desechable (HT *Tuffryn* polisulfato, Gelman Sciences) con poro de 0.2 µ de diámetro.

Las muestras se colectaron en frascos color ambar (900 ml) y se mantuvieron en refrigeración hasta llegar al laboratorio. Se realizó una mezcla con el agua y sedimento recolectados (para obtener un crecimiento masivo de microorganismos), esta se repartió en volúmenes de 100 ml en frascos transparentes (200 ml) con tapón de rosca. Los frascos se colocaron dentro de un baño maría (Grant JB2) a 28 ± 2 °C con iluminación vertical continua (Frischknecht y Schneider, 1979) y una intensidad de 300 lux (Meffert y Chang, 1978). La iluminación la proporcionaron dos lámparas (SYLVANIA) de luz blanca-fría (25 W), en forma de espiral. Después de 15 días las muestras fueron observadas en microscopio de contraste de fases (Regan e Ivancic, 1984).

V.2 Aislamiento

El aislamiento de las cianobacterias consistió en eliminar las bacterias con antibióticos y los demás microorganismos mediante temperatura, pH y algunos reactivos (Frischknecht y Schneider, 1979; Zevenboom y Mur, 1981; Regan e Ivancic, 1984; Le Borgne, 1991). Se comenzó con las bacterias, sembrando la muestra original en medios selectivos para reconocer algunos géneros.

V.2.1. Identificación de bacterias en muestras originales

Antes de comenzar el aislamiento se evaluaron los grupos bacterianos presentes en las muestras. Se sembraron 100 µl de las muestras originales en agar métodos estándar, medio marino, agar EMB, Mc Conkey, TCBS y Salmonella -Shigella. Los inoculos se matuvieron a 25 °C por 24 hrs, período al cual se contaron las colonias (Collins *et al.*, 1991; Métodos normalizados, 1989). Algunas colonias se tomaron al azar y se les aplicó tinción de Gram (Beishir, 1977).

Con los resultados de dicha tinción se realizaron antibiogramas, para los siguientes antibióticos: ampicilina (Sigma, lote 92H0020), cefoxitina (Sigma, lote 33H06751), cloramfenicol (Sigma, lote 85H0160), estreptomina, kanamicina (Sigma, lote 101H0131), penicilina G (Sigma, lote 75H01645) y tetraciclina (Sigma, lote 74H0385), a una concentración de 100 µg/ml. Los sensibilizados se prepararon con papel Whatman No. 1 de 5 mm de diámetro (Collins *et al*, 1991).

V.2.2. Aislamiento de cianobacterias

De los frascos preparados en la sección IV.1 se tomaron, en tres ocasiones, volúmenes de 10 µl y se depositaron en frascos transparentes (250 ml) con tapón de rosca que contenían 100 ml de agua destilada estéril (Ferris y Hirsh, 1991); con el fin de realizar diluciones y disminuir el número de bacterias (Allen y Stainer, 1968; Meffert y Chang, 1978).

Las células se capturaron por filtración en membranas estériles de policarbonato, 47 mm de diámetro (poro de 0.2 µm; Nucleopore); los filtros fueron transferidos en forma aséptica a cajas de petri. Las cajas se prepararon con cinco filtros de fibra de vidrio (WHATMAN 934-AH) en la base y 20 ml de medio Bg 11 enriquecido con 100 µg/ml de nistatina (Sigma, lote 94H4665) y ciclohexamida (Sigma, lote 75H07185), según Ferris y Hirsh, 1991. El medio se preparó conforme se indica en el anexo 2. La ciclohexamida, inhibe la síntesis de proteínas en las bacterias y afecta las funciones de el ribosoma 80 S en eucariontes (Montagana y Bauer, 1988). La nistatina, previene la presencia de hongos en los cultivos.

Las cajas se incubaron por 15 días bajo los siguientes parámetros ambientales: temperatura 28 ± 2 °C (Allen y Stainer, 1968; Frischknecht y Schneider, 1979), iluminación continua mediante dos lámparas de 20 W (SOLAR T12/SD/LD), ubicadas en la parte superior y lateral de una caja de madera. Las lámparas proporcionaban una intensidad de 200 a 500 lux (Bowyer y Skerman, 1968).

En tubos de ensaye con tapón de rosca (20 x 2 cm) y 20 ml de medio Bg 11 enriquecido, se inoculó una asada del crecimiento obtenido en las cajas petri. Cuando se obtuvo suficiente biomasa (23 días) se adicionó, a cada tubo, 400 µl de solución de nutrientes; elaborada con sacarosa (2.5 %), extracto de levadura (0.5 %) y bactopectona (0.5 %), según Ferris y Hirsh, 1991. También se adicionó 140 µl del antibiótico elegido, a una concentración de 700 µg/ml. Los tubos se mantuvieron en la oscuridad a una temperatura de 25 °C por 24 hrs. Después de la incubación las cianobacterias se cosecharon por centrifugación (Le Borgne, 1991).

El mantener los tubos en la oscuridad impide la fotosíntesis y reproducción de las cianobacterias (Rippka, 1988). La temperatura de 25 °C en conjunto con la solución de nutrientes, ayudan a la proliferación de bacterias y protozoarios (Regan e Ivancic, 1984).

La centrifugación se realizó en tubos de cristal con tapón de rosca para centrífuga (SYM modelo 113) con capacidad de 10 ml. Los tubos fueron centrifugados a 1500 r.p.m durante 25 min (Métodos Normalizados, 1989). El sobrenadante fue desechado y se reponía el volumen (10 ml) con medio Bg 12 para lavar la pastilla (Ferris y Hirsch, 1991). Esta operación se realizó en ocho ocasiones (Meffert y Chang, 1978). Al término la pastilla se sembró en tubos de ensaye con tapón de rosca (20 x 2 cm), según Ukeles, 1973; con 20 ml de medio Bg 12 enriquecido.

V.3.3 Comprobación del aislamiento

Se utilizaron dos pruebas para comprobar el aislamiento:

a) Prueba con bactopectona (Le Borgne, 1991).

Se elaboró con medio Bg11 y 1 g/l de bactopectona en tubos de ensaye (12 x 1.5 cm) con tapa de rosca. Cada tubo contenía 9 ml de medio y un ml de cultivo, se incubaron a 27 °C por 24 hrs, periodo al cual eran observados. Si presentan un aspecto turbio indicaba contaminación bacteriana.

b) Solución GNB (Ferris y Hirsh, 1991).

Se preparó una solución con glucosa (1.0 %) y caldo nutritivo (0.8 %). Se repartió en tubos de ensaye, con los mismos volúmenes antes mencionados. Los tubos se mantuvieron a 25 °C por un mes. Si al término no se observaba turbio el medio se consideraba axénico.

Cotidianamente se revisaban los cultivos en microscopio de contraste de fases; para observar la presencia microorganismos diferentes a las cianobacterias (Allen y Stainer, 1968; Rippka *et al*, 1979; Zevenboom y Mur, 1981).

V. 3 Identificación

La identificación de las cianobacterias se realizó por medio de claves taxonómicas (Desikachary, 1959; Bourrelly, 1970; Kómarek y Anagnostidis, 1986 y 1988), al mismo tiempo que el aislamiento (pues el crecimiento masivo en cajas permitía una mejor observación de colonias y células). Se tomaron en cuenta las siguientes características: tamaño (diámetro y longitud de la célula o filamento), color, forma, agrupación y biomasa exterior (Rippka *et al*, 1979; Wilmotte y Golubic, 1991), para evaluar el tamaño y la forma se tomaron fotografías en microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-35).

V.3.1 Preparación de muestras para microscópio electrónico

Las cianobacterias se fijaron en una solución de buffer fosfatos y glutaraldehído (100 ml), como lo indica el anexo 1. Las células se recuperaron por filtración en membranas de policarbonato de 47 mm de diámetro (poro de 0.2 μm). Cada filtro, se pasó por una batería de alcoholes (50, 60, 70, 80, 90 y 100) por periodos de 20 minutos. Al término los filtros se pasaron por acetona (5 a 10 minutos), se secaron a punto crítico y se cubrieron con oro. Los filtros se montaron en portamuestras y se observaron en microscópio electrónico de barrido (Zimmermann, 1977).

V.4 Crecimiento en diferentes medios de cultivo

Los medios utilizados fueron: Bg 11, Cg 10 (para cianobacterias de agua dulce), F/2 y MN (para cianobacterias marinas); la preparación de los medios se realizó conforme al anexo 2 (McLachlan, 1973; Nichols, 1973; Leborgne, 1991; Borowitzka, 1992). El crecimiento se realizó en matraces Erlenmeyer bafleados de 250 ml (Frischknecht y Schneider, 1979); con 80 ml de medio y cinco ml de muestra, estos se taparon con torundas de gasa y algodón (Le Borgne, 1991).

Los parámetros ambientales se mantuvieron bajo control durante todo el período de cultivo (30 días): la temperatura de 28 ± 2 °C (Frischknecht y Schneider, 1979), iluminación horizontal continua mediante siete lámparas de 13 W (SYLVANIA modelo F13T5D) de luz blanca-fría (Zevenboom y Mur, 1981), dispuestas en la parte superior de una estufa psicotérmica (G-26). La distribución de la intensidad de luz se midió con un luxómetro (Lutron) como se observa en la Figura 6. Las lámparas fueron cubiertas con celofán rojo con el objetivo de acelerar el proceso de fotosíntesis (Kumar y Singh, 1979).

En esta etapa se seleccionó el mejor medio de cultivo para las cianobacterias, observando la frecuencia de crecimiento de las diferentes especies y por evaluación del crecimiento mediante densidad óptica, D.O. (Sorokin, 1973).

Para cuantificar el número de especies presentes en cada medio de cultivo, se extrajo cada tercer día una muestra con pipeta Pasteur estéril. Con cada alícuota se preparó un frotis y se observó a 10 y 40 X en microscópio de contraste de fases (Regan e Ivancic, 1984).

La evaluación del crecimiento mediante D.O. se realizó tomando cinco ml del medio de cultivo cada tercer día en forma aséptica (Sorokin, 1973). Las muestras se midieron en espectrofotómetro (PERKIN - ELMER Lambda 3A UV/VIS) a 664 nm, longitud de onda óptima para la determinación de clorofila a (métodos normalizados, 1989).

V. 5 Prueba de biodegradación de hidrocarburos

Los hidrocarburos utilizados en este trabajo son grado reactivo para síntesis: *m*-xileno (Merck, lote 51790330), tolueno (Merck, lote 5029321587), *p*-xileno (Baker, lote F15645) y el naftaleno (Baker, lote H16730). Las características de los hidrocarburos se encuentran en la sección III.2.1 de los antecedentes.

La prueba de biodegradación se realizó en matraces Erlenmeyer (500 ml) con 200 ml de medio (Frischknecht y Schneider, 1979; Le Borgenc, 1991). Se formaron grupos de cuatro matraces, uno por cada hidrocarburo. Los matraces se sellaron con tapones de plástico (No. 8). La base de cada tapón fue recubierta con cinta-teflón para evitar la volatilización de los hidrocarburos (Cerniglia *et al.*, 1979). Los matraces se inocularon con 10 ml de cultivo (aprox. 2 mg) en fase exponencial (15 días).

Los hidrocarburos se agregaron inmediatamente después con las siguientes concentraciones: tolueno, *m*- y *p*-xileno 10 µl/200 ml (Winters *et al.*, 1976) y el naftaleno 2 mg/200 ml (Cerniglia *et al.*, 1981 b). Todos los hidrocarburos fueron disueltos en etanol (100 µl), este último no inhibe el crecimiento de las cianobacterias (Cerniglia *et al.*, 1981 a).

Se preparon dos controles, uno con el medio de cultivo y los hidrocarburos (H₄), a las concentraciones antes mencionadas; otro, sin los hidrocarburos, con el medio de cultivo y 10 ml de las cianobacterias (SH). Todos los matraces se sometieron a los parámetros ambientales utilizados en la sección V.4 de la metodología durante un periodo de 25 días.

Al término de este tiempo, se cosecharon las cianobacterias por filtración. Y se obtuvo la biomasa final por peso seco, utilizándose paquetes de tres filtros (Whatman No. 1), según Métodos Normalizados, 1989.

Del volumen filtrado (200 ml) se extrajeron y concentraron (hasta 1 ml) los hidrocarburos en diclorometano, según la técnica de extracción de hidrocarburos en agua, especificada en métodos normalizados, 1989. La presencia de los hidrocarburos se detectó mediante un cromatógrafo de gases (Hewlett packard 5890 series II), bajo las siguientes condiciones: temperatura inicial de corrida 50 °C, aumentando 8 °C cada minuto hasta 280 °C, presión de 7.5 *psi* de Helio (presión del gas acarreador), detector de flama (FID) y una columna *ultra 2 cross linked* de 5% fenil-metil silicon (25 x 32 mm con poro de 0.52µm), según Soniassy *et al.*, 1994.

VI. RESULTADOS

Las muestras de agua y sedimento, colectadas en la laguna costera de Santa Alejandrina, presentaban una visible contaminación por hidrocarburos; como se puede observar en la Figura 7.

Después de 15 días de cultivo, las muestras presentaban un notorio tono verdeazul, el cual se puede apreciar en la Figura 8, por el masivo crecimiento de cianobacterias. Con la revisión de las muestras al microscopio, se observó la presencia de bacterias, cianobacterias, clorofitas y protozoarios; de estos grupos se identificaron los géneros que se presentan en el Cuadro 2. Cabe mencionar que *Phacus* y *Chlorella* son géneros característicos de aguas contaminadas por materia orgánica (Mervin, 1989).

Entre las bacterias, se observaron heterótrofas marinas (4.9×10^4) y enterobacterias (5.6×10^4 , promedio), como *Salmonella* y *Escherichia coli*; la presencia de esta última (4.3×10^4), confirma la contaminación de la laguna por materia fecal. También se observó la presencia de *Vibrio*, el cual se identificó por el crecimiento en medio TCBS y el cambio de color (amarillo) característico de la colonia.

La tinción de Gram aplicada a los microorganismos, reveló la presencia de bacterias Gram negativas y positivas, por lo que se decidió utilizar en los antibiogramas algunos antibióticos que inhibieran el crecimiento de ambos grupos (antibióticos de amplio espectro). Como se puede observar en el Cuadro 3, el cloramfenicol, estreptomycin y kanamicina fueron los mas eficientes.

