

171



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE BACTERIAS BIODEGRADORAS DE INHIBIDORES DE HIDRATACION DE ARCILLAS.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
TONANTZIN ZAPATA LILLY



MEXICO, D. F.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

2002

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Profa. ROSA MARÍA RAMÍREZ GAMA
Vocal	Profa. MARÍA GUADALUPE TSUZUKI REYES
Secretario	Prof. EDUARDO BONILLA ESPINOSA
1er. Suplente	Profa. RAQUEL ORTEGA MUÑOZ
2º. Suplente	Profa. RUTH EDITH MARTÍN FUENTES

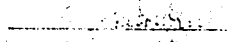
Sitio donde se desarrolló el Tema:

Laboratorio de Microbiología Experimental. Facultad de Química, UTAM

Asesor del Tema:


M. en C. Rosa María Ramírez Gama

Sustentante:


Jonathan Zúñiga

AGRADECIMIENTOS

A las Profesoras: Rosa María Ramírez, Guadalupe Tsuzuki, Beatriz Luna por sus consejos para la realización de esta tesis.

A los amigos del Laboratorio de Microbiología Experimental: Mariel Tenorio, Marco Calderón, Violeta Franco, Rosalba Esquivel y Mario Hernández sé que cuento con su apoyo incondicional. A Mónica Miranda, Laura Cedillo, Carmen Urzúa, Hilda Ruiz ya que compartimos mucho tiempo juntas.

A los amigos con quienes compartí mi formación profesional: Miguel, Chucho, Rafa, Martín, César, Alejandro, Roberto, Fabiola, Moni, Pilar, Gaby.

Muy en especial al Q.F.B. Raúl Garza Velasco por que ya va a descansar de mis peticiones personales.

A todas aquellas personas que a lo largo de los estudios de Licenciatura contribuyeron con una sonrisa para aligerar la carga de trabajo que llevamos en nuestros hombros.

Este trabajo quiero dedicarlo a mi YEYA con todo mi amor porque lo prometido es deuda y además sé que ahí donde te encuentres recuerdas enviarme tu bendición.

A mis padres (Chino y Pecas) quienes siempre me han apoyado y guiado para llegar a ser lo que soy, no tengo con que pagarles lo que han hecho por mí.

A mis tíos que han sido un ejemplo para mí.

A mis primos por todo el tiempo que estuvimos juntos creciendo.

A mis amigas de toda la vida Carmen, Alejandra, Irma, Ara y Ody.

A mis suegros y mis cuñados que me han incorporado a su núcleo familiar.

Y especialmente a mi esposo
Dante González por su apoyo como pareja
y como profesionista y a mi hijito
Dante Tonatiuh, ambos son mi tesoro y
fuente de inspiración para continuar por
la vida, los amo!!!!!!!!!!

INDICE

	Pág.
1) Introducción	1
2) Antecedentes	3
2.1) Fluidos de Perforación	3
2.2) Inhibidores de Hidratación de Arcillas	5
2.3) Importancia de los microorganismos en la biodegradación de compuestos xenobióticos	6
2.4) Definición de Consorcio	10
2.5) Aislamiento e identificación de microorganismos biodegradadores de xenobióticos	11
2.6) Estudios de biodegradación de Inhibidores de Hidratación de Arcillas	16
3) Justificación y Objetivos	18
4) Materiales y métodos	20
5) Resultados y discusión	27
6) Conclusiones	57
7) Recomendaciones	58
8) Bibliografía	59
Anexo 1 Medios de Cultivo	62
Anexo 2 Tinciones	65
Anexo 3 Pruebas	66
Anexo 4 Sistema de identificación de Wolf y Barker (marcha)	67
Anexo 5 Sistema de identificación de Gordon (marcha)	68

1) INTRODUCCIÓN

La actividad humana ha propiciado que se lleve a cabo un desarrollo industrial acelerado, este desarrollo ha llevado de la mano la generación de diversos compuestos químicos que causan contaminación ambiental.

En la actualidad la contaminación ambiental es una problemática que ha cobrado importancia a nivel mundial, de ahí que se busque el desarrollo de nuevas tecnologías para optimizar los procesos industriales y así minimizar la producción de desechos o para tratar los sitios contaminados.

En nuestro país no existe una adecuada regulación acerca de la descarga de ciertas sustancias al ambiente lo que ha ocasionado un deterioro de los ecosistemas.

Una de las soluciones a esta problemática corresponde a la biotecnología a través de la cual se buscan soluciones baratas, efectivas y sin repercusiones a largo plazo, una de estas es la aplicación de microorganismos que sean capaces de degradar contaminantes orgánicos empleándolos como fuente de carbono y energía sin generar sustancias que puedan ser más tóxicas que el contaminante inicial.

Para estudiar a los microorganismos con esta capacidad, es necesario obtenerlos del ambiente, es decir, aislarlos y posteriormente caracterizarlos para saber si se trata de especies conocidas. Después es necesario ponerlos en contacto con el contaminante para conocer si verdaderamente servirán para eliminarlo.

Existen productos como los Inhibidores de Hidratación de Arcillas que son utilizados como aditivos de los fluidos para la perforación de pozos petroleros, estos pueden tener contacto con el suelo cuando se desechan o almacenan y por lo tanto, son considerados como contaminantes potenciales, de ahí la importancia de conocer a los microorganismos que al ser manipulados adecuadamente podrían eliminarlos del suelo, restaurando así el daño ocasionado al ambiente.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química, perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México, con apoyo del proyecto FIES-97-03-1.

2) ANTECEDENTES

2.1) Fluidos de perforación

La perforación de pozos es una actividad común en la obtención del petróleo. El sistema de perforación más empleado es rotatorio y está constituido por una unión giratoria, un cuadrante, una mesa rotatoria, una sarta y una barrena. Para su funcionamiento este requiere de un lodo o fluido que se bombea desde la presa de succión hacia la manguera del cuadrante y llega a la salida de la barrena y empieza a desplazarse por el espacio que va conectado a la unión rotatoria. El fluido pasa por el interior de la sarta existente entre ésta y la pared del pozo, para finalmente salir por la línea de descarga acarreado los cortes de la barrena. El material expelido se separa por un sistema de cribado (Ruiz, 2001).

Los recortes provenientes de la perforación se depositan en un contenedor metálico y se confinan como residuos peligrosos en tanto que el fluido se acondiciona y se regresa al interior del pozo para continuar desempeñando sus funciones, tales como:

- o Lubricación de la barrena y de la cuerda de perforación
- o Enfriamiento y limpieza de la barrena
- o Reducción de la fricción en el pozo perforado

- o Mantenimiento del balance de presión entre las formaciones geológicas y el pozo perforado
- o Estabilización del pozo perforado
- o Transporte de cortes a la superficie para su desecho

(Burke y Veil, 1995; Zamudio y Cedeño, 1998.)

Lo anterior indica que el fluido es una parte esencial de la operación de perforación, por lo que para optimizar sus funciones y disminuir los problemas asociados con las formaciones geológicas y profundidad, se han desarrollado diferentes tipos de formulaciones que van de simplemente acuosas a muy complejas y no acuosas (Soran Talabani et al. 1993). Los fluidos deben tener ciertas características por lo que requieren de aditivos como: viscosificante, lubricante, anticorrosivos e inhibidores de hidratación de arcillas, entre otras funciones (Bland, 1994).

2.2) Inhibidores de hidratación de arcillas (IHA)

Los inhibidores de hidratación de arcillas se encuentran como aditivos en los fluidos de perforación. Al agregar un IHA a un sistema acuoso, sus moléculas actúan sobre las arcillas impidiendo que éstas absorban o se hidraten con el agua que las rodea, lo que ayuda a estabilizar la pared del pozo y evita que se adhieran materiales plásticos a la barrena.

Los inhibidores de hidratación de arcillas se clasifican de acuerdo a la naturaleza iónica de sus componentes en: catiónicos, con polímeros anfóteros y con polímeros no iónicos.

Los catiónicos a su vez se dividen en polímeros orgánicos y en sales inorgánicas. Estos son poco tóxicos y altamente biodegradables aunque pueden aumentar la salinidad del sitio donde se descargan.

Los polímeros anfóteros (poliaminoácidos) son similares y tienen la ventaja de presentar un menor costo.

Los polímeros no iónicos incluyen a los glicoles, polioles, alcohol polivinílico, glucósidos y son altamente biodegradables (Ambriz, 2001).

En la actualidad se prefiere el empleo de IHA que sean biodegradables y de baja toxicidad para que al ser agregados a los fluidos de perforación

no incrementen la toxicidad de dichos fluidos, cumpliendo así con los requerimientos de la EPA (Environmental Protection Agency) (Burke y Veil, 1995).

2.3) Importancia de los microorganismos en la biodegradación de compuestos xenobióticos

En el desarrollo de la petroquímica se generan de manera inevitable volúmenes considerables de lodos aceitosos. Las fuentes comunes de estos lodos corresponden al sedimento de los tanques de almacenamiento, separadores agua-aceite, unidades de flotación, tanques de tratamiento biológico de aguas residuales, los residuos de la limpieza del equipo de procesamiento, los derrames que causan contaminación de suelo y agua, lo que hace necesario el estudio de la atenuación natural de los residuos así como, el desarrollo de técnicas simples, efectivas y baratas que permitan el aumento de la restauración de los sitios contaminados.

En este sentido se han desarrollado tecnologías físicas, químicas y biológicas, para reestablecer la calidad del ambiente (Li, 2000).

La biodegradación de xenobióticos como los hidrocarburos por poblaciones naturales de microorganismos, es una de las principales

maneras de eliminarlos de los sitios contaminados. Numerosas bacterias presentes de manera natural en el suelo, son capaces de degradar algunos xenobióticos por esta razón la biorremediación se ha considerado como una herramienta útil en la limpieza de derrames de aceite y en el tratamiento de residuos oleosos (Yuste y Corbella, 2000).

De manera natural los xenobióticos que son mineralizables persisten en lodos, agua y suelo por cierto tiempo hasta que la población de microorganismos se vuelve lo suficientemente activa para eliminarlos especialmente en condiciones aerobias (Dibble y Bartha, 1979).

Una manera de acelerar la destrucción de estos compuestos es inocular el ambiente con microorganismos que se sabe de antemano metabolizarán los contaminantes presentes.

Otra opción corresponde al uso de microorganismos modificados genéticamente que se diseñaron para acelerar la biodegradación de compuestos que se biodegradan lentamente o que no son mineralizados en la naturaleza. No obstante se debe contemplar que al agregar cepas seleccionadas de otros ambientes o microorganismos modificados genéticamente a la naturaleza estos se enfrentan a condiciones climáticas distintas, competencia, predación y parasitismo lo que probablemente limite su actividad (Goldstein, 1985).

Razón por la que se considera más recomendable utilizar cultivos enriquecidos de microorganismos autóctonos que tengan la capacidad para biodegradar los xenobióticos (Li, 2000; Margesin y Schinner, 1997).

De acuerdo con Albert *et al.*(1995), Madsen (1996) y Manan (1998) la *biodegradación* es definida como la descomposición de materia orgánica natural o sintética causada por microorganismos para obtener moléculas más simples. (En Ambriz, 2001 Pag. 10)

A los compuestos sintéticos como los hidrocarburos, que son extraños en la naturaleza se les denomina *xenobióticos* (Bartha R. 1990), cuando estos se acumulan en cantidades considerables (biomagnificación) se convierten en sustratos potenciales para la biodegradación. No obstante al acumularse también aumenta su toxicidad inhibiendo a los microorganismos presentes de forma natural en el sitio (Rodríguez del Alamo 2001).

La biodegradación de xenobióticos es en ocasiones lenta lo que se debe a que uno o más nutrientes inorgánicos necesarios para el crecimiento de los microorganismos se encuentra en concentraciones bajas en el ambiente. La adición de Nitrógeno y Fósforo como nutrientes o la modificación de las condiciones ambientales (bioestimulación) puede aumentar la biodegradación de los xenobióticos. Sin embargo la adición de nutrientes inorgánicos puede resultar en la estimulación de

microorganismos que metabolizan otros compuestos orgánicos, lo que reduce o elimina la degradación de los xenobióticos en estudio (Steffensen y Alexander, 1995).

Por otro lado la biodegradación puede aumentarse al promover la capacidad enzimática de la comunidad microbiana autóctona con la adición de un inóculo (bioaumentación) que se sabe puede estimular la degradación del compuesto de interés (Marini y Velasco, 2000).

Considerando lo anterior numerosos microbiólogos han aislado, identificado y seleccionado a los microorganismos autóctonos que se han adaptado a la presencia de contaminantes, entre ellos los IHA (Ruiz, 2001). Estos se han probado a nivel de laboratorio para llevar a cabo la restauración de un sitio ya sea utilizando al consorcio completo o mezclas funcionales de microorganismos, que han sido aislados a partir de un consorcio (Van Hamme y Odumeru, 2000).

De este modo la *biorremediación* se define como la eliminación de contaminantes como los hidrocarburos y sus productos de suelos o aguas contaminadas usando consorcios de microorganismos cuya única fuente de carbono y energía sean los contaminantes, que son transformados en condiciones aerobias o anaerobias.

2.4) *Definición de Consorcio*

Grupo multipoblacional bacteriano que se beneficia de la cooperación ya que puede acceder a recursos que no pueden ser utilizados de la misma forma por poblaciones individuales, en estos consorcios también existe una defensa colectiva contra los antagonistas, lo que aumenta su capacidad de supervivencia.

La actividad de estos consorcios es fundamental en la naturaleza en donde la degradación de polímeros orgánicos es efectuada por la acción conjunta de muchos tipos de bacterias, las que inevitablemente se enfrentan con nuevas circunstancias físicas, químicas, nutricionales y cambios biológicos y su supervivencia depende de que las células tengan la capacidad para confrontar antibióticos, desecación y el uso de nuevos sustratos para su crecimiento (Shapiro, 1998).

Estos grupos son sistemas interactivos con diferentes niveles de organización y que optimizan la conversión de compuestos sintéticos a recursos bióticos (Skladany y Meeting, 1993).

Muchos microorganismos de vida libre son más efectivos cuando se encuentran asociados con otros grupos de organismos.

La dependencia entre los miembros de una comunidad microbiana se presenta cuando algunos de ellos proporcionan un mejor hábitat para las

demás bacterias, por ejemplo, cuando compuestos complejos son transformados a moléculas más simples que después constituyen sustratos disponibles para la mayor parte de los microorganismos (Campbell, 2001). Esto se puede comprobar si la comunidad posee un hábitat más amplio que sus miembros por separado y se adapta mejor a condiciones de estrés ambiental (Caldwell et al. , 1997).

2.5) Aislamiento e Identificación de Microorganismos biodegradadores de xenobióticos

El aislamiento de microorganismos biodegradadores autóctonos se puede realizar mediante diversas técnicas microbiológicas (empleo de medios de cultivo selectivos, siembra en medio sólido, diluciones de una suspensión microbiana) y con la observación microscópica de los microorganismos cultivados. Una vez que se ha obtenido un cultivo puro es necesario conocer sus características tanto macroscópicas como microscópicas y llevar a cabo la identificación.

La identificación de los microorganismos puede llevarse a cabo utilizando diferentes métodos como la amplificación del DNA por PCR que después es secuenciado. Los datos obtenidos de la secuenciación se comparan

con RNA de especies conocidas contra la base de datos NCBI web service (Yuste y Corbella, 2000).

También se pueden tipificar cepas basándose en el contenido de ácidos grasos utilizando el Sistema de Identificación Microbiana de Hewlett Packard (MIS) que determina el perfil de ácidos grasos por cromatografía de gases de alta resolución, este perfil se compara con un paquete de software que contiene perfiles de bacterias conocidas (Yakimov *et al.* 1997).

La determinación de guanina y citosina del DNA que se puede obtener por desnaturalización térmica, gradiente de densidad por centrifugación, hibridación cruzada de diferentes muestras de DNA o cinética de reasociación de DNA desnaturalizado.

Esta técnica se basa en el hecho de que especies microbianas diferentes tendrán distintas proporciones de estos nucleótidos (Kozdrój y Van Elsas, 2001).

Otro método consiste en conocer las características metabólicas del microorganismo para lo cual se realizan pruebas bioquímicas en las cuales la utilización de un sustrato o la producción de ciertos metabolitos reflejan la presencia de una enzima y el resultado visual es un cambio de color del

indicador presente en el medio, algunas de estas enzimas no son constitutivas, es decir, se inducen de acuerdo a las condiciones de la prueba; si las enzimas probadas son constitutivas como la catalasa y la oxidasa se obtienen resultados consistentes (Bascomb, 1980).

Para una identificación más completa se obtienen los perfiles bioquímicos de las bacterias aisladas.

Los sustratos enzimáticos químicos desecados en cúpulas plásticas (API Biomerieux) son utilizadas para la identificación rápida de bacterias desconocidas. Cuando se agrega una suspensión de células bacterianas a la cámara de reacción, el sustrato es hidrolizado si la enzima está presente en la bacteria desconocida y el resultado es un producto coloreado de forma directa o mediante un subproducto que puede ser detectado al añadir un reactivo de color (Koneman, 1997).

La biodegradación de xenobióticos requiere de la acción de enzimas presentes durante las funciones metabólicas normales de los microorganismos. Estas enzimas pueden actuar en varios sustratos con estructura química similar, además de utilizar sus sustratos naturales. Para conocer las capacidades metabólicas de los microorganismos se pueden obtener perfiles de actividad enzimática.

En el presente estudio se utilizó el API ZYM (Biomérieux), este sistema permite estudiar las siguientes enzimas:

Fosfatasa:

- Alcalina: Cataliza la ruptura de enlaces éster a un pH de 9 a 10.5.
- Ácida: Cataliza la ruptura de enlaces éster a un pH de 4.5 a 7.

Esterasa y Lipasa:

- Esterasa: Cataliza la hidrólisis del ácido butírico.
- Lipasa: Hidrólisis del ácido mirístico.
- Esterasa-lipasa: Hidrólisis del ácido caprílico.

Proteasas:

- Tripsina: Ruptura de enlaces peptídicos cuando el grupo carboxilo es donado por lisina o arginina.
- Quimotripsina: Ruptura de enlaces peptídicos cuando el grupo carboxilo es donado por fenilalanina, triptofano o tirosina.

Glucosilhidrolasas:

- α -Galactosidasa: Hidrólisis de residuos de galactosa unidos mediante enlaces α -1,6 en oligosacáridos.
- β -galactosidasa: Hidrólisis de residuos de galactosa unidos mediante enlaces β -1,4 de galactosa.
- β -glucuronidasa: Hidrólisis de residuos de carbohidratos.
- α -glucosidasa: Hidrólisis de enlaces α -glucosídicos.

- β -glucosidasa: Hidrólisis de enlaces β -glucosídicos.
- N-acetil β glucosaminidasa: Hidrólisis de enlaces β -glucosídicos.
- α -manosidasa: Ruptura de uniones N-glicosídicas de manosa.
- α -fucosidasa: Ruptura de la estructura de glicoproteínas.

Aminopeptidasas:

- Leucina arilamidasa: Interviene en el catabolismo de la leucina.
- Valina arilamidasa: Intervienen en el catabolismo de la valina.
- Cistina arilamidasa: Cataliza la hidrólisis del puente disulfuro de la cistina.

Fosfohidrolasa:

- Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa: Cataliza la transferencia de grupos fosfato al agua, formando enlaces que conectan monómeros a macromoléculas.

(Price y Stevens, 1989; Ambriz, 2001)

Los géneros microbianos asociados a la biodegradación de xenobióticos más frecuentemente reportados corresponden a: *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Nocardia*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Candida*, *Pseudomonas* y *Rhodotorula* los que se han aislado de hidrocarburos del petróleo crudo, así como de residuos aromáticos tales como xileno, tolueno y benceno (Dott, 1992; Van Hamme y Odomeru, 2000; Adriaens y Kohler, 1989; Alvarez y Vogel, 1991; Paul y Clark, 1996; Rodríguez

del Alamo, 2001; Hernández y Higson, 1991; Yuste y Corbella, 2000; Steffensen y Alexander, 1995; Goldstein et al. 1985). En tanto que para los Inhibidores de hidratación de Arcillas que son los productos que se estudian en este trabajo, se ha reportado la presencia de: *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Micrococcus* (Ruiz, 2001).

2.6) Estudios de biodegradación de Inhibidores de Hidratación de Arcillas

Los fluidos de perforación en base agua son muy utilizados debido a que contienen sustancias orgánicas en poca cantidad lo que los hace poco tóxicos y favorece su biodegradabilidad.

La biodegradabilidad de los aditivos usados en la formulación de los fluidos de perforación, en especial de los IHA, es importante debido a que son empleados con frecuencia en la perforación de pozos petroleros en nuestro país y por lo tanto, el impacto ambiental que puedan causar al ser depositados directamente en el suelo (Ambriz, 2001).

En México no existe una regulación acerca de la biodegradabilidad de los Inhibidores de Hidratación de Arcillas usados en los fluidos de perforación. Los únicos antecedentes que existen al respecto son documentos elaborados por la EPA (Environmental Protection Agency) y la OECD

(Organization for Economic Cooperation and Development) en Estados Unidos y Europa respectivamente (Ruiz, 2001).

De ahí, la importancia de generar información acerca de los microorganismos capaces de biodegradar a los IHA, disminuyendo así la posibilidad de causar daño al ambiente.

3) JUSTIFICACIÓN

Considerando la constante utilización de los fluidos de perforación y de los Inhibidores de Hidratación de Arcillas como aditivos; así como la demostración de que algunos de estos son biodegradados por consorcios microbianos para el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

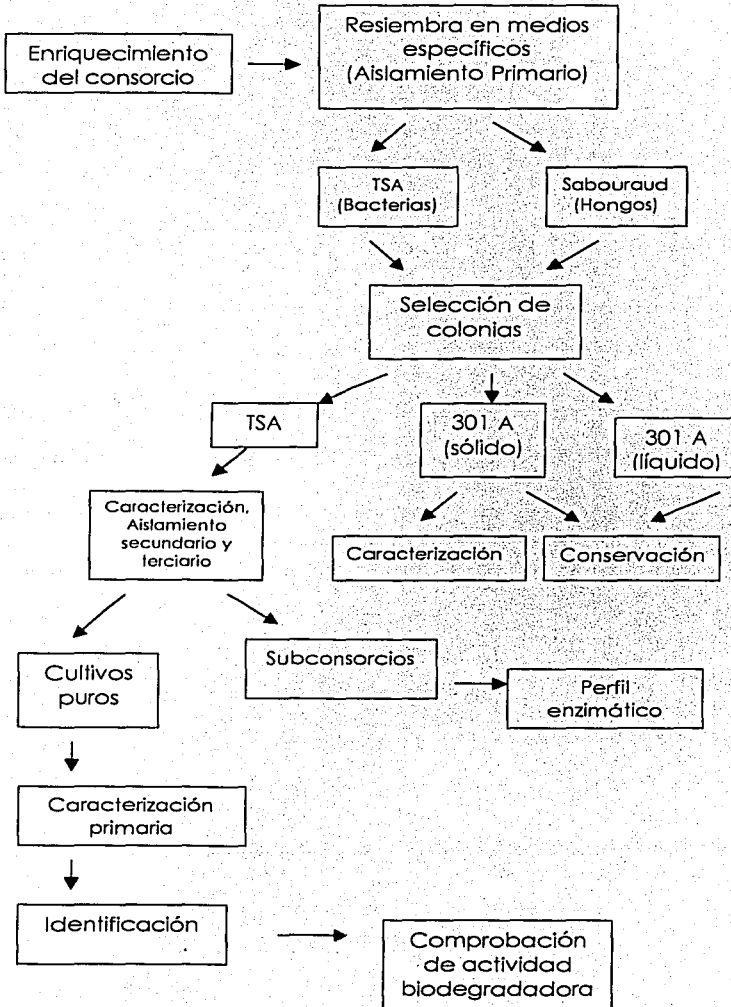
OBJETIVO GENERAL:

Aislar y caracterizar cepas bacterianas capaces de biodegradar inhibidores de hidratación de arcillas (IHA).