Con la kanamicina se elaboraron concentraciones de 200, 300 y 400 $\mu\text{g/ml}$, está última inhibe el crecimiento bacteriano por 24 hrs, período al cual crecen sobre el medio colonias resistentes, por tanto se decidió aumentar la concentración a 700 $\mu\text{g/ml}$ y esperar un periodo de 48 hrs; con esto se eliminó por completo el crecimiento. Elegido el antibiótico y la concentración, se comenzó el aislamiento de las cianobacterias con crecimientos en cajas de Petri; hasta obtener un cultivo axénico de cianobacterias.

En la Figura 9 se observa el crecimiento progresivo en las placas durante 30 días; el aislamiento y la identificación se realizaron cuando las cajas tenían 15 días de incubación, pues los filamentos se encuentran más separados y la biomasa celular no es tan abundante. Esto permite medir fácilmente el tamaño y observar mejor las características (color, forma, movimiento, vigorosidad, etc.) de cada especie.

Se identificaron las siguientes especies, en base a la morfología externa, tamaño celular y características del cultivo: *Chroococcus cf dispersus* Naegeli, 1849 var *minor* Smith 1920 (Desikachary, pp. 107-108, pl 100, fig. 1-3, 1959), unicelular esférica, Figura 10; *Synechococcus cf elongatus* Naegeli, 1849 (Desikachary, pp. 143, pl. 25, fig. 7-8, 1959), unicelular cilíndrica, Figura 11; y *Pseudanabaena cf acicularis* (Nyg.) comb.n. basionym: *Oscillatoria limnetica* Lecm var *acicularis* (Desikachary, pp. 226, pl. 37, fig 3, 1959; Anagnostidis y Kómarek, pp. 383, pl 21, fig 6, 1988), filamentosa, Figura 12. Las características de dichas especies se describen dentro de los Cuadros 4,5 y 6.

Durante el periodo de crecimiento en medios de cultivo, se observó una continua variación en la tonalidad de cada cultivo, este cambio se observa en la Figura 13, la cual muestra cultivos con 20 días de incubación. El medio MN, observó un marcado tono verdeazul, muy viscoso; mientras que los medios Cg 10 y F/2, se presentó un color verde pálido debido a la baja proliferación de células. En el medio Bg 11 el crecimiento fue en pequeñas capas, tanto en la base como en las paredes del matraz, con un fuerte tono verdeazul.

Las curvas de crecimiento obtenidas para cada medio se observan en la Figura 14, donde los medios MN y Bg 11 presentan los mayores crecimientos. Es importante mencionar que ambos medios entran en fase exponencial a diferentes tiempos; 9 días para el medio MN y 15 en el medio Bg 11. También se corrobora el bajo crecimiento presentado por los medios F/2 y Cg 10.

Al observar alicuotas de cada medio al microscopio, se encontró una mayor proliferación de *C. dispersus* y *S. elongatus* en el medio MN, mientras que en el medio Bg 11 la especie *P. acicularis* formaba pequeñas redes, donde se adherían las especies unicelulares manteniéndose así una proporción, por lo que se escogió este medio para continuar con la etapa de biodegradación.

En la etapa de biodegradación, el crecimiento de las cianobacterias en los hidrocarburos fue lento los primeros ocho días, a comparación del control SH, el cual observaba un mayor incremento en biomasa.

Al terminó del periodo de incubación (25 días), la coloración adquirida por los cultivos era distinta, como se puede observar en la Figura 15. Las diferentes tonalidades permitieron efectuar una evaluación primaria sobre las degradaciones, colocando al tolueno como el hidrocarburo menos inhibitorio para las especies de cianobacterias, seguido de los xilenos (*m-* y *p-*) y por último del naftaleno, cuya coloración vario constantemente durante la incubación.

Por medio de la comparación de biomásas (peso seco), se observó que el mayor crecimiento fue en tolueno con una cosecha de 3.590 g, seguido de el *p*-xileno (3.180 g) y el *m*-xileno (3.085 g), donde los pesos obtenidos fueron casi similares, mientras que en naftaleno se presentó una biomasa de 2.092 g, mucho menor que las anteriores.

Se realizó una evaluación al microscopio de las especies presentes en cada cultivo. En el matraz correspondiente al tolueno se observó abundante crecimiento de *P. acicularis*, crecimiento regular de *C. dispersus* y la ausencia por parte de *S. elongatus*. Las células presentaban abundante división y vigorosidad, con una fuerte tonalidad verdeazul.

En el *p*-xileno, la proporción de especies estaba marcada para *P. acicularis*, escasa para *C. dispersus* y nula para *S. elongatus*. Las células observaban buena vigorosidad y exteriormente el cultivo mostraba un tono verdeazul. Para el *m*-xileno se registró solo crecimiento para la especie *P. acicularis* de manera regular, con un tono verdeazul pálido.

Con el naftaleno se presentó un cambio de coloración durante todo el cultivo pasando del tono verdeazul pálido a un color blanquecino; *P. acicularis*, aunque escasa era la única especie presente.

Por último, se realizó un análisis por medio de cromatografía de gases de los controles (H_4) y filtrados obtenidos (libres de cianobacterias). En la Figura 16 se observan los tiempos de retención para cada uno de los hidrocarburos (*m*- y *p*-xileno, tolueno y naftaleno), este cromatograma pertenece a los controles (H_4) y sirvió para comprobar la presencia de estos después de 25 días de incubación.

En las Figuras 17 y 18 se presentan los cromatogramas obtenidos después del crecimiento de las cianobacterias en los cuatro hidrocarburos. En la Figura 17 el tolueno, *p*- y *m*-xileno, según los tiempos de retención obtenidos para cada hidrocarburo (Figura 16), no están presentes después de dicho periodo de incubación. Es importante mencionar que se detectaron otros compuestos después del minuto 6, que no se observan en el cromatograma, por ser este solo una integración del minuto 2 al 6 de la corrida.

En la Figura 18 es evidente la presencia del naftaleno, esta última Figura muestra una ampliación del pico del naftaleno, por lo que pudiera parecer que en vez de existir una degradación del hidrocarburo, este hubiera aumentado su concentración. Cabe recordar también que todos los hidrocarburos se concentraron de volúmenes de 200 a 1 ml, así pues este hidrocarburo al no ser utilizado por las cianobacterias quedó en su concentración original (2mg/1ml).

El aislamiento, purificación e identificación de las cianobacterias cubre uno de los objetivos generales de este trabajo, pues en la actualidad se requiere seleccionar microorganismos con capacidad de biodegradación y biorestauración, para utilizarlos posteriormente dentro de cuerpos de agua contaminados por hidrocarburos.

La identificación de las especies, *Chroococcus dispersus* var *minor*, *Synechococcus elongatus* y *Pseudanabaena acicularis*, se realizó en base a los tamaños celulares y a las características morfológicas observadas en cada especie (cuadros 4, 5 y 6); también se tomó en cuenta la distribución de las mismas dentro de la laguna (agua o sedimento). La literatura (Desikachary, 1959; Bourrelly, 1970; Kómarek y Anagnostidis, 1986 y 1988), describe a *C. dispersus* y *P. acicularis* como especies planctónicas de lagos. Esta última (*P. acicularis*) forma capas sobre el sedimento y superficie de lagos, incluyendo dentro de las redes bacterias, levaduras y protozoarios; por último *S. elongatus* habita tanto en aguas marinas como dulceacuícolas (Rippka *et al*, 1979; Staley *et al*, 1989).

En base a estos datos, se eligieron los medios de cultivo F/2 y MN (marinos) Cg 10 y Bg 11 (para cianobacterias de agua dulce), con diferentes concentraciones de sales, vitaminas y pH, según se describe en el anexo 2. La observación al microscopio fue fundamental para elegir el medio que permitiera el crecimiento de las tres especies y lograra una buena vigorosidad de las células.

Durante la incubación (30 días), se presentaron diferentes coloraciones en los cultivos, dicha variación se debe a las diferentes tonalidades (fuerte, pálido, brillante, etc), que caracterizan a cierta especie (Staley *et al* 1989). La tonalidad junto con la apariencia externa del cultivo, sirvieron también para conocer la o las especies predominantes en los medios. Cabe señalar que *C. dispersus* y *S. elongatus* forman cultivos con apariencia gelatinosa, pues necesitan la secreción de mucilago para formar agrupaciones entre las células (Desikachary, 1959). En cambio *P. acicularis*, necesita de un sustrato para deslizarse, como la mayoría de las especies con movimiento, según Lamont (1969) y Häder (1987); esta es la razón por la cual se observó siempre adherida a las paredes y fondo del matraz (Kómarek y Anagnostidis, 1986 y 1988).

Los mejores crecimientos se dieron en los medios MN (marino) y Bg 11 (de agua dulce), según se observa en la Figura 14. En el primero se obtuvo un incremento de las especies *S. elongatus* y *C. dispersus*, mientras que en el Bg 11 se observó el crecimiento de las tres especies. La explicación a este hecho se basa en que el requerimiento nutricional para cada especie es distinto. Según Staley *et al* (1989), *S. elongatus* y *C. dispersus* no necesitan componentes orgánicos, vitaminas, aminoácidos, ni elevadas concentraciones de nitrógeno para su crecimiento, por esta razón dichas especies se presentaron en mayor o menor abundancia en todos los medios. Por otra parte, *P. acicularis* requiere altas concentraciones de nitrógeno y el medio con la mayor cantidad de este elemento es justamente el Bg 11, por tanto es lógico que el desarrollo de dicha especie se presentara en ese medio.

Los bajos crecimientos en los medios F/2 y Cg 10, puede deberse también a factores nutricionales; según Robbin y Whittick (1987), cuando algún elemento (sales aminoácidos, vitaminas, azúcares, etc) no es necesario para el desarrollo de una especie, este puede causar efectos inhibitorios sobre el crecimiento.

En cuanto a la etapa de degradación, se observó un crecimiento lento en todos los cultivos durante los primeros ocho días de incubación. Según Batterton y colaboradores (1978), el retraso se debe a una reacción o adaptación por parte de las células a la toxicidad de los hidrocarburos.

La introducción del hidrocarburo a la células, depende en gran parte, de la capa protectora (pared, vaina, etc) que las rodea; según Fogg (1978 b), las cianobacterias poseen una vaina, que varía conforme a la especie, en grosor y color. Dicha característica, vuelve a las cianobacterias más resistentes a la toxicidad de los hidrocarburos que a las clorofitas (Winters, 1976; Lobban *et al*, 1985). *S. elongatus* y *C. dispersus*, son especies que carecen de vaina, *P. acicularis* por el contrario, presenta vaina delgada (Desikachary, 1959; Kómarek y Anagnostidis, 1986 y 1988). Por esta razón, la única especie que permaneció en los cultivos durante toda la incubación fue *P. acicularis*, pues al poseer vaina la hace más resistente que las especies unicelulares. No obstante, algunas especies pueden metabolizar bajas concentraciones de hidrocarburos, aún careciendo de esta característica (Morgan y Watkinson, 1994), como fue el escaso crecimiento de *C. dispersus* en tolueno y en *m*- y *p*-xileno.

El desarreglo metabólico es también una respuesta a la toxicidad de cierto hidrocarburo; los efectos son variados, cambios en la fotosíntesis, respiración, crecimiento, despigmentación, cambios morfológicos, etc (Michael, 1977; Lobban *et al*, 1985). En este caso, se registró la pérdida de la pigmentación por parte de *P. acicularis*, cuando esta creció sobre naftaleno. Se puede decir entonces que los hidrocarburos bicíclicos como el naftaleno, causan efectos visibles sobre las cianobacterias y ejercen un retraso en la transformación del compuesto.

Según Leahy y Colwell (1990), los factores físicos como la temperatura, oxígeno, concentración de nutrimentos inorgánicos (nitrógeno y fósforo), salinidad, presión y pH, además de los factores químicos, toxicidad de cada hidrocarburo, concentración del compuesto en el medio, estructura química (lineal o aromático); también pueden retrasar o anular el proceso de degradación. Shaw (1977), dice que la concentración de hidrocarburos en la columna de agua varía en cuanto a los pesos moleculares y a las características físicas del hidrocarburo (solubilidad en agua); aunque para McAuliffe (1977) la cantidad de cierto compuesto, depende de la composición química del petróleo, edad geológica y área geográfica donde pertenece. En México, el petróleo extraído de la sonda de Campeche, denominado Maya pesado, constituye uno de los crudos más tóxicos para plantas y animales, pues está formado por un 20 % de hidrocarburos aromáticos (PEMEX, 1988).

Inmediatamente después de ocurrir un derrame, se forma una capa o película que sufre una serie de alteraciones químicas y físicas (evaporación de componentes volátiles, emulsificación y sedimentación); estos cambios dejan en la superficie del agua una concentración de $1\mu\text{g/ml}$ de los componentes aromáticos.

Retomando los dos párrafos anteriores, los hidrocarburos utilizados en este trabajo no son solubles en agua, pero sí muy volátiles (tolueno, *m*- y *p*-xileno), por lo tanto al ocurrir las alteraciones químicas y físicas, la concentración de los mismos en la superficie del agua disminuye. Por otra parte, el naftaleno posee un peso molecular mayor, razón por la cual se encuentra en mayor cantidad en el sedimento que en la superficie del agua (Daly *et al*, 1972; Atlas, 1991).

Según trabajos de Dunstan (1975), Cerniglia *et al*, (1979), Gaur y Kumar (1981) y Al Hasan *et al* (1994), las cianobacterias solo pueden transformar bajas concentraciones de hidrocarburos. En este trabajo se estudiaron las concentraciones propuestas por dichos autores, ya que *Chroococcus dispersus*, *Synechococcus elongatus* y *Pseudanabaena acicularis*, son especies planctónicas y por tanto se encuentran expuestas a bajas cantidades de estos compuestos.

Los mejores crecimientos, según la biomasa obtenida, se presentaron en tolueno, *m*- y *p*-xileno. Después de 25 días de incubación, se evaluó la presencia de los compuestos en el medio de cultivo por medio de cromatografía; en la Figura 17 se demuestra que los hidrocarburos antes mencionados ya no están presentes en el medio después de este periodo. Se podría pensar que este hecho se deba a que los compuestos se evaporaron, pero al recubrir con cinta teflón los tapones que sellaban cada matraz elimina dicha posibilidad; el teflón evita la evaporación de compuestos como el tolueno, bencenos y xilenos (Cerniglia *et al*, 1979).