OBJETIVOS PARTICULARES:

- o Enriquecer los consorcios biodegradadores de IHA.
- o Aislar los microorganismos capaces de biodegradar IHA.
- o Identificar los microorganismos capaces de biodegradar IHA.
- o Verificar biodegradabilidad de IHA en cultivos puros.

DIAGRAMA DE TRABAJO



4) Materiales y métodos

Enriquecimiento de Consorcios Biodegradadores de IHA

En el presente estudio se utilizaron dos inhibidores de hidratación de arcillas en base agua, de naturaleza polimérica, denominados K y G, el primero de ellos posee grupos amino en su estructura y el segundo es un poliglicol; se emplearon además 4 tipos de consorcios microbianos.

Los consorcios fueron obtenidos en trabajos previos en los que se empleó medio mineral 301 A (ver anexo 1) con 1 mL de K o de G como fuente de carbono y como inóculo una muestra del corte de perforación o suelo de jardín; a los primeros se les denominó K1 y G1 y a los obtenidos de suelo de jardín como K2 y G2. (Cedillo C., 2001; Ambríz R., 2001)

Los consorcios K1 y G1 habían sido conservados en refrigeración por un periodo de un mes en tanto que K2 y G2 provenían directamente de un ensayo respirométrico (Ambríz, 2001) por lo que se encontraban activos.

De cada consorcio se tomaron 10 mL que fueron transferidos a matraces que contenían 100 mL del medio mineral 301 A adicionado con 1 mL del IHA correspondiente. Los matraces fueron incubados a 32°C en condiciones estáticas durante 10 días después de los cuales se hicieron observaciones microscópicas.

A los consorcios K1 y G1 se les realizó el seguimiento de la curva de crecimiento para ello se les hicieron lecturas de absorbancia a las 24, 48, 96, 168 y 216 horas a 460 nm en un espectrofotómetro Ultrospec 3000 y se graficaron en Microsoft Excel.

Aislamiento primario

Para favorecer la separación de bacterias y hongos presentes en los consorcios, se empleó la técnica de dilución y los medios de cultivo Agar Triptícaso Soya (TSA) o Sabouraud (Anexo 1).

Las placas con TSA (recomendadas por Brown en 1983) se incubaron a 32°C por 24 horas (Margesh y Schinner, 1997) y las de Sabouraud a temperatura ambiente por 7 días.

o Selección de colonias

En el desarrollo obtenido se procedió a observar las diferencias de morfología colonial y a seleccionar aquellas que se encontraron en mayor cantidad, a las que se consideró como representativas.

A las colonias seleccionadas se les asignó una clave formada por la denominación del consorcio de donde provenían y un número progresivo

y se procedió a efectuar de cada una los frotos y observaciones correspondientes.

o. Confirmación de utilización de IHA como fuente de carbono, caracterización primaria y conservación de cultivos

Las colonias seleccionadas se suspendieron en Solución Salina Isotónica (SSI) y a partir de esta suspensión se resembró en placas y tubos inclinados con TSA, tubos inclinados, cajas y matraces que contenían el medio 301 A adicionado del 1% del IHA correspondiente y se incubó a 32°C durante 24 y 48 horas respectivamente y en su caso con agitación a 175 rpm. De las colonias desarrolladas en placa se hizo descripción morfológica y observación microscópica, en tanto que los tubos y matraces se conservaron en refrigeración.

Aislamiento secundario

Se hizo a partir de las colonias desarrolladas en TSA, las cuales se suspendieron en SSI, de esta suspensión se transfirió 1 mL a 9 mL de SSI. Este procedimiento se repitió hasta obtener una dilución de 1×10^{-15} . De las tres últimas diluciones se tomó 0.1 mL, se colocó en la superficie de placas de TSA, se extendió con un ángulo de Digralsky y se incubó a 32°C por 24

horas, después de las cuales se observaron nuevamente las características coloniales y microscópicas.

Aislamiento Terciario

Con cada colonia de morfología diferente se repitió la suspensión, preparación de diluciones y siembra en TSA, procedimiento que se repitió hasta que se logró verificar en la misma placa el desarrollo de colonias de un solo tipo y con características microscópicas similares a las del subcultivo precedente. A partir de estas se hicieron tres resiembras sucesivas en TSA, en cada caso a las 24 horas se realizaron tinciones de Gram (Ramírez Gama *et al.* 2001: Anexo 2) y las observaciones microscópicas correspondientes.

Caracterización primaria

Se consideraron los siguientes aspectos:

De las colonias: morfología, tamaño, bordes, elevación, textura, color.

De la observación microscópica: morfología, tamaño, reacción al Gram, presencia o ausencia de cápsulas, esporas, inclusiones de reserva y movilidad.

Identificación

Las colonias puras se activaron en TSA, se confirmó la pureza mediante tinción de Gram, posteriormente se aplicó la prueba de la catalasa y la oxidasa (Anexo 3) (Mac Faddin, 1993) y se procedió a utilizar el sistema API que aún cuando está diseñado para el estudio de bacterias de interés clínico ofrece la posibilidad de determinar 61 reacciones bioquímicas, lo que permite obtener más información acerca de las cepas en estudio sin necesidad de emplear una gran cantidad de material. De acuerdo con la información obtenida con las pruebas anteriores se utilizó la galería API 50CHB con la complementaria API 20E. Siguiendo el instructivo del sistema API cada cepa se activó en un medio rico (TSA) y se incubó a 32°C por 24 horas.

Con el crecimiento obtenido se prepararon suspensiones con una turbiedad igual al punto 2 de Mc Farland, para ello se emplearon ampolletas de medio 50CHB y ampolletas con 5 mL de SSI para la galería 20E y se procedió a inocular las galerías llenando las cúpulas hasta el cuello, se incubaron por 24 horas a 32°C. En el caso de la galería 20E se utilizaron los reveladores requeridos en el instructivo.

Para la identificación de las cepas se utilizó el software API Lab plus V.3.3.3. con el que se obtiene el perfil numérico a partir del cual el programa proporciona el género y la especie microbiana con un porcentaje de confiabilidad.

Comprobación de la actividad biodegradadora de IHA en las cepas aisladas.

Esta se hizo de manera indirecta y para ello se asumió que las cepas que crecen en presencia del IHA como única fuente de carbono son capaces de biodegradarlo.

Con tal fin las cepas se activaron en TSA (24 hrs, 32°C). De cada uno de los cultivos se tomó una asada y se transfirió a matraces que contenían 100 mL de medio mineral 301 A con el IHA correspondiente en concentración de 1%. se incubaron a 32°C con agitación por 5 días. A los cultivos adaptados al IHA se procedió a ajustar la población a una absorbancia de 0.008 en un espectrofotómetro Ultrospec 3000. De cada cultivo se tomó 1 mL y se inoculó en matraces con el mismo medio y por duplicado, estos fueron incubados durante 6 días a 32°C con agitación de 175 rpm. De estos se determinó la turbiedad cada 24 horas, las lecturas se realizaron a 460 nm en un espectrofotómetro Ultrospec 3000 y se graficaron en Microsoft Excel.

Perfil enzimático de los subconsorcios

En los subconsorcios la caracterización se limitó a la descripción morfológica y se complementó con el perfil de enzimas constitutivas para lo cual, cada subconsorcio se activó en TSA (24 horas y 32°C) y posteriormente se inoculó en la galería API ZYM (Biomerieux).

5) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

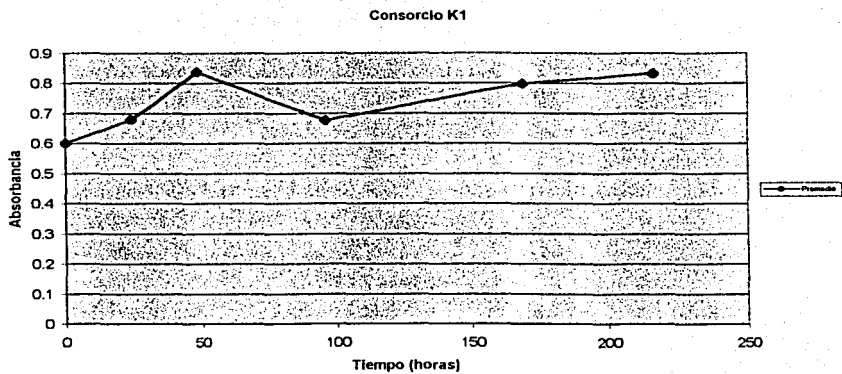
Enriquecimiento de consorcios biodegradadores de IHA

Se comprobó que las muestras iniciales con las que se trabajó, provenientes de cortes de perforación (K1 y G1) o suelo de jardín (K2 y G2) contenían consorcios ya que al tomar muestras de los diferentes cultivos y observarlas al microscopio después de someterlas a la tinción de Gram se encontraron microorganismos agrupados, de diferentes tipos.

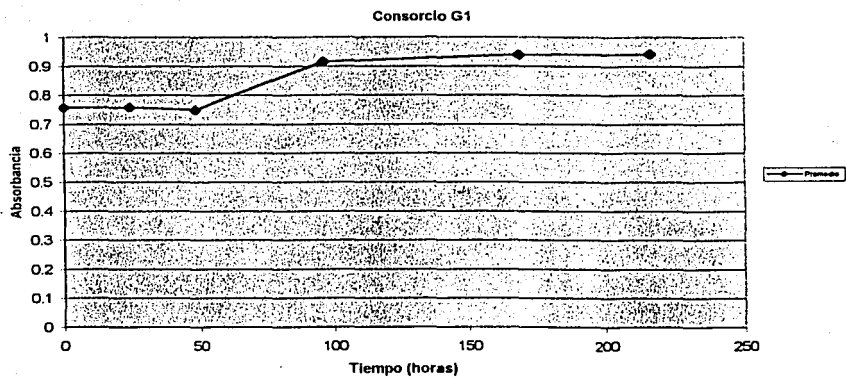
En el caso de K1 se encontraron Bacilos cortos y largos G(+) además de Bacilos G(-); en el caso del consorcio G1 se encontraron Bacilos G(+) cortos y largos, cocobacilos y bacilos G(-); para el consorcio K2 se hallaron cocos, cocobacilos y bacilos G(-) así como bacilos G(+). En el consorcio G2 se hallaron cocos, cocobacilos y bacilos G(-) y también bacilos y cocobacilos G(+).

En las gráficas 1 y 2 se muestra el aumento de la densidad poblacional en ambos consorcios. En K1 fue inmediata, en tanto que G1 mostró una fase de adaptación inicial y una fase logarítmica de 48 horas.

Gráfica 1. Curva de crecimiento del consorcio K1



Gráfica 2. Curva de crecimiento del consorcio G1



Aislamiento de microorganismos capaces de biodegradar IHA

Aún cuando existe información sobre cortes de perforación, particularmente sobre hidrocarburos en la que se indica que existen numerosas bacterias y hongos tales como *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Mortierella*, *Candida*, *Monilia*, *Spicaria*, *Rhodotorula* y *Chrisosporium* que participan en la biodegradación de estos compuestos (Rodríguez del Alamo, 2001); en el presente trabajo sólo se registró el desarrollo de bacterias en los cuatro consorcios estudiados.

Aislamiento primario y confirmación de la utilización de IHA en las colonias seleccionadas

En las tablas 1 y 2 se muestran las características de las colonias seleccionadas en el aislamiento primario. En estas se observa que todas las colonias fueron capaces de desarrollarse en los dos medios de cultivo utilizados. El crecimiento obtenido en el medio mineral 301 A (Tabla 1) más el IHA confirma que las colonias seleccionadas utilizan el IHA respectivo como fuente de carbono.