En el caso del naftaleno, este sigue presente (Figura 18) después de 25 días y con un exceso crecimiento de *P. acicularis*; cabe señalar que esta cianobacteria también se localiza en sedimentos donde como ya se mencionó se acumula el naftaleno, por lo tanto no lo transforma solo es resistente a la toxicidad del compuesto. Además el naftaleno, requiere mayor energía para la biodegradación (Atlas, 1991), mientras que los hidrocarburos aromáticos con sustituyentes metil como el tolueno y los xilenos no la requieren (Daly *et al*, 1972).

El tolueno, *m*- y *p*-xileno suelen ser más fácilmente biodegradados que los compuestos poliaromáticos (Walker *et al*, 1976), pues el ataque enzimático inicial de los hidrocarburos aromáticos simples puede darse en el anillo o en el grupo metil como se observa en las Figuras 2, 3 y 4; en cambio la transformación del naftaleno, debe comenzar en uno de los anillos hasta romperlo para poder continuar con el segundo, como se observa en la Figura 1 (Girard, 1988).

La vía principal, utilizada por los microorganismos procariontes para la degradación de compuestos es la *cis*-hidroxilación (Atlas, 1991; Neilson, 1994; Smith, 1994; Stabnikova *et al*, 1995), se ha demostrado que esta ruta es seguida por bacterias, levaduras y en el caso de la degradación del naftaleno por algunas especies de cianobacterias (Cerniglia *et al*, 1979). Recientemente se han propuesto vías alternas para géneros específicos de bacterias y levaduras, pues algunos de estos organismos poseen genes especiales para la biodegradación de tolueno y benceno (Smith, 1994; Neilson, 1994).

Inmediatamente después de ocurrir un derrame, se forma una capa o película que sufre una serie de alteraciones químicas y físicas (evaporación de componentes volátiles, emulsificación y sedimentación); estos cambios dejan en la superficie del agua una concentración de $1\mu\text{g/ml}$ de los componentes aromáticos.

Retomando los dos párrafos anteriores, los hidrocarburos utilizados en este trabajo no son solubles en agua, pero sí muy volátiles (tolueno, *m*- y *p*-xileno), por lo tanto al ocurrir las alteraciones químicas y físicas, la concentración de los mismos en la superficie del agua disminuye. Por otra parte, el naftaleno posee un peso molecular mayor, razón por la cual se encuentra en mayor cantidad en el sedimento que en la superficie del agua (Daly *et al*, 1972; Atlas, 1991).

Según trabajos de Dunstan (1975), Cerniglia *et al*, (1979), Gaur y Kumar (1981) y Al Hasan *et al* (1994), las cianobacterias solo pueden transformar bajas concentraciones de hidrocarburos. En este trabajo se estudiaron las concentraciones propuestas por dichos autores, ya que *Chroococcus dispersus*, *Synechococcus elongatus* y *Pseudanabaena acicularis*, son especies planctónicas y por tanto se encuentran expuestas a bajas cantidades de estos compuestos.

Los mejores crecimientos, según la biomasa obtenida, se presentaron en tolueno, *m*- y *p*-xileno. Después de 25 días de incubación, se evaluó la presencia de los compuestos en el medio de cultivo por medio de cromatografía; en la Figura 17 se demuestra que los hidrocarburos antes mencionados ya no están presentes en el medio después de este periodo. Se podría pensar que este hecho se deba a que los compuestos se evaporaron, pero al recubrir con cinta teflón los tapones que sellaban cada matraz elimina dicha posibilidad; el teflón evita la evaporación de compuestos como el tolueno, bencenos y xilenos (Cerniglia *et al*, 1979).

En el caso del naftaleno, este sigue presente (Figura 18) después de 25 días y con un escaso crecimiento de *P. acicularis*; cabe señalar que esta cianobacteria también se localiza en sedimentos donde como ya se mencionó se acumula el naftaleno, por lo tanto no lo transforma solo es resistente a la toxicidad del compuesto. Además el naftaleno, requiere mayor energía para la biodegradación (Atlas, 1991), mientras que los hidrocarburos aromáticos con sustituyentes metil como el tolueno y los xilenos no la requieren (Daly *et al*, 1972).

El tolueno, *m*- y *p*-xileno suelen ser más fácilmente biodegradados que los compuestos poliaromáticos (Walker *et al*, 1976), pues el ataque enzimático inicial de los hidrocarburos aromáticos simples puede darse en el anillo o en el grupo metil como se observa en las Figuras 2, 3 y 4; en cambio la transformación del naftaleno, debe comenzar en uno de los anillos hasta romperlo para poder continuar con el segundo, como se observa en la Figura 1 (Girard, 1988).

La vía principal, utilizada por los microorganismos procariontes para la degradación de compuestos es la *cis*-hidroxilación (Atlas, 1991; Neilson, 1994; Smith, 1994; Stabnikova *et al*, 1995), se ha demostrado que esta ruta es seguida por bacterias, levaduras y en el caso de la degradación del naftaleno por algunas especies de cianobacterias (Cerniglia *et al*, 1979). Recientemente se han propuesto vías alternas para géneros específicos de bacterias y levaduras, pues algunos de estos organismos poseen genes especiales para la biodegradación de tolueno y benceno (Smith, 1994; Neilson, 1994).

VIII. CONCLUSIONES

1. - Las descargas de aguas municipales han elevado el número de bacterias, provocando la presencia de *Vibrio*, *Salmonella* y *Escherichia coli*, agentes causales de enfermedades de importancia médica; poniendo en riesgo la salud de la población y la fauna cercana al lugar.
2. - Se realizó el aislamiento, purificación e identificación de las especies: *Pseudanabaena acicularis* (filamentosa), *Synechococcus elongatus* y *Chroococcus dispersus* var *minor* (unicelulares).
3. - El medio Bg 11, permite el crecimiento de las tres especies de cianobacterias, proporcionando una buena vigorosidad a las células.
4. - Se demostró la degradación de tolueno *m*- y *p*-xileno, por las especies *P. acicularis* y *C. dispersus*. Mientras que *S. elongatus*, no presenta dicha capacidad.
5. - El naftaleno, causa inhibición sobre las especies unicelulares y provoca despigmentación en *P. acicularis*.
6. - El crecimiento de cianobacterias en la laguna Santa Alejandrina, indica la biorrestauración del cuerpo de agua por vía natural, donde dichas especies, aportan oxígeno por vía fotosintética para la transformación de complejas mezclas de hidrocarburos y participan en la degradación de algunos derivados; contribuyendo a una biodegradación más eficiente, en menor tiempo y de manera natural.

IX. SUGERENCIAS

Este estudio constituye solo la primera parte de una serie de investigaciones, de cuyos resultados depende el comienzo de la biorestauración de ambientes contaminados con hidrocarburos.

En este trabajo no se corroboró ninguna vía para la degradación del tolueno, naftaleno, *m*- y *p*-xileno; sin embargo sería recomendable para próximos trabajos, estudiar las vías de degradación que siguen las cianobacterias en la transformación de hidrocarburos (tanto lineales como aromáticos), analizar si dichos microorganismos poseen genes especiales para la degradación de ciertos compuestos y cuantificar las tasas de biodegradación de varias especies, seleccionando aquellas que se destaquen por su resistencia a la toxicidad de los hidrocarburos.

Otro aspecto importante que se observó durante esta investigación fue la depigmentación de las células al entrar en contacto con el hidrocarburo, por tanto sería recomendable realizar una evaluación de los pigmentos (ej. clorofila *a*), para conocer el mecanismo de esta respuesta.

Por último se sugiere la formación y evaluación de consorcios, donde la acción conjunta de bacterias y levaduras con altas tasas de degradación, embebidas en los mantos de cianobacterias transformen complejas mezclas de hidrocarburos de manera eficiente y natural.

X. CUADROS Y FIGURAS

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	<u>Pags.</u>
Cuadro 1. Géneros de microorganismos degradadores de hidrocarburos.	36
Figura 1. Vía de degradación del naftaleno.	37
Figura 2. Vía de degradación del tolueno.	38
Figura 3. Vía de degradación del <i>m</i> -xileno.	39
Figura 4. Vía de degradación del <i>p</i> -xileno.	40
Figura 5. Localización geográfica de la laguna Santa Alejandrina.	41
Figura 6. Área de iluminación.	42
Figura 7. Frasco con muestra original de agua.	43
Figura 8. Crecimiento cianobacterias.	44
Cuadro 2. Microorganismos observados en las muestras.	45
Cuadro 3. Resultados del antibiograma.	45
Figura 9. Crecimiento en cajas Petri.	46
Figura 10. <i>Chroococcus dispersus</i> var <i>minor</i> Naegeli, 1849.	47
Figura 11. <i>Synechococcus elongatus</i> Naegeli, 1849.	48
Figura 12. <i>Pseudanabaena acicularis</i> , Nygaard 1949.	49
Cuadro 4. Características morfológicas de la especie <i>Chroococcus dispersus</i> .	50
Cuadro 5. Características morfológicas de la especie <i>Synechococcus elongatus</i>	51
Cuadro 6. Características morfológicas de la especie <i>Pseudanabaena acicularis</i> .	52
Figura 13. Crecimiento de cianobacterias en diferentes medios de cultivo.	53
Figura 14. Evaluación del crecimiento por medición de clorofila "a".	54
Figura 15. Degradación de hidrocarburos.	55
Figura 16. Cromatograma, donde se presentan los tiempos de retención para cada hidrocarburo.	56
Figura 17. Cromatograma, correspondiente a la degradación del <i>p</i> -, <i>m</i> -xileno y tolueno.	57
Figura 18. Cromatograma, correspondiente a la degradación del naftaleno.	58

CUADRO 1. Géneros de microorganismos degradadores de hidrocarburos, aislados de ambientes acuáticos (Parkinson, 1973; Schwartz y Leathen, 1976; Cerniglia *et al*, 1980 (a); Floodgate, 1982; Girard, 1988; Wilson y Jones, 1993; Al Hasan *et al*, 1994; Sorkhoh *et al*, 1995).

BACTERIAS	HONGOS FILAMENTOSOS	LEVADURAS
<i>Achromobacter</i>	<i>Absidia</i>	<i>Candida</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Acremonium</i>	<i>Cryptococcus</i>
<i>Actinomyces</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Debaryomyces</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Endomyces</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Cephalosporium</i>	<i>Hansenula</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Chaetomium</i>	<i>Mycotorula</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Chloridium</i>	<i>Pichia</i>
<i>Bacterium</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Rhodotorula</i>
<i>Beneckea</i>	<i>Colletotrichum</i>	<i>Torulopsis</i>
<i>Brevibacterium</i>	<i>Cunninghamella</i>	<i>Trichosporon</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Dematium</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>Flovobacterium</i>	<i>Fusarium</i>	
<i>Methanomonas</i>	<i>Gliocladium</i>	
<i>Micrococcus</i>	<i>Graphium</i>	CYANOBACTERIAS
<i>Micromonospora</i>	<i>Helicostylum</i>	
<i>Mycobacterium</i>	<i>Helminthosporium</i>	<i>Agmenellum</i>
<i>Nocardia</i>	<i>Monilia</i>	<i>Anabaena</i>
<i>Proactinomyces</i>	<i>Mucor</i>	<i>Aphanocapsa</i>
<i>Pseudobacterium</i>	<i>Oidiodendron</i>	<i>Coccochloris</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Paecilomyces</i>	<i>Microcoleus</i>
<i>Sarcina</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Nostoc</i>
<i>Spirillum</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>Oscillatoria</i>
<i>Streptomyces</i>	<i>Scolecobasidium</i>	<i>Phormidium</i>
<i>Vibrio</i>	<i>Spicaria</i>	
	<i>Syncephalastra</i>	ALGAS
	<i>Trichoderma</i>	
		<i>Amphora</i>
		<i>Chlamydomonas</i>
		<i>Chorella</i>
		<i>Cylindrotheca</i>
		<i>Petalonia</i>
		<i>Porphyridium</i>
		<i>Prototheca</i>
		<i>Ulva</i>

FIGURA 1. Vías de degradación del naftaleno, utilizadas por bacterias y levaduras (Girard, 1988; Neilson, 1994; Smith, 1994).

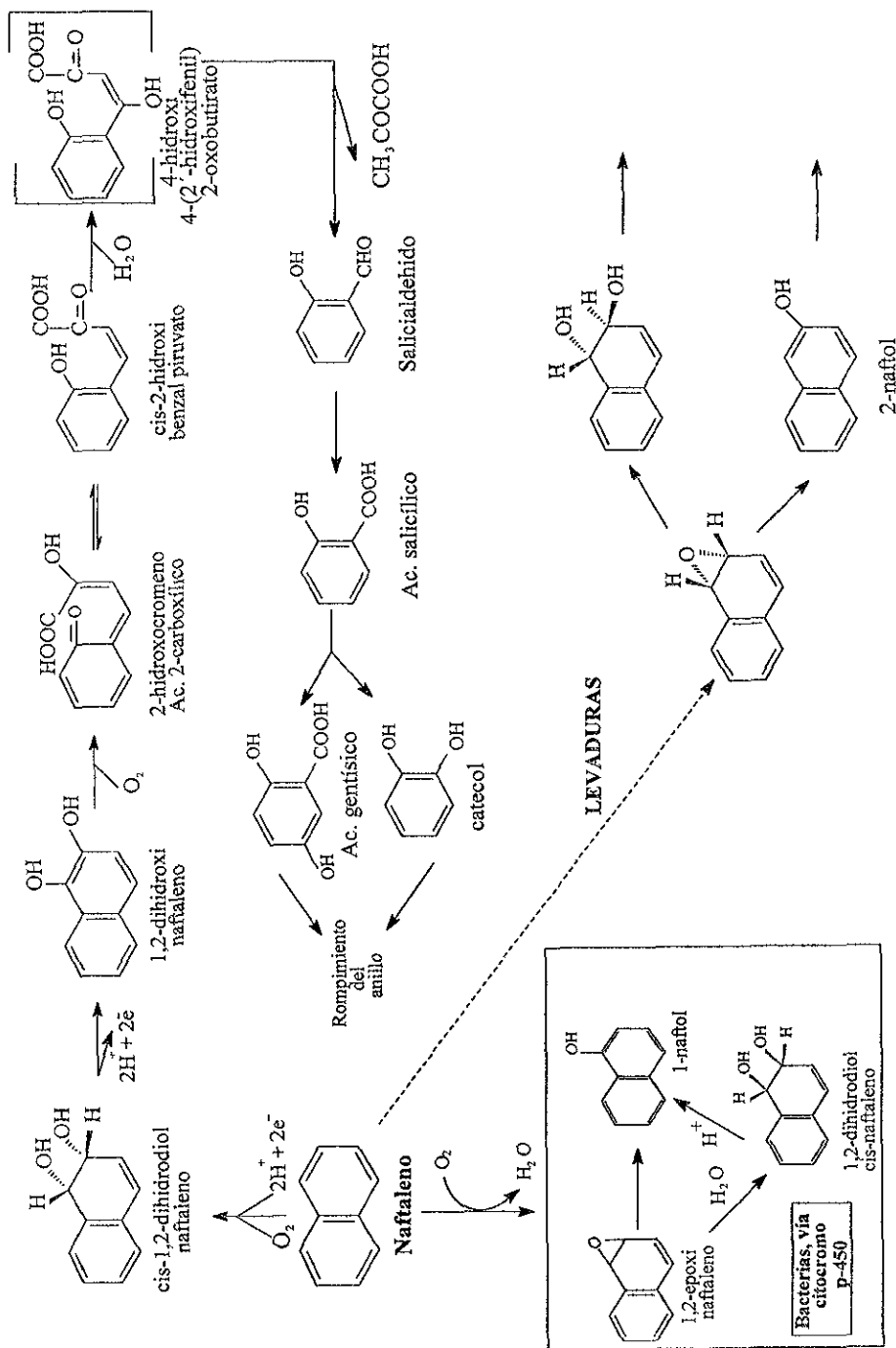


FIGURA 2. Vías de degradación del tolueno, utilizadas por bacterias y levaduras (Girard, 1988; Neilson, 1994; Smith, 1994).