La comparación de las características coloniales obtenidas en los medios 301 A (Tabla 1) y TSA (Tabla 2) muestran que en el primero la morfología fue muy similar y el desarrollo más reducido lo que se manifestó por la cantidad y

tamaño de las colonias. En tanto que en TSA se presentó mayor desarrollo y diversidad; no obstante las características microscópicas fueron similares en los dos tipos de medios de cultivo. En ambos casos se observa que sólo en K21, K22, K23, y G21 la morfología microscópica es homogénea, en tanto que en los otros casos, las observaciones microscópicas indican que las colonias están integradas por bacterias de diferente morfología y en nueve casos mezclas de bacterias Gram positivas y Gram negativas (ver tabla 1), lo que indica que el consorcio inicial fue separado en subconsorcios y que de las 17 colonias aisladas (tabla 2), solo en 4 casos se registró un solo tipo de bacterias.

Considerando que la diferenciación de colonias es mayor en TSA, se decidió emplear este medio en las siguientes etapas de aislamiento.

Tabla 1. Resultados de la comprobación de la actividad biodegradadora de IHA de 17 colonias seleccionadas en el aislamiento primario.

COLONIA	MACROMORFOLOGÍA	MICROMORFOLOGÍA
K11	Puntiforme, filamentosos, plana, butirosa, blanca, 1 mm.	Bacilos G(+) y G(-)
K12		Bacilos G(+) largos y cortos
K13		Bacilos G(+) 2 tamaños y G(-)
K14		Bacilos G(+) 2 tamaños y G(-)
K21	Puntiforme, entero, plana, butirosa, blanca, 1 mm.	Cocobacilos y bacilos G(-)
K22		Cocos G(-)
K23		Bacilos G(-)
K24		Bacilos G(+) y G(-)
G11	Puntiforme, ondulado, plana, butirosa, blanca con centro opaco y borde transparente, 1- 2 mm.	Cocobacilos y bacilos G(+)
G12		Cocobacilos y bacilos G(-), bacilos G(+)
G13		Bacilos G(+) 2 tamaños y G(-)
G14		Bacilos cortos y largos G(+)
G15		Bacilos G(+) y G(-)
G16		Bacilos G(+) y G(-)
G21		Puntiforme, entero, plana, butirosa, blanca, 1 mm.
G22	Cocos, cocobacilos y bacilos G(-)	
G23	Bacilos G(+) y cocobacilos G(-)	

Tabla 2. Resultados del aislamiento primario. Caracterización de 17 colonias desarrolladas en TSA.

COLONIA	MACROMORFOLOGÍA	MICROMORFOLOGÍA
K11	Circular, entero, convexa, mucoide, blanca, centro oscuro, 2mm.	Bacilos G(+) y G(-)
K12	Circular, entero, convexa, mucoide, blanca, 2mm.	Bacilos cortos y largos G(+)
K13	Circular, entero, convexa, butirosa, blanca, 2 mm.	Bacilos G(+) 2 tamaños y G(-)
K14	Puntiforme, entero, convexa, mucoide, blanca, 1mm.	Bacilos G(+) 2 tamaños y G(-)
K21	Puntiforme, entero, convexa, mucoide, crema, 1 mm.	Cocobacilos y bacilos G(-)
K22	Circular, entero, convexa, butirosa, amarillo intenso, 2 mm.	Cocos G(-)
K23	Puntiforme, entero, convexa, mucoide, amarillo claro, 1 mm.	Bacilos G(-)
K24	Circular, entero, convexa, butirosa, amarillenta, 2 mm.	Bacilos G(+) y G(-)
G11	Puntiforme, entero, plana, mucoide, blanca, 1 mm.	Bacilos y cocobacilos G(+)
G12	Circular, ondulado, rugosa, butirosa, blanca, centro más oscuro, 1.5 mm.	Cocobacilos y bacilos G(-), bacilos G(+)
G13	Circular, entero, convexa, butirosa, blanca, 2mm.	Bacilos G(+) 2 tamaños y G(-)
G14	Circular, entero, convexa, mucoide, blanca, 2mm.	Bacilos G(+) largos y cortos
G15	Circular, ondulado, rugosa, butirosa, blanca, 2 mm.	Bacilos G(+) y G(-)
G16	Circular, ondulado, rugosa, butirosa, crema, 2mm.	Bacilos G(+) y G(-)
G21	Circular, entero, plana, butirosa, amarillenta, 1-2 mm.	Bacilos G(+)
G22	Circular, entero, convexa, butirosa, crema, 2mm.	Cocos, cocobacilos y bacilos G(-)
G23	Circular, entero, convexa, mucoide, crema, 2mm.	Bacilos G(+) y cocobacilos G(-)

Aislamiento primario, secundario y terciario

En la tabla 3 se muestran las claves de los subconsorcios y cultivos puros que se obtuvieron en las diferentes etapas de aislamiento. En esta se observa que en el aislamiento primario se obtuvieron cuatro tipos de colonias del consorcio K1, seis de G1, cuatro de K2 y tres de G2.

En la segunda etapa de aislamiento se obtuvieron cinco tipos de resultados:

- a) Carencia de desarrollo en K21, K22, K23 y G22.
- b) Confirmación de un solo tipo de morfología colonial y microscópica en G21.
- c) Pérdida de los cocobacilos Gram negativos en G23.
- d) Subcultivos con características iguales a las observadas en las colonias del aislamiento primario que se describieron en la tabla 2 (K12, G12, G14 y G15).
- e) Segregación de 2 o 3 tipos de colonias a partir de 7 de los aislamientos primarios. Las características detalladas de éstas, se describen en la tabla 4.

Respecto al primer inciso, es conveniente hacer hincapié en el hecho de que durante el aislamiento primario solo K21, K22, K23 y G21 mostraron un solo tipo de morfología microscópica y aparentemente correspondían a cultivos puros, de estos, solo G21 constituido por bacilos Gram positivos fue capaz de

desarrollarse en la siguientes resiembras, en tanto que los otros, así como G22 constituidos por bacterias Gram negativas no se desarrollaron. En estos 4 casos se procedió a regresar a los subcultivos conservados en TSA y 301 A, los que para su activación fueron inoculados en los medios de cultivo líquidos correspondientes e incubados a 32°C durante 7 días, después de los cuales tampoco se registró desarrollo. En otros estudios este tipo de resultados se atribuye a la dependencia que existe entre los miembros de los consorcios (Caldwell *et al.* 1997; Shapiro, 1998).

Con objeto de confirmar la pureza de los subcultivos señalados en **b** y **c**, así como de favorecer la separación de los integrantes de los subconsorcios indicados en **d** y **e**, todos los subcultivos fueron resemebrados tres veces más. En cada ocasión, en la preparación de las diluciones, además de agitar y utilizar tensoactivos, se sustituyó la pipeta por jeringa de insulina (comunicación personal con el Dr. Gutierrez Pabello), lo que permitió la obtención de 40 colonias con características diferentes, de las cuales 28 estuvieron representadas por subconsorcios y 12 por cultivos puros (Tabla 3).

Tabla 3. Claves asignadas a subconsorcios y cultivos puros obtenidos a partir de los consorcios K1, K2, G1 y G2.

CONSORCIOS	AISLAMIENTO PRIMARIO	AISLAMIENTO SECUNDARIO	AISLAMIENTO TERCARIO	
K1	K11	K11a	K11a	
		K11b	K11b	
	K12	K12	K12aa	K12aa
			K12bb	K12bb
			K12cc	K12cc
	K13	K13a	K13aa	K13aa
			K13ab	K13ab
			K13ap	K13ap
		K13b	K13ba	K13ba
			K13bp	K13bp
		K13c	K13ca	K13ca
	K14	K14a	K14aa	K14aa
			K14ab	K14ab
		K14b	K14ac	K14ac
K14bp			K14bp	
K14bb			K14bb	
K14bc			K14bc	
K14c	K14c	K14c		
K2	K21	Sin desarrollo	Sin desarrollo	
	K22	Sin desarrollo	Sin desarrollo	
	K23	Sin desarrollo	Sin desarrollo	
	K24	K24a	K24aap	K24aap
		K24abp	K24abp	K24abp
K24b	K24b	K24b		
K24c	K24c	K24c		
G1	G11	G11a	G11a	
		G11b	G11bp	
	G12	G12	G11bb	G11bb
			G12	G12
	G13	G13a	G13ap	G13ap
			G13ab	G13ab
	G14	G13b	G13b	G13b
			G14	G14ap
	G15	G14	G14bp	G14bp
			G15a	G15aa
	G16	G15a	G15ab	G15ab
G16a			G16aa	
G16b		G16a	G16ab	G16ab
			G16bp	G16bp
G16bb	G16bb	G16bb		
G2	G21p	G21p	G21p	
	G22	Sin desarrollo	Sin desarrollo	
	G23	G23p	G23p	

El subconsorcio G12 obtenido en la primera etapa de aislamiento, así como K11b, K14c, K24b, K24c, G11a y G13b procedentes del aislamiento secundario presentaron las mismas características descritas en las tablas 2 y 4, por lo que en las tablas 5 y 6 solo se describe la morfología colonial y microscópica de los otros 20 subconsorcios en los que predominan las bacterias Gram positivas.

En resumen, dieciséis subconsorcios corresponden a mezclas de bacilos Gram positivos de diferentes tamaños, muchos de ellos esporulados y algunos con gránulos citoplasmáticos; once a mezclas de bacterias Gram positivas y negativas y en un solo caso se presentaron bacilos y cocobacilos Gram negativos.

Tabla 4. Resultados del aislamiento secundario. Caracterización de 18 colonias desarrolladas en TSA de los consorcios K1 , K2 , G1 y G2.

COLONIA	MACROMORFOLOGÍA	MICROMORFOLOGÍA
K11a	Puntiforme entero, convexa, mucoide, blanca, 1mm.	Bacilos G(+) de dos tamaños y pocos bacilos G(-)
K11b	Puntiforme, entero, plana, butirosa, blanca, 1mm.	Bacilos G(+) de varios tamaños, algunos con gránulos
K13a	Circular, ondulado, convexa, butirosa, centro rosa, borde crema, 2-3mm.	Bacilos G(+) y bacilos G(-)
K13b	Circular, entero, convexa, mucoide, blanca, 2-3 mm.	Bacilos G(+) y bacilos G(-)
K13c	Puntiforme, entero, convexa, butirosa, blanca, 1-2mm.	Bacilos G(+) y bacilos G(-)
K14a	Puntiforme, entero, plana, butirosa, blanca 1-2 mm.	Bacilos G(+) y bacilos G(-)
K14b	Puntiforme, entero, convexa, butirosa, blanca, 1-2 mm.	Bacilos G(+) y bacilos G(-)
K14c	Puntiforme, entero, convexa, butirosa, blanca, 2mm.	Bacilos G(+) y bacilos G(-)
K24a	Circular, entero, plana, mucoide, blanca, 2-3 mm.	Bacilos G(+) de dos tamaños
K24b	Circular, entero, convexa, mucoide, blanca 2-3 mm.	Bacilos y cocobacilos G(+).
K24c	Circular, entero, plana, mucoide, crema, 2-3 mm.	Bacilos G(+) cortos y largos.
G11a	Puntiforme, plana, entero, mucoide, blanca, 1mm.	Bacilos G(+) desteñidos de dos tamaños, extremos redondos
G11b	Circular, ondulado, plana, mucoide, blanca, 2mm.	Bacilos G(+), extremos redondos y G(-) formando cadenas y con extremos redondos
G13a	Circular, entero, convexa, mucoide, blanca, 2mm.	Bacilos G(+) y G(-)
G13b	Circular, entero, plana, mucoide, blanca, 2mm.	Bacilos G(+) y G(-) cortos
G16a	Circular, entero, plana, butirosa, crema, 2mm.	Bacilos G(+), G(-) y cocos
G16b	Circular, entero, plana, butirosa, blanca, 2mm.	Bacilos G(+) de dos tamaños
G23	Circular, entero, convexa, mucoide, crema, 2mm.	Bacilos G(+)

Tabla 5. Resultados del aislamiento terciario. Caracterización de 13 subconsorcios desarrollados en TSA.