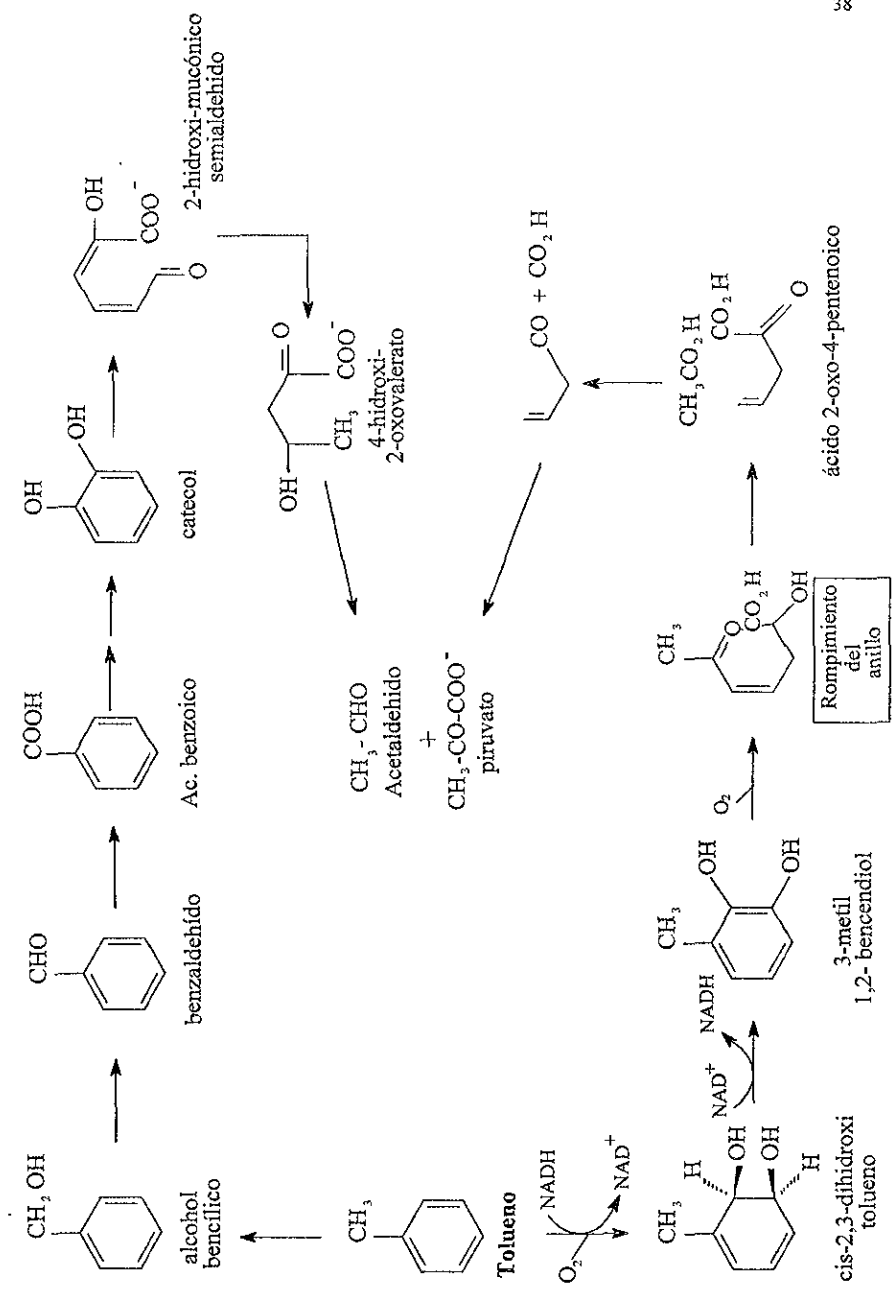


FIGURA 3. Vías de degradación del m-xileno, utilizadas por bacterias y levaduras (Smith, 1994).

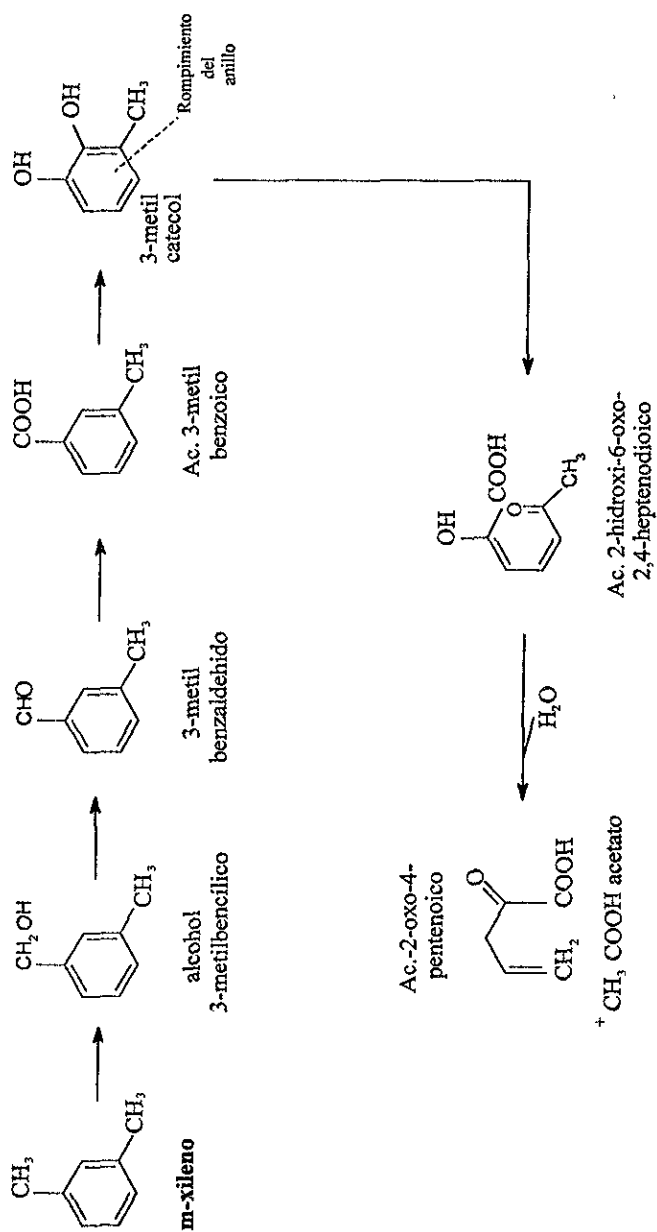


FIGURA 4. Vías de degradación del p-xileno, utilizadas por bacterias y levaduras (Neilson, 1994; Smith, 1994).

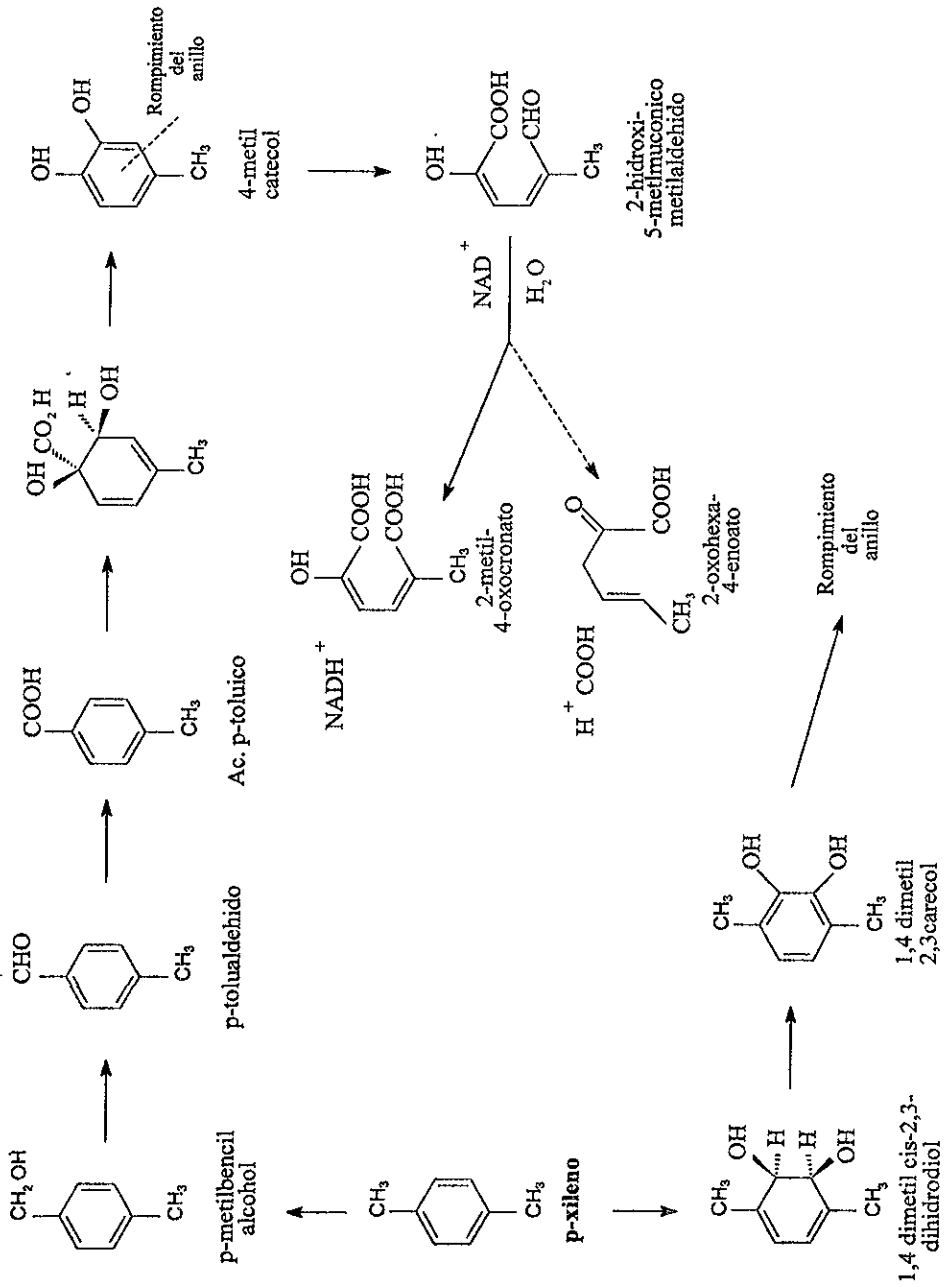
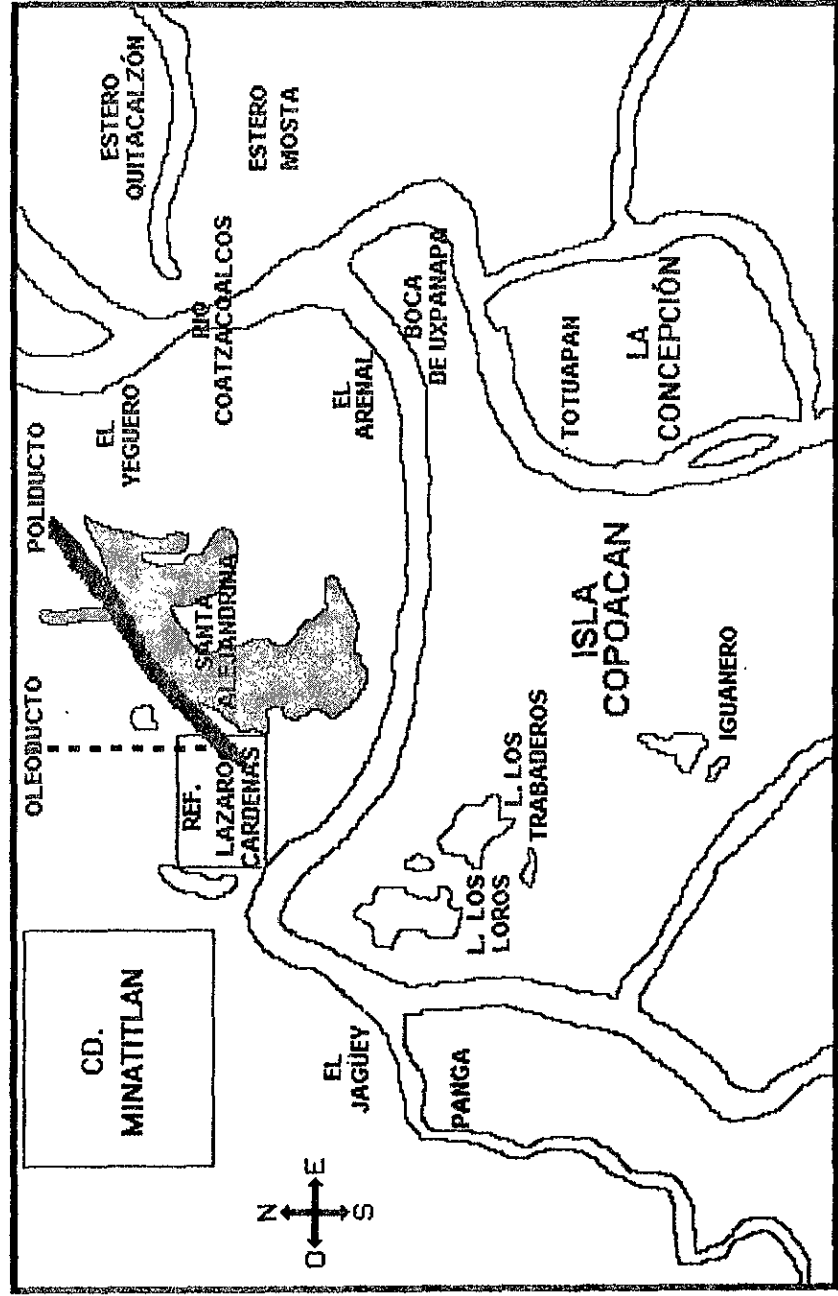


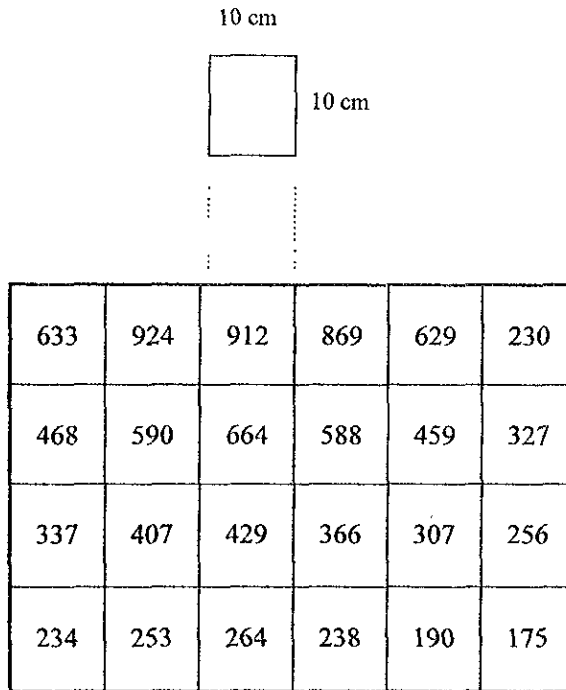
FIGURA 5. Localización geográfica de la laguna "Santa Alejandrina" INEGI, 1986.



LONGITUD W 94°30'10" - 94°31'34" LATITUD N 17°58'03" - 17°59'48"

FIGURA 6. Intensidad luminosa (lux), proporcionada por siete lámparas (SYLVANIA), a 25 cm de separación de los cultivos.

Área de iluminación: 2400 cm².



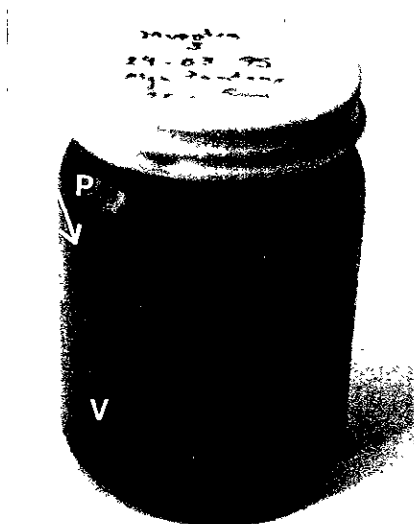


FIGURA 7. Frasco con muestra de agua, tomada en la laguna “Santa Alejandrina”; es importante remarcar el color verdeazul (V) y la mancha de petróleo en la parte superior del frasco (P).

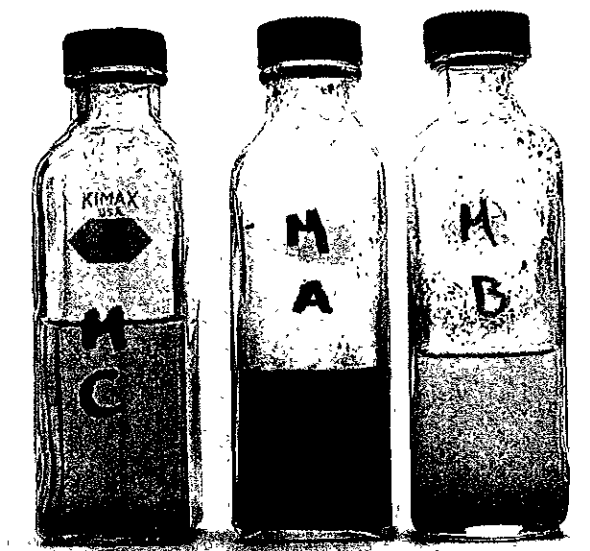


FIGURA 8. En la fotografía se observa, el tono verde azul característico de un crecimiento masivo de cianobacterias, después de 15 días de cultivo (Frasco MB). En el frasco marcado con MC, se observan filamentos de cianobacterias adheridos a las paredes; mientras en el frasco con las iniciales MA, no se obtuvo registro de crecimiento.

CUADRO 2. Microorganismos observados en las muestras de agua y sedimento de la laguna "Santa Alejandrina". Las claves utilizadas para la identificación de algunos géneros corresponden a Mervin, 1989.

Microorganismos	Géneros	Porción representativa
Bacterias	Heterótrofas marinas	4.9×10^4
	<i>Escherichia coli</i>	4.3×10^4
	<i>Salmonella</i>	1.2×10^4
	<i>Vibrio</i>	1.9×10^3
Cianobacterias	Filamentosa	Muy abundante
	Unicelulares	Muy abundante
Clorofitas	<i>Chlorella</i>	Abundante
	<i>Closterium</i>	Excasa
	<i>Scenedesmus</i>	Abundante
Protozoarios	<i>Phacus</i>	Regular
	<i>Euglena</i>	Excasa

CUADRO 3. Antibióticos y halos de inhibición; resultados del antibiograma aplicado a las colonias aisladas de las muestras originales.

Antibiótico	Halo (mm)	Sensibilidad
Ampicilina	14	Intermedia
Cefoxitina	8	Resistente
Cloranfenicol	27	<u>Suceptible</u>
Estreptomicina	21	<u>Suceptible</u>
Kanamicina	24	<u>Suceptible</u>
Penicilina G	14	Resistente
Tetraciclina	11	Resistente

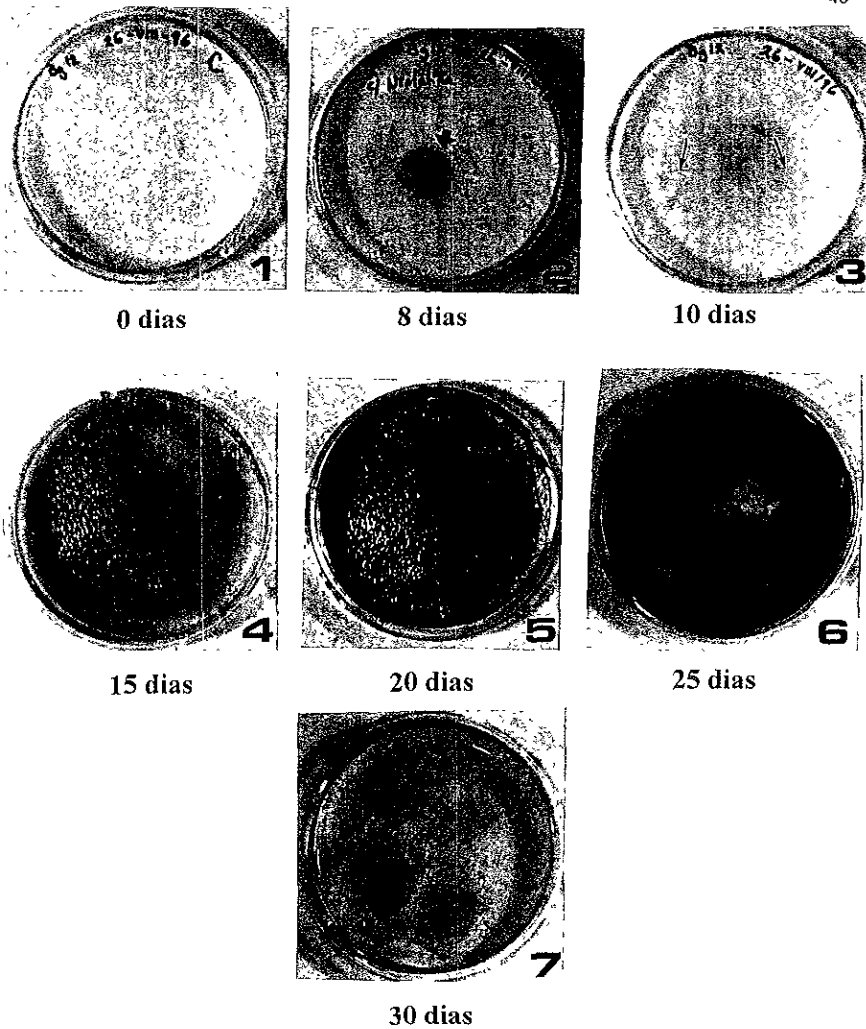


FIGURA 9. En esta serie de fotografías, se observa el crecimiento progresivo en las placas durante 30 días, como es evidente los filtros se cubren totalmente a los 15 días de incubación, presentando un tono verdeazul brillante (fotografía 4), mientras que al termino de los 30 días, el color cambia de verde fuerte a amarillo obscuro, indicando la muerte celular.

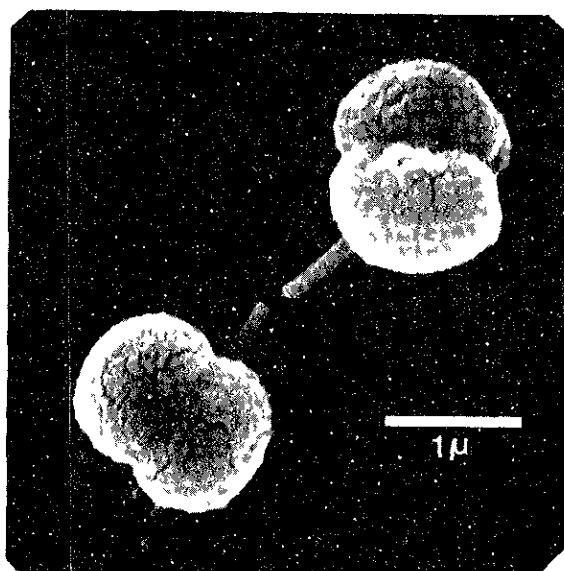


FIGURA 10. Micrografía de barrido de células de *Chroococcus dispersus* Näegeli 1849 var. *minor* Smith 1920, en división (16000 X).



FIGURA 11. Micrografía de barrido de una célula de *Synechococcus elongatus*, Näegeli 1849 (16000 X).

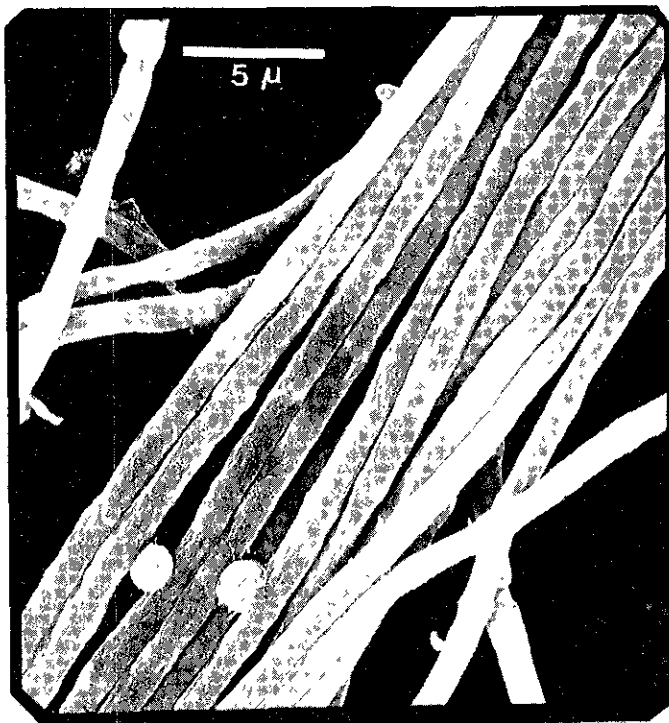


FIGURA 12. Micrografía de barrido de una red de filamentos de *Pseudanabaena acicularis*, Nygaard 1949 comb.n. basionym: *Oscillatoria limnetica*, Leem var *acicularis*, Nygaard 1949 (4000X).

CUADRO 4. Características morfológicas de la especie *Chroococcus dispersus* Nägeli, 1849 var. *minor* Smith, 1920 (Desikachary, 1959; Bourrelly, 1970; Rippka et al, 1979; Kómarek y Anagnostidis, 1986 y 1988; Staley et al, 1989).

ESPECIE	CLASIFICACION	CARACTERISTICAS	
<p><i>Chroococcus dispersus</i> Nägeli, 1849 var. <i>minor</i> Smith, 1920</p>	<p>Class: Cyanophyceae, Sachs 1874 Orden: Chroococcales, Wetits 1924 Familia: Chroococcaceae, Näg. 1849 Género: <i>Chroococcus</i>, Näg. 1849 Especie: <i>dispersus</i>, Variedad: <i>minor</i>, Smith, 1920</p>	Color	Presentan un marcado color verde azul, muy brillante.
		Tamaño	Células de 1.75 a 2.5 μ , cuando se agrupan miden de 15 a 20 μ .
		Morfología	Células esféricas, de forma parecida a los cocos bacterianos, raramente solitarias, forman agrupaciones de 4, 8, 16 o más células, unidas o envueltas en mucilago, en masa observan un aspecto viscoso o gelatinoso, sin vaina, se reproducen por división celular en tres direcciones, no presentan nonocitos.
		Fisiología	En cultivo, se observan células en continua división y unidas en cadenas o formando figuras irregulares; no poseen adaptación cromática; no necesitan azúcares para crecer.
		Distribución	Forman parte del fitoplánton, en lagos.

CUADRO 5. Características morfológicas de la especie *Synechococcus elongatus* Näegeli 1849 (Desikachary, 1959; Bourrelly, 1970; Rippka *et al.*, 1979; Kómarek y Anagnostidis, 1986 y 1988; Staley *et al.*, 1989).