COLONIA	MACROMORFOLOGÍA	MICROMORFOLOGÍA
K12aa	Circular, irregular, convexa, mucoide, crema, 3mm.	Bacilos G(+) de dos tamaños, extremos redondos, con gránulos y en cadenas largas
K12bb	Circular, entero, convexa, mucoide, crema, 3mm.	Bacilos G(+) de dos tamaños, extremos redondos
K12cc	Circular, entero, convexa, mucoide, crema, 2mm.	Bacilos G(+) de dos tamaños
K13aa	Circular, entero, convexa, mucoide, crema, 2-3 mm.	Bacilos G(+), con gránulos y esporulados y G(-)
K13ab	Circular, entero, convexa, mucoide, crema, 2-3 mm.	Bacilos G(+), con extremos redondos y en cadenas y G(-)
K13ba	Puntiforme, entero, convexa, mucoide, crema, 1mm.	Bacilos G(+), esporulados y G(-)
K13ca	Circular, irregular, convexa, mucoide, crema, 2-3 mm.	Bacilos G(+) de dos tamaños, extremos redondos y algunos esporulados
K13cb	Circular, irregular, convexa, mucoide, crema, 2-3mm.	Bacilos G(+) cortos, extremos redondos y G(-) en empalizada
K14aa	Circular, irregular, convexa, mucoide, color crema, centro claro, 2-3 mm.	Bacilos G(+) con gránulos de 2 tamaños
K14ab	Circular, entero, convexa, mucoide, crema, 2-3mm.	Bacilos G(+), extremos redondos, con gránulos y G(-)
K14ac	Circular, entero, convexa, mucoide, crema, 2mm.	Bacilos G(+) de dos tamaños, con gránulos
K14bb	Circular, entero, convexa, mucoide, crema, 2-3mm.	Bacilos G(+) de dos tamaños con gránulos y esporulados
K14bc	Circular, irregular, convexa, mucoide, crema, 2-3mm.	Bacilos G(-) cortos y largos

Tabla 6. Resultados del aislamiento terciario. Caracterización de 7 subconsorcios desarrollados en TSA.

COLONIA	MACROMORFOLOGÍA	MICROMORFOLOGÍA
G11bb	Circular, irregular, convexa, mucoide, crema, 2-3 mm.	Bacilos G(+) de dos tamaños, extremos redondos y sin agrupación
G13ab	Circular, irregular, convexa, mucoide, crema, 2-3 mm.	Bacilos G(+) de dos tamaños
G15aa	Circular, irregular, convexa, mucoide, crema, centro más oscuro, 2-3 mm.	Bacilos G(+) de dos tamaños, extremos redondos y sin agrupación
G15ab	Circular, irregular, convexa, mucoide, crema, 2-3 mm.	Bacilos G(+) de dos tamaños, extremos redondos y esporulados
G16aa	Circular, entero, plana, mucoide, blanca, 2-3 mm.	Bacilos G(+) y G(-) extremos redondos en cadenas cortas, cocos G(-) en racimos pequeños
G16ab	Circular, entero, plana, mucoide, blanca, 2-3 mm.	Bacilos G(+), largos y cortos, extremos redondos y sin agrupación y G(-) cortos, extremos redondos y sin agrupación
G16bb	Circular, irregular, convexa, mucoide, crema, 2-3 mm.	Bacilos G(+) largos esporulados y cortos con extremos redondos y sin agrupación

Caracterización primaria de cepas puras

En la tabla 7 se presentan las características macroscópicas y microscópicas de las 12 cepas aisladas, así como los resultados de las pruebas de oxidasa y catalasa. En esta se observa que tres proceden del consorcio K1 (K13ap, K13bp, K14bp); dos de K2 (K24aap, K24abp); cinco de G1 (G11bp, G13ap, G14ap, G14bp y G16bp) y dos de G2 (G21p y G23p). Una sola cepa (K14bp) es Gram negativa lo que confirma que el predominio de Gram positivas. Por otra parte se observa que todas las cepas resultaron oxidasa negativas y catalasa positivas.

Tabla 7. Caracterización primaria de 12 cepas puras.

CEPA	MACROMORFOLOGÍA	MICROMORFOLOGÍA	OXIDASA	CATALASA
K13ap	Circular, entero, convexa, butirosa, blanca, 2 mm.	Bacilos G(+) con gránulos, esporulados, cadenas cortas, 3µm/1.5µm	-	+
K13bp	Circular, entero, convexa, mucoide, crema, 2-3 mm.	Bacilos G(+) desteñidos, esporulados con extremos redondos y en cadenas, 3-4µm/1.5µm	-	+
K14bp	Puntiforme, entero, convexa, butirosa, crema, 1 mm.	Bacilos G(-), con extremos redondos y sin agrupación, 3µm/1.5µm	-	+
K24aap	Circular, irregular, convexa, mucoide, crema, 3mm.	Bacilos G(+) largos con gránulos, extremos redondos y esporulados, 3-4µm/1.5µm	-	+
K24abp	Circular, irregular, convexa, mucoide, crema, 3mm.	Bacilos G(+) largos con gránulos, extremos redondos y esporulados, 3-4µm/1.5µm	-	+
G11bp	Circular, irregular, convexa, mucoide, crema, 2-3 mm.	Bacilos G(+), con gránulos y en cadenas, 3µm/1.5µm	-	+
G13ap	Circular, entero, convexa, mucoide, blanca, 2mm.	Cocobacilos G(+), con extremos redondos, 1.5µm/1.5µm,	-	+
G14ap	Circular, irregular, corrugada, mucoide, crema, 2 mm.	Bacilos G(+), largos y anchos con extremos redondos, 3-4µm/1.5µm,	-	+
G14bp	Circular, irregular, corrugada, mucoide, crema, 2 mm.	Bacilos G(+), con extremos redondos y en cadenas, 3-4µm/1.5µm	-	+
G16bp	Puntiforme, entero, convexa, butirosa, crema con centro transparente, 1 mm.	Bacilos G(+) con extremos redondos y cadenas muy largas, 3µm/1.5µm	-	+
G21p	Circular, ondulado, convexa, mucoide, blanca, 2-3 mm.	Bacilos G(+) desteñidos con gránulos, esporulados, 3-4µm/1.5µm	-	+
G23p	Circular, ondulado, convexa, mucoide, blanca, 2-3 mm.	Bacilos G(+) desteñidos con gránulos, esporulados, 3-4µm/1.5µm	-	+

Identificación

Considerando el Gram y la presencia de esporas se procedió a consultar la sección 13 del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology en la que se incluyen 6 géneros de bacilos y cocos Gram positivos formadores de endosporas, lo que permitió descartar 5 géneros que corresponden a *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Esporolactobacillus*, *Oscillospora* y *Sporosarcina*. Los dos primeros debido a que son anaerobios estrictos y por lo tanto no se pudieron desarrollar en las condiciones que se emplearon; en tanto que *Esporolactobacillus* (anaerobio facultativo) es catalasa negativo y por tanto con una reacción opuesta a la registrada en todas las cepas en estudio. Respecto a *Oscillospora* y *Sporosarcina* estos presentan morfología y agrupación (bacilos largos, filamentosos o cocoides en tétradas o paquetes) que no corresponden a las registradas por lo que se consideró que excepto K14bp y G13ap las otras cepas aisladas pertenecen al género *Bacillus* del cual se reportan 34 especies.

Con base en lo anterior para la identificación de los bacilos se aplicó el sistema de galerías API 50 CHB y su complementaria 20E. Los resultados se muestran en la tabla 8, en ésta se observa en forma general dos grupos, en el primero se incluyen ocho cepas que variaron entre sí de 5 a 14 de las pruebas efectuadas y que son totalmente diferentes a G21p y G23p en 21 de las 61 pruebas realizadas.

El análisis del perfil bioquímico con el software API lab plus V3.3.3 permitió la identificación con un grado de confiabilidad superior al 95% de 6 de las cepas que corresponden a:

K13ap	<i>Bacillus licheniformis</i>	99.9%
K13bp	<i>Bacillus licheniformis</i>	99.9%
G11bp	<i>Bacillus licheniformis</i>	99.9%
G14ap	<i>Bacillus subtilis</i>	95%
G14bp	<i>Bacillus subtilis</i>	95%
G16bp	<i>Bacillus licheniformis</i>	99.9%

Considerando que el sistema API está diseñado para la identificación de especies de interés clínico, no fue sorprendente que para las cepas K24aap, K24abp, G21p y G23p no se lograra la identificación de la especie y únicamente fueran identificadas como miembros del género *Bacillus*.

Tabla 8. Resultados de las pruebas de identificación con las galerías API 50 CHB y 20E

PRUEBA	K13AP	K13BP	K24AAP	K24ABP	G11BP	G14AP	G14BP	G16BP	G21P	G23P
Glicerol (SUCHB)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eritriol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Ribosa	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
D-xilosa	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
L-xilosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β metil-xilosido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactosa	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
D-glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
D-fructosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manosa	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
L-sorbosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ramnosa	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
α metilD-manosido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α metilD-glucósido	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-
N-acetil glucosamina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amigdalina	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Arbutina	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Esculina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Celobiosa	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Lactosa	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiosa	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Trehalosa	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Inulina	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Melecitosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-rafinosa	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Almidón	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Glicógeno	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Xilitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-gentiobiosa	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
D-turanosa	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-
D-lixosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-tagatosa	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D-fucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-fucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-cetogluconato	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
5-cetogluconato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ONPG (20E)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
ADH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LDC	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
ODC	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
Citrato	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+
Acido sulfhídrico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
Gelatinasa	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
Nitrosos	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Por otra parte llama la atención que cepas identificadas como *Bacillus licheniformis* presentan diferencias en la prueba de Voges-Proskauer (VP), la que en el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology y en la marcha de Gordon es considerada como un criterio importante en la diferenciación de especies. Asimismo la cepa G14ap que resultó VP negativa fue identificada en este sistema como *B. subtilis*, especie que se caracteriza por ser VP positiva.

En este sentido Logan y Berkeley (1984) indican que la heterogeneidad de este grupo hace difícil la diferenciación de especies. De este modo para caracterizar a este género algunos autores además de contemplar el sistema API incluyen pruebas adicionales en las que se contemplan criterios básicos para la separación de grupos, tales como las recomendadas en 1968 por Wolf y Barker (Kuhnig y Borst, 1985).

Con base en lo anterior para las cepas no identificadas se decidió aplicar la marcha de Wolf y Barker (1968) (anexo 4) y confirmar los resultados de los dos sistemas mediante la marcha de Gordon (1977) (anexo 5), cuyos criterios son recomendados en el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1986).

En la tabla 9 se muestran los resultados obtenidos con dos cepas de referencia y las 4 cepas que no fueron identificadas por el sistema API. La

comparación de los resultados con el esquema de separación de especies propuesto por Wolf y Barker (anexo 4) permitió identificar a las cuatro cepas como *Bacillus cereus*.

Tabla 9. Resultados de la marcha de Wolf y Barker

PRUEBA	<i>B.SUBTILIS</i>	<i>B.LICHENIFORMIS</i>	K24AAP	K24ABP	G21P	G23P
Espora oval	+	+	+	+	+	+
Crecimiento a pH 6 y 60°C	-	-	-	-	-	-
Crecimiento con glucosa en anaerobiosis	-	+	+	+	+	+
Lecitinasa	-	-	+	+	+	+
Ácido a partir de glucosa con amonio	+	-	-	-	-	-
Voges Proskauer	+	-	+	+	+	+

En la tabla 10 se exponen los resultados de la tercera serie de pruebas de identificación que corresponden a la marcha de Gordon la que permitió separar a las cepas como se indica en la figura 1, con lo que se logró ratificar la especie de 4 de las cepas previamente identificadas (K13ap, K13bp, G21p y G23p), en tanto que para las otras seis la identificación es confusa.

Figura 1. Marcha de Gordon (1977)

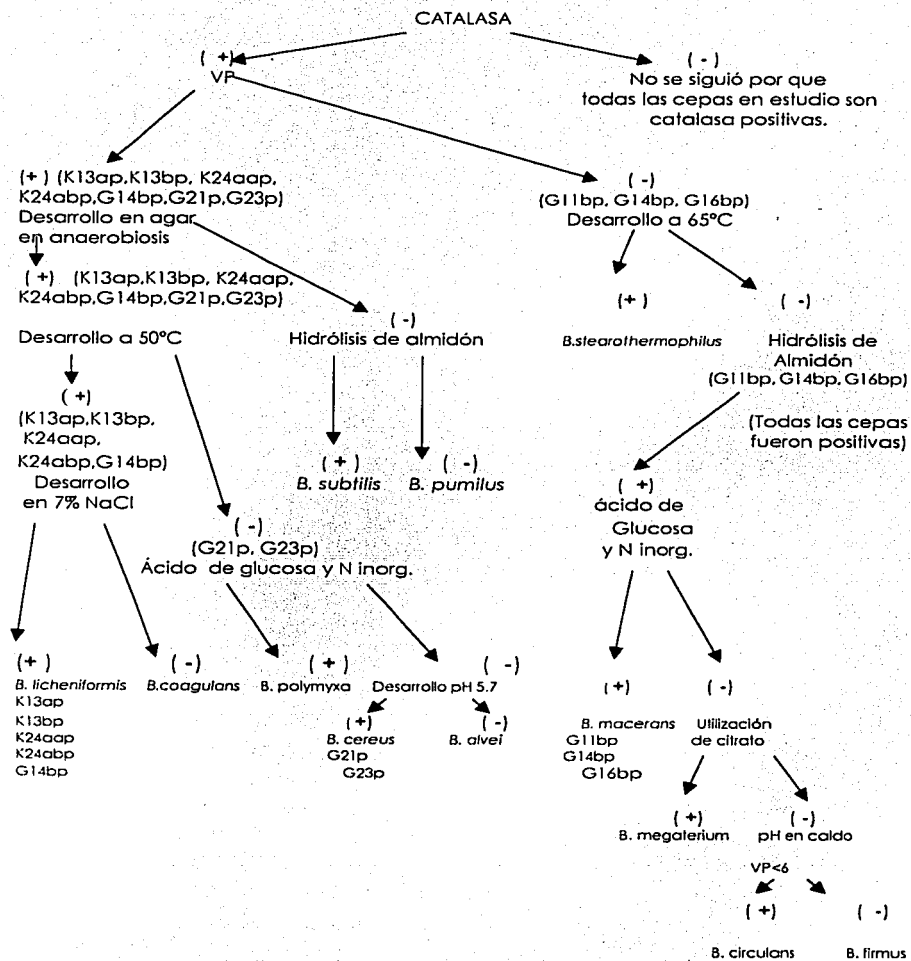


Tabla 10. Resultados de la marcha propuesta por Gordon

PRUEBA	K13AP	K13BP	K24AAP	K24ABP	G11BP	G14AP	G14BP	G16BP	G21P	G23P
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
Desarrollo a 50°C en CN	+	+	+	+	*	*	+	*	-	-
Crecimiento en AN con 7% NaCl	+	+	+	+	*	*	+	*	*	*
Crecimiento a pH 5.7 (CN)	*	*	*	*	*	*	*	*	+	+
Desarrollo en anaerobiosis	+	+	+	+	*	*	+	*	+	+
Desarrollo a 65°C	*	*	*	*	-	-	*	-	*	*
Hidrólisis de almidón	*	*	*	*	+	+	*	+	*	*
Acido y gas de glucosa	*	*	*	*	+	+	*	+	-	-

* La prueba no es necesaria para esa cepa.

En la tabla 11 se muestran las especies que se determinaron por cada uno de los sistemas, en esta se observa que las cepas K24aap y K24abp permanecen dudosas debido a que dieron positiva la prueba de la lecitinasa, característica que no corresponde a *B. licheniformis*. Así mismo para G11bp, G16bp y G14ap se descarta la identificación previa de las dos primeras como *B. licheniformis* y de G14ap como *B. subtilis*. Debido a que las tres cepas son VP negativas, tienen capacidad para desarrollarse a 65°C y producir ácido y gas a partir de glucosa con nitrógeno inorgánico, así como incapacidad para hidrolizar el almidón. Por otra parte se cuestiona que correspondan a *B. macerans* debido a que en esta especie se reporta la formación de esporangios hinchados respecto a la célula madre, así como

Incapacidad para desarrollarse en presencia de 7% de cloruro de sodio, características que no fueron observadas en ninguna de las cepas.

Respecto a G14bp se demostró que esta cepa se desarrolló abundantemente en condiciones anaeróbicas y también cuando fue incubada a 50°C, características que la hacen diferente de *B. subtilis* por lo que se duda de la identificación inicial y se considera similar a *B. licheniformis* debido a su capacidad para desarrollarse en agar nutritivo adicionado con cloruro de sodio al 7% lo que demuestra que la identificación de estas cepas es dudosa debido a que el análisis realizado por el software del sistema API, no coinciden con los resultados de las pruebas consideradas como criterios básicos.

Tabla 11. Comparación de especies de *Bacillus* identificadas por tres sistemas

CEPAS	API	WOLF Y BARKER	GORDON
K13ap	<i>Bacillus licheniformis</i>	*	<i>Bacillus licheniformis</i>
K13bp	<i>Bacillus licheniformis</i>	*	<i>Bacillus licheniformis</i>
K24aap	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
K24abp	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
G11bp	<i>Bacillus licheniformis</i>	*	<i>Bacillus macerans</i>
G14ap	<i>Bacillus subtilis</i>	*	<i>Bacillus macerans</i>
G14bp	<i>Bacillus subtilis</i>	*	<i>Bacillus licheniformis</i>
G16bp	<i>Bacillus licheniformis</i>	*	<i>Bacillus macerans</i>
G21p	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
G23p	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>

Las especies identificadas se reportan como parte de la biota del suelo, además poseen hábitats como agua de río, agua de mar contaminada y en ocasiones sedimentos marinos profundos, en donde biodegradan polímeros, por lo que se les considera parte importante de los ciclos del carbono y del nitrógeno (Sneath, 1986; Priest, 1989).

Existen numerosos estudios que reportan miembros del género *Bacillus* (Van Hamme y Odomeru, 2000) y en especial a *Bacillus licheniformis* como microorganismos capaces de degradar xenobióticos (Yakimov *et al.* 1997); esta especie ha sido aislada también de zonas costeras en tanto que *B. cereus* de suelos pobres en materia orgánica (Claus y Fritze, 1989).

Comprobación de actividad biodegradadora de IHA en cultivos puros

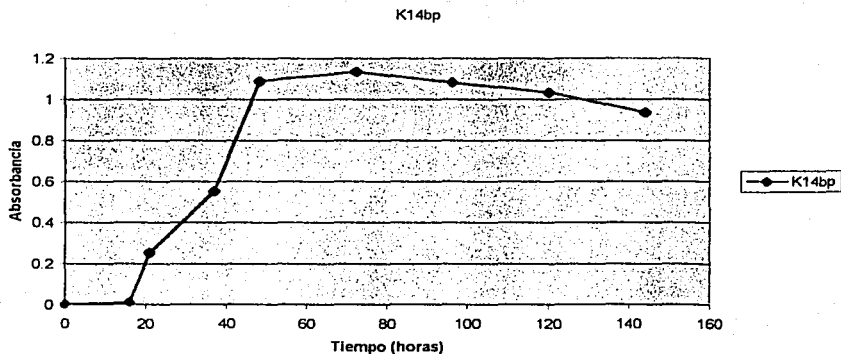
En las gráficas 3 a 5 se presentan las curvas de desarrollo de ocho cepas aisladas. En estas se observa que todas fueron capaces de utilizar IHA como única fuente de carbono, lo que de manera indirecta demuestra su capacidad para biodegradarlos.

Las curvas de crecimiento muestran que el desarrollo de las cepas procedentes de los consorcios K, K14bp (cepa no identificada constituida por bacilos Gram negativos) mostró ser la más activa, ya que se registró un desarrollo 14 a 22 veces mayor que el obtenido con otras cepas del consorcio K y 28 a 44 veces superior al registrado con las cepas procedentes del consorcio G, esto puede relacionarse con la estructura química de los IHA ya que el Inhibidor K al poseer grupos amino puede encontrarse en una forma más disponible y ser utilizado con mayor facilidad por los microorganismos que el IHA denominado G cuya estructura corresponde a un poliglicol (Ambriz, 2001).

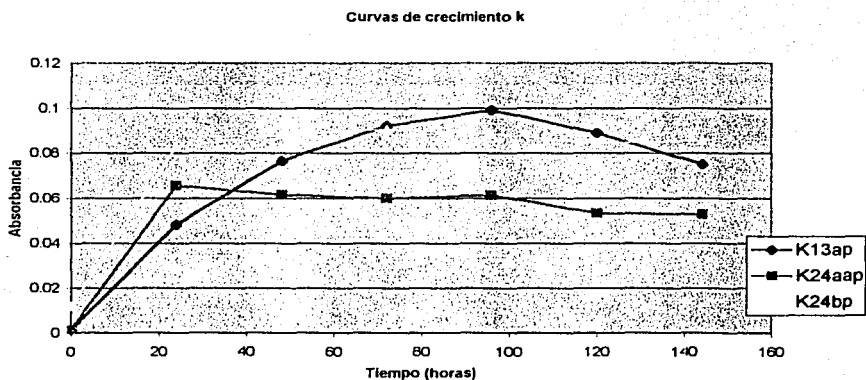
En general se observa que en cinco cepas, el desarrollo exponencial se presentó desde la primera lectura, en la cepa K13ap se mantuvo incluso hasta las 96 horas. Respecto a las otras tres cepas presentan una fase de adaptación similar, en estas la fase logarítmica se inicia alrededor de las 24

horas y se mantiene hasta las 48 horas en las cepas K14bp y G16bp, en tanto que en G23p hasta las 72 horas.

Gráfica 3. Curva de crecimiento de la cepa K14bp



Gráfica 4. Curvas de crecimiento de las cepas pertenecientes a los consorcios K1 y K2.



Gráfica 5. Curvas de crecimiento de las cepas pertenecientes a los consorcios G1 y G2

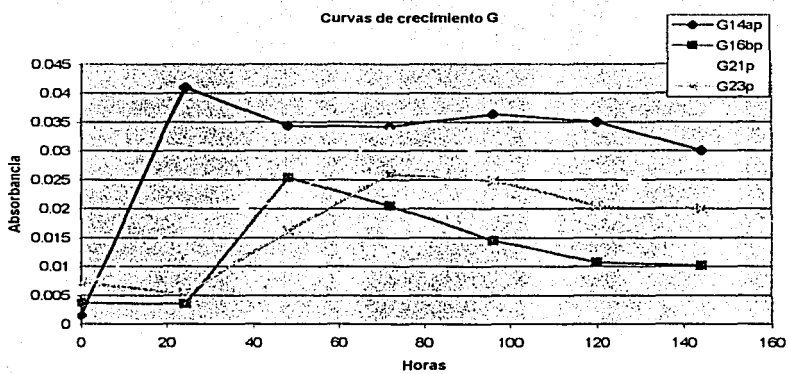


Tabla 12. Perfil enzimático de los subconsorcios obtenido con las galerías API ZYM

CEPA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
K12a	0	5	4	3	0	5	0	0	0	0	4	3	0	3	0	4	0	0	0	0
K12b	0	5	4	3	0	5	0	0	0	0	4	3	0	3	0	4	0	0	0	0
K12c	0	5	4	4	0	4	0	0	0	0	5	3	3	4	0	5	0	0	0	0
K13aa	0	5	3	3	0	3	0	0	0	0	3	3	3	3	0	3	0	0	0	0
K13ab	0	5	4	4	0	4	0	0	0	0	5	3	3	4	0	5	0	0	0	0
K13ba	0	5	4	4	0	4	0	0	0	0	5	3	3	4	0	5	0	0	0	0
K13ca	0	5	4	4	0	4	0	0	0	0	5	3	3	4	0	5	0	0	0	0
K13cb	0	5	4	4	0	4	0	0	0	0	5	3	3	4	0	5	0	0	0	0
K14aa	0	5	4	3	0	5	0	0	0	0	4	3	0	3	0	4	0	0	0	0
K14ab	0	5	3	3	0	3	0	0	0	0	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
K14ac	0	5	4	4	0	4	0	0	0	0	5	3	3	4	0	5	0	0	0	0
K14bb	0	5	4	3	0	4	0	0	0	0	4	3	0	3	4	0	0	0	0	0
K14bc	0	5	4	3	0	4	0	0	0	0	4	3	0	3	4	0	0	0	0	0
K24c	0	5	4	4	3	5	3	3	0	0	5	5	3	5	0	5	3	5	0	0
G11bb	0	5	4	5	0	3	0	0	0	0	3	3	4	3	0	4	4	0	0	0
G13ab	0	4	4	4	0	0	0	0	0	0	0	3	4	1	0	4	5	0	0	0
G15aa	0	5	4	4	0	0	0	0	0	0	5	5	3	3	0	5	4	0	0	0
G15ab	0	5	3	3	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0	0	3	0	0	0	0
G16aa	0	3	4	5	0	4	0	3	0	0	4	0	0	5	0	5	0	0	0	0
G16ab	0	5	3	3	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0	0	3	3	0	0	0
G16bb	0	5	4	5	0	3	0	0	0	0	3	3	4	3	0	4	4	0	0	0

*Se reporta en una escala de 0 a 5, de 3 a 5 se considera positivo.