ESPECIE	CLASIFICACION	CARACTERISTICAS	
<i>Synechococcus elongatus</i> Näegeli, 1849	Clase: Cyanophyceae, Sachs 1874 Orden: Chroococcales, Wetits 1924 Familia: Microcystaceae, Elenk 1933 Subfamilia: Synechococcoideae, Kom. y Anagn. 1986 Género: <i>Synechococcus</i> , Näg. 1849 Especie: <i>elongatus</i> , Näg. 1849	Color	Verdeazul intenso
		Tamaño	Células de 1.4 - 2 μ de ancho, 1 $\frac{1}{2}$ a 3 veces más largas que anchas.
		Morfología	Células ovales, cilíndricas, solitarias o de 2-4 células juntas, unidas por mucilago lo que causa una apariencia viscosa; sin vaina; contenido homogéneo; no móviles; división binaria en un solo plano perpendicular, sin nonocitos.
		Fisiología	Crecen en un intervalo de temperatura de 28 - 35 ° C, pH de 7.5 a 8.5, no necesitan altas concentraciones de sales ni tampoco vitamina B ₁₂ , no requiere azúcares para su crecimiento; son incapaces de utilizar componentes orgánicos como recurso, ej. carbón.
		Distribución	Se encuentran sumergidas en rocas de lagos.

CUADRO 6. Características morfológicas de la especie *Pseudanabaena acicularis* Nygaard 1949 (Desikachary, 1959; Bourrelly, 1970; Rippka et al, 1979; Kómarek y Anagnostidis, 1986 y 1988; Staley et al, 1989).

ESPECIE	CLASIFICACION	CARACTERISTICAS	
<p><i>Pseudanabaena acicularis</i> (Nyg.) comb.n. basionym: <i>Oscillatoria limnetica</i> Leem var <i>acicularis</i> Nygaard, 1949</p>	<p>Clase: Cyanophyceae, Sachs 1874 Orden: Oscillatoriales, Elenk 1934 Familia: Pseudanabaenaceae, Anagn. y Kom. 1988 Subfamilia: Pseudanabaenoideae, Anagn. y Kom. 1988 Género: <i>Pseudanabaena</i>, Lauterb 1915 Especie: <i>acicularis</i>, Nygaard, 1949</p>	<p>Color Tamaño Morfología</p>	<p>Verdeazul pálido Células de 1.5 µ de ancho, de 4 a 12 µ de largo, 2 ½ a 6 veces más largas que anchas. Largo del filamento de 500 µ hasta 1 mm. Tricomas delgados, rectos o ligeramente inclinados o curvados; al microscopio se observan las uniones de las paredes celulares; células redondeadas o cilíndricas, no atenuadas ni capitadas, caliptra ausente. Filamentos solitarios o entrelazados formando pequeñas redes, con movimiento deslizante; vaina sumamente delgada. Poseen una serie de vacuolas (aerotopos) en la parte final de cada célula. Reproducción por hormogonios, los fragmentos tienen movimiento desde que se desprenden del filamento madre. Todas las células tienen la capacidad de dividirse, por lo tanto la especie carece de zonas meristemáticas; formación de necridios.</p>
		Fisiología	Resistentes a la desecación, presentan adaptación crómática, necesitan altas concentraciones de nitrógeno, la temperatura ideal para el crecimiento es de 25 a 30 ° C.
		Distribución	Planctónicas, se observan en la superficie, cuando existe gran formación de vacuolas o adheridas al sedimento de lagos, necesario para el movimiento. Se encuentran envueltas en un mucilago junto con otras especies filamentosas.

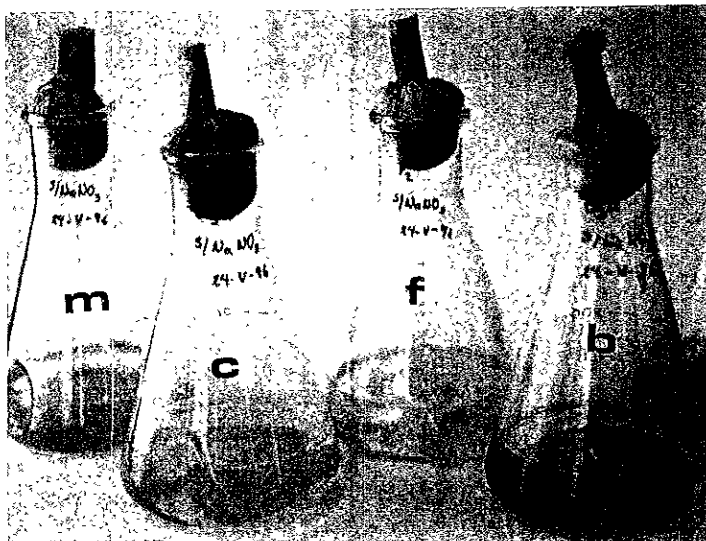
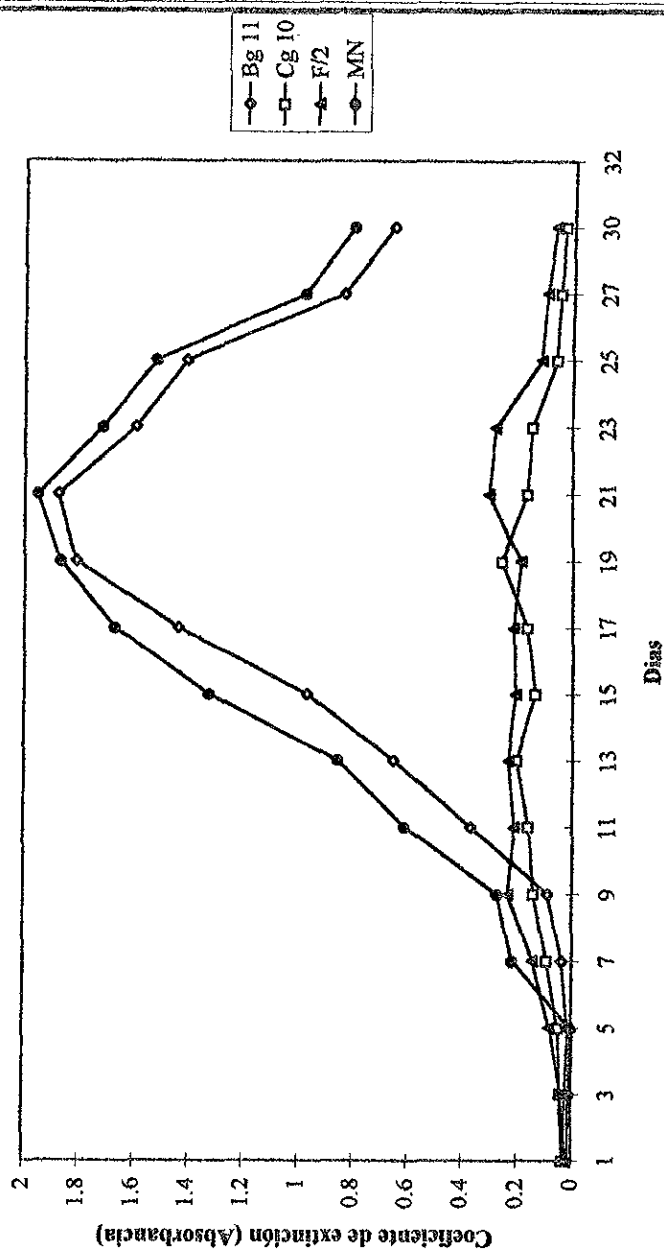


FIGURA 13. En la fotografía se observa el crecimiento de cianobacterias en diferentes medios de cultivo: MN (m), Cg 10 (c), F/2 (f) y Bg 11 (b), con 20 días de incubación; es importante remarcar las diferentes tonalidades que presenta cada medio.

Figura 14. Evaluación del crecimiento por clorofila "a" (664 nm), en cuatro diferentes medios de cultivo.



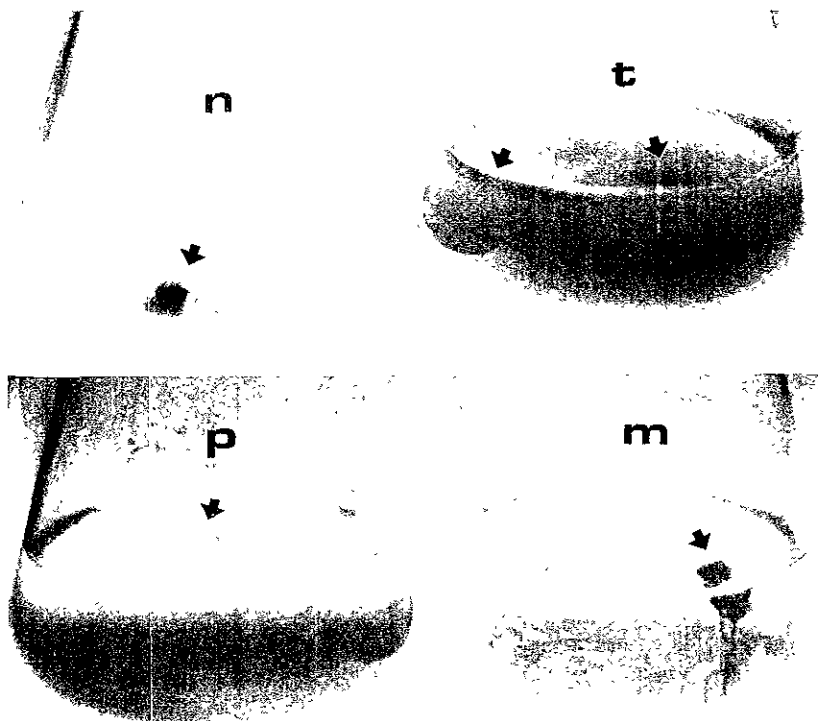


FIGURA 15. Fotografía que muestra la tonalidad adquirida por los cultivos al finalizar la etapa de degradación de hidrocarburos. El matraz con la letra (n), corresponde al crecimiento en naftaleno; el matraz de la derecha, marcado con la letra (t), pertenece al crecimiento de cianobacterias sobre tolueno. En la fotografía inferior, se observan los crecimientos en *m*-xileno (m) y *p*-xileno (p). Las flechas señalan el crecimiento de las redes de *P. acicularis* en las paredes de los matraces.

FIGURA 16. Cromatograma correspondiente al control H₄ (solo con hidrocarburos), donde se observan los tiempos de retención obtenidos para: tolueno (t), xilenos (x) y naftaleno (n).

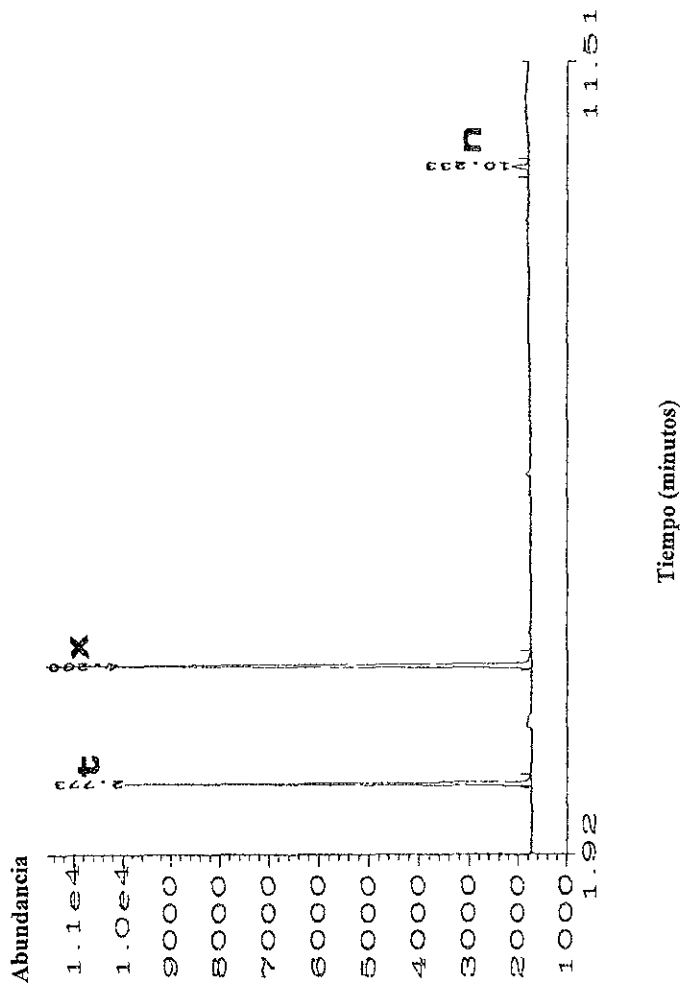


FIGURA 17. Cromatograma correspondiente a la degradación del *p*-, *m*-xileno y tolueno, por las cianobacterias *P. acicularis* y *C. dispersus*. Después de un periodo de 25 días de incubación, los hidrocarburos no están presentes en el medio de cultivo.