- | | | | |
|----|--------------------------------|----|-----------------------------------|
| 1 | Control | 14 | β -galactosidasa |
| 2 | Fosfatasa alcalina | 15 | β -glucuronidasa |
| 3 | Esterasa | 16 | α -glucosidasa |
| 4 | Esterasa lipasa | 17 | β -glucosidasa |
| 5 | Lipasa | 18 | n-acetil- β glucosaminidasa |
| 6 | Leucina arilamidasa | 19 | α -manosidasa |
| 7 | Valina arilamidasa | 20 | α -fucosidasa |
| 8 | Cistina arilamidasa | | |
| 9 | Tripsina | | |
| 10 | α - quimotripsina | | |
| 11 | Fosfatasa ácida | | |
| 12 | Naftol- AS- BI- fosfohidrolasa | | |
| 13 | α -galactosidasa | | |

Perfil enzimático de los subconsorcios

Los inhibidores de hidratación de arcillas al estar en contacto con los microorganismos se enfrentan a las enzimas que éstos producen, esto en el caso de las enzimas inducibles.

Cuando las enzimas son constitutivas como en este estudio solo se puede inferir parte de su metabolismo (Bascomb, 1980).

Los resultados del perfil enzimático se muestran en la tabla 12. En esta se observa que el mayor contraste se presenta entre los subconsorcios K24c y G15ab, en el primero se detectó la presencia de 14 enzimas, en tanto que en el segundo solo 6 de las 19 estudiadas.

Todos los subconsorcios poseen fosfatasa alcalina, esterasa y esterasa lipasa, ninguno posee proteasas (tripsina y quimotripsina) y α -fucosidasa.

K24c es el único subconsorcio que posee lipasa, valina arilamidasa y n-acetil- β -glucosaminidasa.

La enzima cistina arilamidasa únicamente la poseen los subconsorcios K24c y G16aa. La enzima 6 o leucina arilamidasa la poseen todos los subconsorcios excepto G13ab, G15aa, G15ab y G16ab.

Todos los subconsorcios poseen la fosfatasa ácida excepto G13ab y la enzima 12 o Nafol-AS-BI-fosfohidrolasa que no se encuentra en el perfil del subconsorcio G16aa.

La α -Galactosidasa no la poseen K12a, K12b, K14aa, K14bb, K14bc, G15ab, G16aa y G16ab y la β -Galactosidasa está ausente en los subconsorcios G15ab y G16ab por lo que estos subconsorcios son incapaces de utilizar los oligosacáridos de galactosa.

β -glucuronidasa es una enzima que utilizan los subconsorcios K14ab, K14bb y K14bc para la hidrólisis del glucurónido. La α -glucosidasa no la poseen, K14ab, K14bb y K14bc, la β -glucosidasa si se encontró para los subconsorcios K24c, G11bb, G13ab, G15aa, G16ab y G16bb.

Al comparar los resultados obtenidos en el presente estudio con los obtenidos por Ambriz (2001), se encontró que los subconsorcios provenientes de recortes de perforación con los Inhibidores de Hidratación de Arcillas K y G coinciden en el perfil de actividad enzimática con el perfil que poseen los inóculos obtenidos de plantas de tratamiento de aguas residuales.

Los resultados que difieren son de las muestras provenientes de suelo de jardín donde el subconsorcio del presente estudio (K24c) posee un perfil de actividad enzimática de 14 enzimas y en el caso del estudio de Ambriz,

únicamente poseen 6 enzimas. Esto puede deberse a los cambios ocurridos en la población microbiana al llevar a cabo el aislamiento.

6) CONCLUSIONES

En este estudio se logró:

- o El enriquecimiento de cuatro consorcios biodegradadores de inhibidores de hidratación de arcillas.
- o El aislamiento de 12 cepas y 21 subconsorcios.
- o La identificación de 4 de las cepas aisladas.
- o La verificación indirecta de la conservación de la actividad biodegradadora de las cepas aisladas.
- o La confirmación de que el inhibidor de hidratación de arcillas que contiene grupos amino (K) es más fácil de biodegradar que el poliglicol (G).

7) RECOMENDACIONES

- o Establecer las condiciones óptimas para que las cepas o subconsorcios lleven a cabo la biodegradación en un tiempo menor al obtenido.
- o Comparar la actividad biodegradadora de IHA de cepas puras con la producida por la mezcla de ellas.
- o Probar la actividad biodegradadora de las cepas y subconsorcios frente a otros xenobióticos.
- o Llevar a cabo la identificación de las cepas puras obtenidas en este estudio utilizando técnicas más específicas, la obtención de un perfil de ácidos grasos o PCR.

8) BIBLIOGRAFÍA

- o Adriaens P., Kohler H.P. (1989) Bacterial dehalogenation of chlorobenzoates and coculture biodegradation of 4,4'-dichlorobiphenyl. Applied and Environmental Microbiology. Vol.55 p. 887-892.
- o Alvarez J.P., Vogel M.T. (1991) Substrate interactions of Benzene, Toluene and p-Xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 57 p. 2981-2985.
- o Ambríz R., Estudio y aplicación de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida OECD-301 A. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química UNAM 1998.
- o Ambríz R.K.T., Estudio fisicoquímico y microbiológico de la biodegradabilidad aerobia rápida de Inhibidores de Hidratación de Arcillas empleados en la formulación de fluidos de perforación. Tesis de Maestría. Facultad de Química UNAM. 2001.
- o Atlas M.R., Handbook of Microbiological Media, Second Edition, CRC.USA 1997.
- o Bartha R., Isolation of microorganisms that metabolize xenobiotic compounds. In: Isolation of microorganisms from nature. David P. Labeda. Mc Graw Hill. USA 1990. p. 283-307.
- o Bascomb S. Identification of bacteria by measurements of enzyme activities and its relevance to the clinical diagnostic laboratory. In: Microbial Classification and Identification. Edited by M. Goodfellow and R.G. Board. Academic Press. Great Britain 1980. The society for applied bacteriology symposium series. No. 8. p. 359-373.
- o Bland R.G., (1994) Quality criteria in selecting glycols as alternatives to oil based drilling fluid systems. Society of Petroleum Engineers 27141. p. 399-411. USA.
- o Burke C.J., Veil J.A. (1995) Potential environmental benefits of regulatory consideration of synthetic drilling muds. United States Department of Energy.
- o Caldwell E.D., Wolfaardt G., Korber R., Lawrence J. Cultivation of Microbial Consortia and communities. In: Manual of environmental Microbiology. Editor Christon J. Hurst. ASM Press. USA 1997. p. 79-90.
- o Campbell R. Ecología Microbiana, Editorial LIMUSA, México 2001. p.109-111.
- o Cedillo C.L.I. Informe de comité tutorial de Maestría. Facultad de Química UNAM. 2001.
- o Claus D., Fritze D. Taxonomy of *Bacillus*. In: Biotechnology Handbooks. Ed. Harwood C.R. Plenum Press UK 1989. p. 11-19.
- o Dibble J.T., Bartha R. (1979) Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 37 No. 4 p. 729-739.
- o Dott W., Microbiological and hygienical evaluation of the risk potential of aerobic and facultatively anaerobic heterotrophic bacteria in biological soil clean up processes. In: Laboratory methods for the evaluation of biological soil clean up processes. DECHEMA Working Group Environmental Biotechnology-Soil. Edit. J.Klein. Germany 1992. p. 5-40.

- o Goldstein R.M., Mallory L.M., Alexander M.(1985) Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 50 No. 4 p. 977-983.
- o Gordon R.E. The genus *Bacillus*. In: handbook of Microbiology. Volume 1 Bacteria. 2nd Edition. Editors A.I.Laskin and H.A. Lechevalier. CRC Press. USA 1977. p. 319-336.
- o Hernández B.S., Higson F.K. (1991) Metabolism and inhibition by chlorobenzoates in *Pseudomonas putida* PIII. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 57 No. 11 p. 3361-3366.
- o Koneman W.E., Allen D.S., Diagnóstico Microbiológico, Editorial Médica Panamericana. México 1997. p. 453-478.
- o Kozdrój J., Van Elsas Jan Dirk, (2001) Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. Journal of Microbiological Methods. V. 43. p. 197-212.
- o Kuhnig K.T., Borst E.M. (1995) *Bacillus oleronius* sp. Nov., a member of the hindgut flora of the termite *Reticulitermes santonensis* (Feytaud). Canadian Journal of Microbiology. Vol. 41 p. 699-706.
- o Li G., Huang W., Lerner D.N., Zhang X. (2000) Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing. Microbial Ecology. Vol. 32 p. 69-75.
- o Logan N. and Berkeley W. (1984) Identification of *Bacillus* strains using the API system. Journal of General Microbiology 130:1871-1882.
- o Mac Faddín F.J., Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Médica Panamericana, México 1993.
- o Margesin R., Schinner F.(1997) Efficiency of indigenous and Inoculated Cold-adapted Soil microorganisms for Biodegradation of diesel oil in Alpine soils. Applied and Environmental Microbiology. Vol.63 No. 7 p. 2660-2664.
- o Marini Z., Velasco V. (2000) Restauración de agroecosistemas tropicales afectados por hidrocarburos. Agrícola Genética.
- o Paul E.A., Clark F.E. Soil Microbiology and Biochemistry, Second Edition, Academic Press, USA 1996. p. 275-280.
- o Price N.C., Stevens L. Fundamentals of Enzymology. 2nd Edition. Oxford Science Publications USA 1989.
- o Priest G.F. Isolation and identification of aerobic Endospore- forming bacteria. In: Biotechnology Handbooks. Ed. Harwood C.R. Plenum Press. UK 1989 p. 27-56.
- o Ramírez Gama R.M., Luna M.B., Mejía C.A., Velásquez M.O., Tsuzuki R.G., Vierna G.L., Hernández G.L., Müggenburg I., Manual de Prácticas de Microbiología General, Facultad de Química, UNAM 2001.
- o Rodríguez del Alamo L.(2001) Hydrocarbon contaminated soil bioremediation. Tesis. Saint Louis University. En Internet: www.geocities.com/luis-nuria/bioremediacion.htm
- o Ruiz A. Obtención de un consorcio microbiano degradador de un Inhibidor de Hidratación de Arcillas de fluidos de perforación. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. 2001.
- o Shapiro A.J. (1998) Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. Annu. Reviews Microbiology. 52: 81-104.