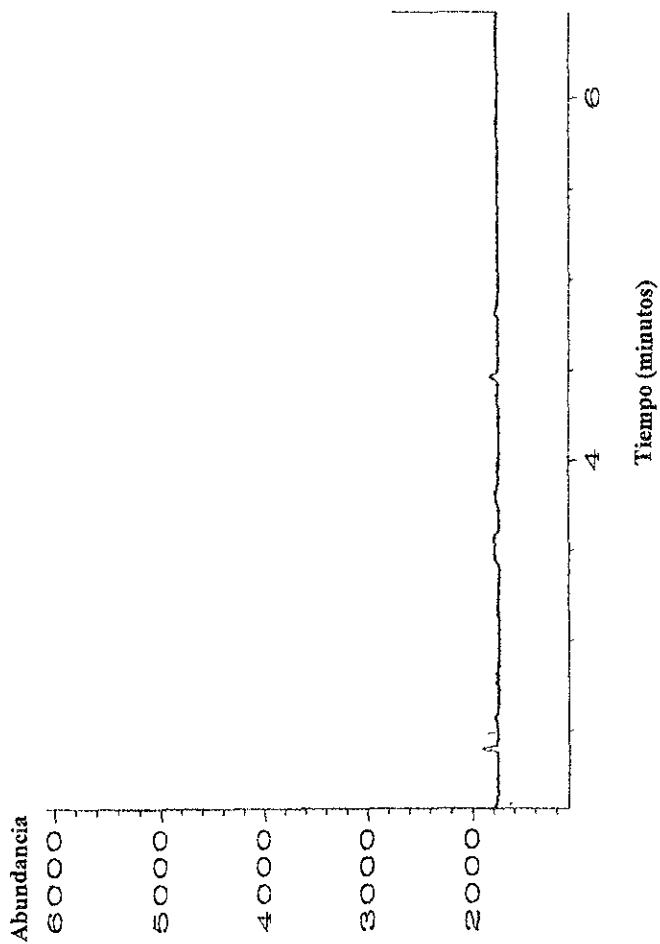
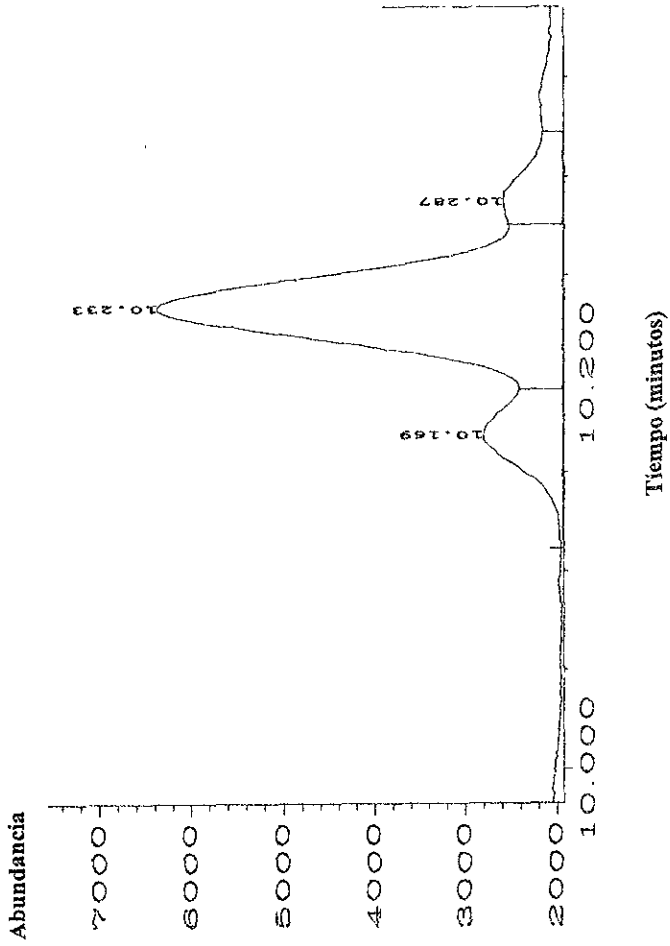


FIGURA 18. Cromatograma correspondiente a la degradación del naftaleno, por la cianobacteria *P. acicularis*. Después de un periodo de incubación de 25 días, el hidrocarburo se encuentra todavía en el medio de cultivo.



XI. ANEXOS

ANEXO 1. Preparación de buffer fosfatos con glutaraldehído (Métodos normalizados, 1989), para fijar muestras de microscópio electrónico de barrido.

Para preparar el buffer fosfatos se agrega a un litro de agua destilada las siguientes soluciones:

Soluciones Stock	ml
a	1.25
b	5

La solución **a**, se prepara con 34 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), en 500 ml de agua destilada. La solución **b**, necesita 50 g de sulfato de magnesio (MgSO_4), en 1000 ml de agua destilada.

Después de preparar el buffer se ajusta a pH 7.0 y se distribuye en frascos con 100 ml; se agrega 4 ml de glutaraldehído a cada frasco y se esterilizan.

ANEXO 2. Medios de cultivo para cianobacterias (McLachlan, 1973; Nichols, 1973; Leborgne, 1991; Borowitzka, 1992).

*** MEDIOS DE AGUA DULCE.**

- Medio BG - 11

A un litro de agua destilada se adicionan las siguientes sales (macronutrientes):

Elementos	Cantidad
NaNO_3	1.5 g
K_2HPO_4	40 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	75 mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	36 mg
Acido cítrico	6 mg
Citrato de amonio ferrico	6 mg
Na_2 - EDTA	1 mg
Na_2CO_3	20 mg
Elementos traza	1 ml

La solución de elementos traza (micronutrientes), se prepara a parte con las siguientes sales en un litro de agua destilada:

Elementos	Cantidad
H_3BO_3	2.86 g
$MnCl_2 \cdot 4 H_2O$	1.81 g
$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	222 mg
$Na_2 MoO_4 \cdot 2 H_2O$	390 mg
$Cu SO_4 \cdot 5 H_2O$	79 mg
$Co(NO_3)_2 \cdot 6 H_2O$	49.4 mg

Al terminar de agregar todas las sales, el medio se ajusta a pH de 7.5 y se esteriliza. Después de la autoclave se adiciona por medio de filtración 8 μ g/ml de vitamina B₁₂.

- Medio BG - 11 "enriquecido"

Este medio se utilizó solo en la etapa de aislamiento, se prepara con las mismas concentraciones de sales y pH del medio Bg11, más 1.2 g/l de buffer HEPES. Después de la autoclave se adiciona nistatina y ciclohexamida a una concentración de 100 μ g/ml (Ferris y Hirsch, 1991).

- Medio Cg - 10 .

Se preparan 7 soluciones stock de macronutrientes, cada una disuelta en 100 ml de agua destilada, de las siguientes sales:

Elementos	Cantidad
$Mg SO_4 \cdot 7 H_2O$	250 mg
K_2HPO_4	1 g
$Ca [NO_3]_2 \cdot 4 H_2O$	25 mg
KNO_3	1 g
$Na_2 - EDTA$	10 mg
$Fe_2 [SO_4]_3 \cdot 6 H_2O$	4 mg
Glicilglicina	1 g

Después se agrega cada una de las soluciones hasta formar un volumen de 700 ml (es importante agitar en cada adición). A continuación se agregan 300 ml de agua destilada y un ml de la solución de micronutrientes.

La solución de micronutrientes, se prepara en un litro de agua destilada con las siguientes sales y se ajusta a un pH de 8.5.

Elementos	Cantidad
H ₃ BO ₃	2.86 g
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	1.81 g
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	222 mg
MoO ₃ (85 %)	18 mg
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	79 mg
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	10 mg

Por último la solución final (1000 ml) se ajusta a un pH de 8.0 y se esteriliza. La glicilglicina se agrega al final por medio de filtración.

*** MEDIOS MARINOS.**

El agua de mar utilizada en la preparación de estos medios, se recolectó en el Golfo de México.

- Medio F/2 Guillard.

A un litro de agua de mar previamente filtrada (con papel Whatman No. 1) y añejada, se agregan las siguientes sales:

Elementos	Cantidad
NaNO ₃	75 mg
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	5 mg
Na ₂ SiO ₃ · 9 H ₂ O	30 mg
Tiamina · HCl	100 µg
Biotina	0.5 µg
Vitamina B ₁₂	0.5 µg
Solución de elementos traza	1 ml

La solución de elementos traza se prepara en un litro de agua destilada, con los elementos:

Elementos	Cantidad
Na ₂ - EDTA	4.36 g
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	3.15 g
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	180 mg
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	10 mg
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	22 mg
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	10 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	6 mg

Por último el pH se ajusta a 7.4, se esteriliza y se adiciona por filtración la tiamina, biotina y la vitamina B₁₂.

- Medio MN.

A 750 ml de agua de mar filtrada se adicionan 250 ml de agua destilada más los siguientes elementos:

Elementos	Cantidad
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	40 mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	20 mg
NaNO_3	750 mg
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$	20 mg
Acido cítrico	3 mg
Citrato de amonio ferrico	3 mg
Na_2 - EDTA	0.5 mg
$\text{Na}_2 \text{CO}_3$	20 mg
Elementos traza	1 ml

La solución de elementos traza se prepara a parte en un litro de agua destilada con las siguientes sales:

Elementos	Cantidad
H_3BO_3	2.86 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1.81 g
$\text{Zn SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	222 mg
$\text{Na}_2 \text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	39 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	79 mg
$\text{Co (NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	49.4 mg

Al terminar de adicionar todas las sales se ajusta el pH a 8.5 y se esteriliza. Por último se adiciona 4 $\mu\text{g/ml}$ de vitamina B_{12} .

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. - AHPA, AWWA, IWPCS. (1989). **Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales**. 17th edition. Diaz de Santos. España.
2. - AL HASAN, R.H. SORKHOH, N.A. AL BADER, D. RADWAN, S.S. (1994). **Utilization of hydrocarbons by cyanobacteria from microbial mats on oily coasts of the gulf**. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41: 615-619.
3. - ALLEN, M.M. (1973). **Methods for cyanophyceae**. Stein, J.R. (eds.) Handbook of phycological methods. Cambridge University Press. USA. pp. 127-138.
4. - ALLEN, M. N. STAINER, R.Y. (1968). **Selective Isolation of Blue-green algae from water and soil**. J. Gen. Microbiol. 51: 203-209. Great Britain.
5. - ANAGNOSTIDIS, K. KOMÁREK, J. (1988). **Modern approach to the clasification system of cyanophytes 3-Oscillatoriales**. Arch. Hydrobiol. Suppl. 80 (1-4): 327-472.
6. - ATLAS, R.M. (1991). **Microbial hydrocarbon degradation-bioremediation of oil spills**. J.Chem. Tech. Biotechnol. 52:149 -156. Londres.
7. - BATTERTON, J.C. WINTERS, K. VAN BAALEN. (1978). **Sensitivity of three microalgae to crude oils and fuel oils**. Marine. Environ. Res. 1: 31-41.
8. - BEISHIR, L. (1977). **Microbiology in practice**. 2th edition. Canfield Press. pp. 342.
9. - BOLD, H.C. WYNNE, M.J. (1989). **Introduction to the algae**. Prentice-Hall. USA. pp.34-58.
- 10.- BOBRA, M. TENNYSON, E.J. (1989). **Photooxidation of petroleum**. Can. Environ. 129-147. Canada.
- 11.- BOROWITZKA, M.A. BOROWITZKA, L.J. (1992). **Micro-algal Biotechnology**. Cambridge University Press. Great Britain. pp.456-465.

- 12.- BOTELLO, A.V. PONCE, V.G. TOLEDO, A. DÍAZ, G.G. VILLANUEVA, S. (1995). **Ecología, recursos costeros y contaminación en el Golfo de México.** Ciencia y Desarrollo. 8(102): 28-48. Enero/Febrero. México.
- 13.- BOURRELLY, P. (1970). **Les algues d'eau douce, initiation a la systématique.** Tomo III. De. Boubée, pp. 438.
- 14.- BOWYER, J.W. SKERMAN, B.D. (1968). **Production of axenic cultures of soil-borne and endophytic blue-green algae.** J. Gen. Microbiol. 54: 299-306. Great Britain.
- 15.- CERNIGLIA, C.E. GIBSON, D.T. VAN BAALEN, C. (1979). **Algal oxidation of aromatic hydrocarbons: formation of 1-naphthol from naphthalene by *Agmenellum quadruplicatum*, strain PR-6.** Bioch. Biophys. Res. Com. 88 (1): 50-58.
- 16.- CERNIGLIA, C. E. GIBSON, D.T. VAN BAALEN, C. (1980, a). **Oxidation of naphthalene by Cyanobacteria and microalgae.** J. Gen. Microbiol. 116: 495 - 500. Great Britain.
- 17.- CERNIGLIA, C.E. VAN BAALEN, C. GIBSON, D.T. (1980, b). **Metabolism of naphthalene by cyanobacterium *Oscillatoria* sp., strain JMC.** J. Gen. Microbiol. 116: 485- 494. Great Britain.
- 18.- COLLINS, C.H. LYNE, P.M, GRANGE, J.M. (1991). **Microbiological Methods.** 6ª edición. Butterworth-Heinemann. USA.
- 19.- COLWELL, R.R. WALKER, J.D. (1977). **Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment.** Crit. Rev. Microbiol. 5: 423-455.
- 20.- CRUEGER, W. CRUEGER, A. (1990). **Biotechnology.** 2th edition. Sinauer Associates. USA. pp. 229 - 273.
- 21.- DALY, J.W. JERINA, D.M. WITKOP, B. (1972). **Arene oxides and the NIH shift: The metabolism, toxicity and carcinogenicity of aromatic compounds.** Experientia. 28(10): 1129-1264.
- 22.- DANENBERGER, E.P. (1976). **Oils spills, 1971- 75, Gulf of México Outer continental shelf.** Geological survey. U.S.A. pp. 47.
- 23.- DESIKACHARY, T.V. (1959). **Cyanophyta.** Indian council of agricultural research. New Delhi.

- 24.- DUNSTAN, W.M. ATKINSON, L.P. NATOLI, J. (1975). **Stimulation and inhibition of phytoplankton growth by low molecular weight hydrocarbons.** Mar. Biol. 31: 305-310.
- 25.- EDWARD, L.R. (1989). **Phycology.** 2th edition. Cambridge University Press. USA. pp. 53-101.
- 26.- ELLIS, B. E. (1977). **Degradation of phenolic compounds by fresh-water algae.** Plant Sci. Lett. 8:231-216.
- 27.- FERRIS, M.J. HIRSCH, C.F. (1991). **Method for isolation and purification of cyanobacteria.** Appl. Environ. Microbiol. 57(5): 1448-1452.
- 28.- FEUILLADE, J. FEUILLADE, M. (1979). **A chemostat device adapted to planktonic *Oscillatoria* cultivation.** Limnol. Oceanogr. 24 (3): 562-564. USA.
- 29.- FINGAS, M.F. STOODLEY, R. STONE, N. STONE, N. HOLLINS, R. BIER, Y. (1991). **Testing the effectiveness of spill- treating agentes: laboratory test development and initial results.** Oil spill conference.
- 30.- FLOODGATE, G.D. (1982). **The fate of petroleum in marine ecosystems.** Mitchell, R. (ed). In water pollution microbiology. Vol. 1. Jhon Wiley and sons. London. pp. 355 - 397.
- 31.- FLOODGATE, G.D. (1995). **Some environmental aspects of marine hydrocarbon bacteriology.** Aquat. microb. Ecol. 9:3-11.
- 32 - FOGG, G.E. (1978 a). **Blue-green algae.** Laskin, A.I. Lechevalier, H.A (Eds). Handbook of Microbiology. 2th edition. Vol. 2. CRC Press. USA. pp. 347-363.
- 33.- FOGG, G.E. STEWART, W.D. FAY, P. WALSBY, A.E. (1978 b). **The blue-green algae.** Academic Press. Gran Bretaña.
- 34.- FRISCHKNECHT, K. SCHNEIDER, K. (1979). **Physiological performances of the blue-green alga *Anacystis nidulans* in continuous turbidostat fermenter culture.** Arch. Microbiol. 120: 215-221. USA.
- 35.- FUSEY, P. OUDOT, J. (1984). **Relative influence of physical removal and biodegradation in the depuration of petroleum-contaminated seashore sediments.** Mar. Pollut. Bull. 15 (4):136 - 141. Londres.
- 36.- GALIANA, M. T. MAGNIN, R.C. PENET, J. BAGAÑI, M. NOZOHIC, H. (1987). **Diccionario ilustrado de las ciencias.** Larousse. México.

- 37.- GAUR, J.P. KUMAR, H.D. (1981). **Growth response of four micro-algae to three crude oils and a furnace oil.** *Environ. Pollut.* 25: 77-85.
- 38.- GIBSON, D.T. (1977). **Biodegradation of aromatic petroleum hydrocarbons.** Wolfe, D.A. Anderson, J.W. Button, D.K. Malins, D.C. Roubal, T. y Varnasi, V (eds). Fate and effects of petroleum hydrocarbons in marine ecosystems and organisms. Pergamos Press. USA. pp. 36- 46
- 39.- GIRARD, R.R. (1988). **Biodegradación microbiana del petróleo en ecosistemas acuáticos.** *Petróleos Mexicanos, Gerencia de Coordinación y Control de Protección ambiental.* pp. 56.
- 40.-GORDON, D.C. PROUSE, N.J. (1973). **The effects of three oils on marine phytoplankton photosynthesis.** *Mar. Biol.* 22: 329-333.
- 41.- HÄDER, D.P. (1987). **Photosensory behavior in procaryotes.** *Microbiol. rev.* 51 (1): 1 - 21. U.S.A.
- 42.- HERNÁN, S.M. (1993). **Salud y enfermedad.** La prensa Médica. México.
- 43.- HILL,E.C. (1982). **Biodegradation of petroleum products.** Mitchell,R. (ed). In water pollution microbiology. Vol 1. Jhon Wiley and sons. London. pp 579 - 586.
- 44.- INEGI.(1986). Carta topográfica Minatitlan, Veracruz. Escala 1: 50, 000. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática.
- 45.- JAWETZ,E. MELNICK, J.L. ADELBERG, E.A. BROOKS, G.F. BUTEL, J.S. ORNSTON, L.N. (1990). **Microbiología médica.** 13 ª edición. El manual moderno. México. pp. 204-214/220-224.
- 46.- KÓMAREK, J. ANAGNOSTIDIS, K. (1986). **Modern approach to the clasification system of cyanophytes 2-Chroococcales.** *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 73(2): 157-226.
- 47.- KUMAR, H:D. SINGH, H.N. (1979). **A Textbook on algae.** Macmillan International college editions. Hong-Kong.
- 48.- LAMONT,H.C. (1969). **Shear-oriented microfibrils in the mucilaginous investments of two motile Oscillatoriacean Blue- Green Algae.** *J. Bacteriol.* 97(1):350-361.
- 49.- LE BORGNE, I. (1991). **Cultivo de microalgas.** Barnabé, G. (Ed). Acuicultura. Vol. 1. Omega. España. pp. 155-164.

- 50.- LEAHY, G.J. COLWELL, R.R. (1990). **Microbial degradation of hydrocarbons in the environment.** Microbiol. Rev. 54 (3): 305-315. USA. September.
- 51.- LIZARRAGA-PARTIDA, M.L. CARBALLO,C.R. IZQUIERDO-VICUÑA, F.B. COLWELL,R.R. CHANG,W.I. (1987). **Bacteriología de la laguna de términos, Campeche, México.** An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México. 14 (1): 97-108.
- 52.- LOBBAN, C.S. HARRISON, P.J. DUNCAN, M.J. (1985).**The physiological ecology of seaweeds.** Cambridge University Press. USA. pp 132 - 156.
- 53.- LÓPEZ, C. A. (1990). **Microbial mats in tidal channels at San Carlos, Baja California Sur, Mexico.** J. Geomicrobiol. 8: 60-85.
- 54.- LÓPEZ, C.A. TOVAR, D. (1992). **Population changes in cyanobacterial mats and the role of NaCl on β -carotene production in *Microcoleus* strain SC7B9002-1.** J. Geomicrobiol. 10: 115-123.
- 55.- MACLACHLAN, J. (1973). **Growth media-marine.** Stein, J.R (eds.) Handbook of phycological methods. Cambridge University Press. USA. pp. 25-52.
- 56.- MALUQUER, W.J. FRANCO,R. SCHINAIA, C. (1974). **Enciclopedia de la técnica y la mecánica.** Emograph. España.
- 57.- McAULIFFE, C.D. (1977). **Dispersal and alteration of oil discharge on a water surface.** Wolfe, D.A. Anderson, J.W. Button, D.K. Malins, D.C. Roubal, T. y Varnasi, V (eds). Fate and effects of petroleum hydrocarbons in marine ecosystems and organisms. Pergamos Press. USA. pp. 19-35.
- 58.- MEFFERT, M.E. CHANG,T.P.(1978). **The isolation of planktonic blue green algae (*Oscillatoria* - species).** Arch. Hydrobiol. 82(1-4): 231 - 239.
- 59.- MERVIN, C.P. (1989). **Clave para la identificación de las algas de agua dulce comunes en los suministros de agua y en las aguas contaminadas.** AHPA, AWWA, IWPCS. (eds). Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. 17th edition. Diaz de Santos. España. pp.10-200/10-207.
- 60.- MESTA, H. ORTIGOZA,F. HINOJOSA, R. (1993). **Uso de los microorganismos en la extracción del petróleo.** Ciencia y Desarrollo. 19 (113): 46-51. México. Noviembre-Diciembre.

- 61.- MICHAEL, A.D. (1977). **The effects of petroleum hydrocarbons on marine populations and communities**. Wolfe, D.A. Anderson, J.W. Button, D.K. Malins, D.C. Roubal, T. y Varnasi, V (eds). Fate and effects of petroleum hydrocarbons in marine ecosystems and organisms. Pergamos Press. USA. pp. 129- 137.
- 62.- MONTAGNA, P.A. BAUER, J.E. (1988). **Partitioning radiolabeled thiamine uptake by bacteria and meiofauna using metabolic blocks and poisons in benthic feeding studies**. Mar. Biol. 98:101-110.
- 63.- MORGAN, P. (1994). **Biodegradation of components of petroleum**. Ratledge, C. (de). Biochemistry of microbial degradation. Kluwer Academic Publishers. pp. 1-31.
- 64.- NEILSON, A.H. (1994). **Organic Chemicals in the aquatic environment: distribution, persistence and toxicity**. CRC press Inc. USA. pp. 223-337.
- 65.- NICHOLS, H.W. (1973). **Growth media-freshwater**. Stein, J.R (eds). Handbook of phycological methods. Cambridge University Press. USA. pp 7-24.
- 66.- OSWALD, W.J. (1992). **Micro-algae and waste-water treatment**. Borowitzka, M.A. Borowitzka, L.J.(eds) Micro-algal Biotechnology. Cambridge University Press. Great Britain.
- 67.- PARKINSON, D. (1973). **Oil spillage on microorganisms in northern canadian soils**. Environmental Social Program Northern Pipelines. Canada. pp. 49.
- 68.- PEMEX. (1988). **El petróleo**. Edición de 50 aniversario. PEMEX. México
- 69.- PENTECOST, A. (1984). **Effects of sedimentation and light on mat-forming *Oscillatoriaceae* with particular reference to *Microcoleus lyngbyaceus* Gomot**. J. Gen. Microbiol. 130: 983- 990.
- 70.- PFAENDER, F.K. BUCKLEY, E.N. (1982). **Effects of petroleum on microbial communities**. Mitchell, R. (ed). In water pollution microbiology. Vol. 1. Jhon Wiley and sons. London. pp. 507 - 536.
- 71.- PRINCE, R.C. (1990). **Bioremediation of oil spills, with particular reference to the spill form the Exxon Valdez**. Environ. Sci.Tech. 25: 19-34. USA.
- 72.- RAMOS, A. SALAZAR, M. (1990). **Uso potencial de los cultivos masivos de microalgas**. De la Lanza, E.G. Arredondo, F.J. (Eds). La Acuicultura en México: de los conceptos a la producción. Instituto de Biología. UNAM. México. pp. 274-288.

- 73.- REGAN, D.L. (1992). **Other micro-algae**. Borowitzka, M.A. Borowitzka, L.J. (eds). Micro-algal Biotechnology. Cambridge University Press. Great Britain.
- 74.- REGAN, D.L. IVANCIC, N. (1984). **Mixed populations of marine microalgae in continuous culture: factors affecting species dominance and biomass productivity**. *Biotch & Biocng*. 26: 1265-1271. USA.
- 75.- REGNIER, Z.R. SCOTT, B.F. (1975). **Evaporation rates of oil components**. *Environ. Sci. Teech.*, 9: 469-472.
- 76.- RIPPKA, R. DERUELLES, J. WATERBURY, J.B. HERDMAN, M. STANIER, R.Y. (1979). **Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria**. *J. Gen. Microbiol.* 111:1-61. Great Britain.
- 77.- RIPPKA, R. (1988). **Isolation and purification of cyanobacterial**. *Methods Enzymol.* 167:3-27.
- 78.- ROBIN, S.G. WHITTICK, A. (1987). **Introduction to phycology**. Blackwell Scientific publications. Great Britain. pp. 174-182.
- 79.- SHAW, D.G. (1977). **Hydrocarbons in the water column**. Wolfe, D.A. Anderson, J.W. Button, D.K. Malins, D.C. Roubal, T. y Varnasi, V (eds). Fate and effects of petroleum hydrocarbons in marine ecosystems and organisms. Pergamos Press. USA. pp. 8-18.
- 80.- SCHWARTZ, R.D. LEATHEN, W. (1976). **Petroleum Microbiology**. Capitulo 13. Miller, B.M. and Listsky, W. (Eds). Industrial Microbiology. Mc Graw-Hill. USA. pp. 284-411.
- 81.- SMITH, G.M. (1966). **Cryptogamic Botany**. 2th edition. Mc Graw- Hill. U.S.A.
- 82.- SMITH, M.R. (1994). **The physiology of aromatic hydrocarbon degrading bacteria**. Ratledge, C. (cd). Biochemisty of microbial degradation. Kluwer Academic Publishers. pp. 347-378.
- 83.- SONIASSY, R. SANDRA, P. SCHLETT, C. (1994). **Water Analysis, organic micropollutants**. Hewlett Packard. Alemania. pp. 278.
- 84.- SORKHOH, N. AL-HASAN, R. RADWAN, S. (1992). **Self-cleaning of the Gulf**. *Nature*. 359: 109.
- 85.- SORKHOH, N. AL-HASAN, R. KHANAFER, M. RADWAN, S. (1995). **Establishment of oil-degrading bacteria associated with cyanobacteria in oil-polluted soil**. *J. Appl. Bacteriol.* 78:194-199.

- 86.- SOROKIN, C. (1973). **Dry weight, packed cell volume and optical density.** Stein, J.R (eds.) Handbook of phycological methods. Cambridge University Press. USA. pp. 321- 344.
- 87.- STABNIKOVA, E.V. SELEZNEVA, M.V. REVA, O.N. IVANOV, V.N. (1995). **The choice of an active hydrocarbon-destructing microorganism for cleaning oil-polluted soils.** Appl. Biochem. Microbiol. 31(5):534-539.
- 88.- STAL, L.(1991). **The metabolic versatility of the mat-building cyanobacteria *Microcoleus chthonoplastes* and *Oscillatoria limosa* and its ecological significance.** Hickel, P.B. Anagnostidis, A.K. Komárek, T.J. (eds). Cyanophyta/Cyanobacteria: morphology, Taxonomy, Ecology. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung. Germany.
- 89.- STALEY, J.T. BRYANT, M.P. PFENNIG, N. HOLT, J.G. (1989). **Bergey's manual of systemaatic bacteriology.** Vol. 3. Williams & Wilkins. USA. pp. 1741-1742.
- 90.- STECHER, G.P. WINDHOLZ, M. LEAHY,S.D. (1968). **The Merck Index.** 8th edition. Merck & company.pp. 713,1058 y 1122.
- 91.- TRAXLER, R.W. CUNDELL, A.M. (1976). **Petroleum degradation in low temperature marine and estuarine environments.** Department of commerce. National technical information service. U.S.A. pp.18.
- 92.- UKELES, R. (1973). **Continuous culture-a method for the production of unicellular algal foods.** Stein, J.R. (eds.) Handbook of phycological methods. Cambridge University Press. USA. pp. 233-253.
- 93.- VAN BAALEN,C. (1978). **Introduction to the algae.** Laskin, A.I. Lechevalier, H.A. (eds). Handbook of Microbiology. 2th edition. Vol. 2. CRC press. U.S.A. pp. 343-346.
- 94.- VÁZQUEZ, G.F. GIL, F.E. (1992). **Concentración de soluciones.** AGT editor. México.
- 95.- WALKER, J.D. PETRAKIS, L. COLWELL, R.R. (1976). **Comparison of the biodegradability of crude and fuel oils.** Can. J. Microbiol. 22: 598-602.
- 96.- WATERBURY, J.B. WILLEY, J.M. FRANKS, D.G. VALOIS, F.W. WATSON, S.W. (1985). **A cyanobacterium capable of swimming motility.** Science. 230: 74-75.

- 97.- WILMOTTE, A. GOLUBIC, S. (1991). **Morphological and genetic criteria in the taxonomy of Cyanophyta/Cyanobacteria.** Hickel, P.B. Anagnostidis, A.K. Komárek, T.J. (eds). Cyanophyta/Cyanobacteria: morphology, Taxonomy, Ecology. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung. Germany.
- 98.- WILSON, S.C. JONES, K.C. (1993). **Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review.** Environ. Pollut. 81: 229 - 249.
- 99.- WINTERS, K. O'DONNELL, R.O. BATTERTON, J.C. VAN BAALEN, C. (1976). **Water-soluble components of four oils: Chemical characterization and effects on growth of microalgae.** Mar. Biol. 36:269-276.
- 100.- YAÑEZ, S.F. (1994). **Indice de bacterias degradadoras de hidrocarburos, heterótrofas totales; como indicador de la contaminación por hidrocarburos (revisión).** Curso de contaminación marina. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. UNAM. pp. 1-22.
- 101.- ZEVENBOOM, W. MUR, L.R. (1981). **Ammonium-limited growth and uptake by *Oscillatoria agardhii* in chemostat cultures.** Arch. Microbiol. 129: 61-66. USA.
- 102.- ZIMMERMANN. (1977). **Estimation of bacterial number and biomass by epifluorescence microscopy and scanning electron microscopy.** Reinheimer, G (ed). Microbial ecology of a brackish water environmental. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Alemania. pp. 103-120.