- o Skladany J.G., Meeting B.F., Bioremediation of contaminated soil. In: Soil Microbial Ecology. Edited by Blaine Metting Jr. Marcel Dekker Inc. USA 1993. p. 483-513.
- o Sneath H.A.P., Endospore forming Gram Positive Rods and cocci. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2 Edited by Sneath, Williams and Wilkins USA 1986 p. 1104-1139.
- o Soran Talabani, Hatzignatiou D.G., Chukwu G.A. (1993) Comprehensive description and evaluation of polymers as drilling fluids. Society of Petroleum Engineers 26701. p. 417-425.
- o Steffensen S.W., Alexander M. (1995). Role of competition of inorganic nutrients in the biodegradation of mixtures of substrates. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 61 No. 8 p. 2859-2862.
- o Van Hamme J.D., Odomeru J.A. (2000) Community dynamics of a mixed-bacterial culture growing on petroleum hydrocarbons in batch culture. Canadian Journal of Microbiology. Vol. 46 p. 441-450.
- o Wolf J. and Barker A.N. The genus Bacillus: aids to the identification of its species. In: Identification methods for microbiologists. Edited by: Gibbs B.M. and Shapton D.A. Academic Press USA 1968. p. 93-109.
- o Yakimov M.M., Mohammed M.A., Bock M., Boseker K., Fredrickson H., Kessel D., Timmis K. (1997) The potential of *Bacillus licheniformis* strains for *in situ* enhanced oil recovery. Journal of Petroleum Science and Engineering 18:147-160.
- o Yuste L., Corbella M.E. (2000) Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing. Microbiology Ecology. Vol. 32 p. 69-75.
- o Zamudio R., Cedeño J.A. (1998) Biorremediación de recortes de pozos petroleros. Boletín Ambiental, UNINET Centro de Calidad Ambiental. Vol. 3 Ej. 8. Sep 30.

MEDIOS DE CULTIVO**1.- Medio 301 A Líquido** (Ambriz, 1998)*Soluciones:*

A→

Fosfato monobásico de Potasio	8.5 g
Fosfato dibásico de potasio	21.75 g
Fosfato dibásico de sodio dihidratado	33.4 g
Cloruro de amonio	0.5 g
Extracto de levadura	0.05 g *
Agua destilada	1000 mL

B→

Sulfato de Magnesio heptahidratado	22.5 g
Agua destilada	1000 mL

C→

Cloruro de calcio anhidro	27.5 g
Cloruro de calcio dihidratado	36.4 g
Agua destilada	1000 mL

D→

Cloruro de hierro III hexahidratado	0.25 g
Agua destilada	1000 mL
(1 gota de HCl concentrado o 0.4 g de EDTA por 1000 mL)	

Preparación:

En un matraz de un litro colocar 500 mL de agua destilada y adicionar 10 mL de solución A, 1 mL de solución B, 1 mL de solución C y 1 mL de solución D, llevar al aforo. Ajustar el pH a 7.4 con soluciones de NaOH y ácido sulfúrico al 5%.

* El extracto de levadura se agrega después de realizar la mezcla de soluciones y antes de ajustar el pH.

2.- Medio 301 A sólido

La composición es idéntica al medio líquido solo que deben añadirse 15g de agar-agar por litro de medio.

3.- Agar Sabouraud (Atlas M.R., 1997)

Fórmula para 1000 mL de agua destilada:

Agar	15 g
Dextrosa	40.0 g
Peptona de carne	5.0 g
Peptona de caseína	5.0 g

Se agregan 65 g/ L de agua y el pH final es de 5.6.

4.- Medio con glucosa, nitrógeno y sales. (Wolf y Barker, 1968)

Fórmula para 1000 mL:

Glucosa	10 g
K ₂ HPO ₄	0.1 g
KH ₂ PO ₄	0.4 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.2 g
CaCl ₂	0.02 g
NaMoO ₄ . H ₂ O	0.002g
FeCl ₂	0.01g
CaCO ₃	1.0g
Azul de Bromotimol	5 mL (solución alcohólica al 0.5%)
NH ₄ Cl	1.0 g
Agar	14 g

El pH se ajusta a 7.0

5.- Medio de ensayo de óxido fermentación Hugh y Leifson.

Peptona de Caseína	2.0 g
Extracto de levadura	1.0g
Cloruro de sodio	5.0 g
K ₂ HPO ₄	0.2 g
Azul de Bromotimol	0.08 g
Agar	2.5 g
Carbohidrato de prueba	10.0 g
Agua destilada	1000 mL

Se disuelven 11 gramos del medio deshidratado en un litro de agua destilada, se ajusta el pH a 7.1.

Se agregan 100 mL por litro de una solución esterilizada por filtración al 10 % del carbohidrato. Este medio se siembra por picadura y por duplicado, un tubo se sella con parafina y otro no. Se incuba hasta 48 horas.

6.- Medio para prueba de lecitinasa. (Wolf y Barker, 1968)

Fórmula para 1000 mL

Extracto de Levadura	2g
Glucosa	20 g
Agar	20 g

Se ajusta el pH a 7.0, se esteriliza y se agregan 10 mL de una suspensión de una yema de huevo en 100 mL de SSI estéril.

7.- Agar tripticasa soya

Digerido pancreático de caseína	15g
Peptona de soya	5g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	15 g

Agregar 40 gramos de medio deshidratado a un litro de agua destilada, pH final de 7.3

8.-Caldo Nutritivo.

Fórmula para 1000 mL de agua destilada:

Peptona de gelatina	5.0 g
Extracto de carne de res	3.0 g

Se agregan 8g de medio deshidratado. El pH final es de 6.9.

* Este medio se utilizó para el crecimiento a 65°C y 50°C, pH 5.7 y 7% de NaCl.

Tinción de Gram (Ramírez Gama *et al.* 2000)

- 1.- Realizar un frote, dejarlo secar y fijarlo a la flama pasándolo 4 ó 5 veces sobre ella.
- 2.- Cubrir la preparación fija con cristal violeta de Gram y dejarlo actuar durante un minuto, escurrir el exceso de reactivo y lavar.
- 3.- Cubrir con lugol de Gram y dejarlo actuar durante un minuto, escurrir el exceso de reactivo y lavar.
- 4.- Decolorar agregando mezcla de alcohol-acetona a la preparación, mientras se sostienen ligeramente inclinada para que el decolorante resbale lentamente por ella. Tan pronto como las gotas de esta solución ya no arrastren color, lavar con agua para detener la acción del decolorante.
- 5.- Cubrir la preparación con safranina y dejarla actuar por un minuto, escurrir el exceso, lavar con agua y dejar secar al aire.
- 6.- Observar la preparación a inmersión (100x).

Tinción de espora (Ramírez Gama *et al.* 2000)

- 1.- Preparar un frote fijo.
- 2.- Cubrir el frote con papel filtro y verde de malaquita, calentar la preparación hasta que el colorante empiece a vaporizar, continuar el calentamiento durante diez minutos, teniendo cuidado de que no hierva y de mantener la preparación húmeda.
- 3.- Quitar el papel filtro.
- 4.- Escurrir el exceso de colorante y lavar con agua.
- 5.- Teñir con safranina al 0.5% (no la de Gram) y dejarla reaccionar 30 segundos.
- 6.- Lavar la preparación con agua, dejar secar al aire y observar a inmersión (100x).

Prueba de la oxidasa (Mac Faddin, 1993)

- 1.- Disolver 1g. de N-dimetil p-fenilendiamina (Sigma Aldrich) en 100 mL de agua destilada.
- 2.- Guardar en un frasco ámbar para evitar su exposición a la luz.
- 3.- Colocar en una placa de vidrio un trozo de papel filtro, humedecerlo con agua destilada.
- 4.- Agregar con un asa bacteriológica la colonia en estudio.
- 5.- Humedecer con una gota de reactivo y observar el cambio a color morado que significa un resultado positivo.
- 6.- Se recomienda el uso de controles:
E. coli -
P. aeruginosa +

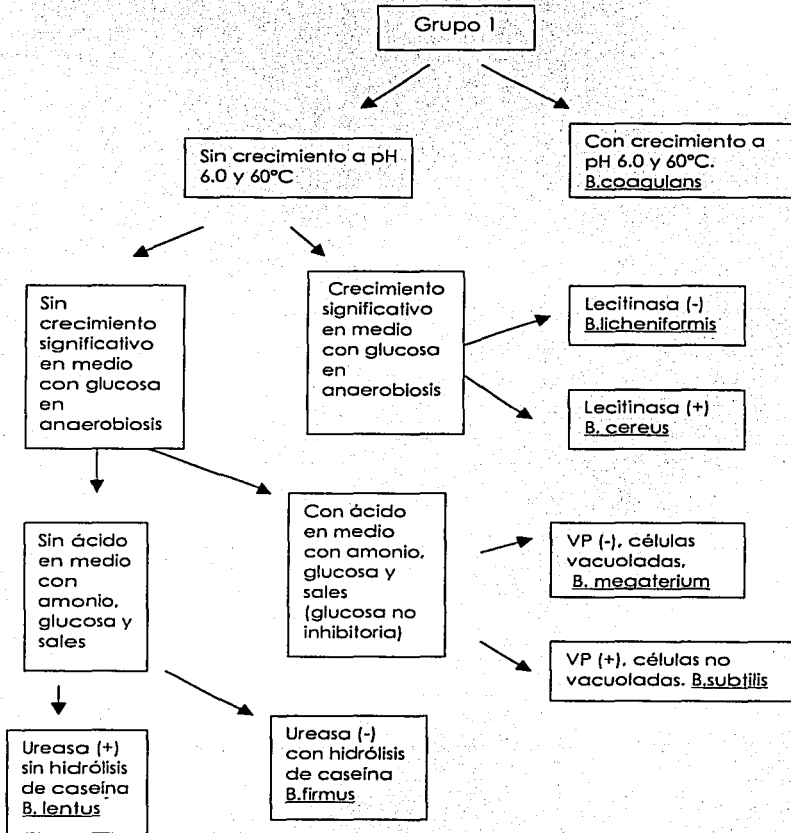
Prueba de la catalasa (Mac Faddin, 1993)

- 1.- Colocar en un portaobjetos el centro de una colonia pura de 18 a 24 horas.
- 2.- Agregar una gota de H₂O₂ al 1% sobre el cultivo utilizando un gotero a una pipeta Pasteur.
- 3.- Observar la inmediata formación de burbujas (liberación de gas).
- 4.- Se recomienda el uso de controles, un positivo y un negativo.

ANEXO 4

Identificación de especies del género *Bacillus* pertenecientes al grupo 1.
(Wolf y Barker, 1968)

Espora oval o cilíndrica. Esporangio no aumentado. Espora con pared delgada. (Los medios de cultivo utilizados se encuentran en el anexo 1)



ANEXO 5

Identificación tentativa de especies de *Bacillus*. (Gordon R. 1977)

Los números a la derecha indican el número (a la izquierda) de la siguiente prueba que deberá ser aplicada hasta que el número a la derecha sea sustituido por el nombre de la especie.

1. Catalasa: positiva →2
negativa →16
2. Voges- Proskauer: positiva→3
negativa →9
3. Crecimiento en agar en anaerobiosis: positiva →4
negativa →8
4. Crecimiento a 50°C: positiva→5
negativa →6
5. Crecimiento en 7% NaCl: positiva..... *B. licheniformis*
negativa..... *B. coagulans*
6. Ácido y gas de glucosa (N inorg.): positiva..... *B. poiomyxa*
negativa→7
7. Crecimiento a pH 5.7: positiva *B. cereus*
negativa *B. alvei*
8. Hidrólisis del almidón: positiva *B. subtilis*
negativa *B. pumilus*
9. Crecimiento a 65°C: positiva *B. stearothermophilus*
negativa→10
10. Hidrólisis del almidón: positiva→11
negativa→14
11. Ácido y gas de glucosa (N inorg.): positiva..... *B. macerans*
negativa→12
12. Utilización del citrato: positiva.... *B. megaterium*
negativa→13
13. pH en medio VP < 6.0: positiva *B. circulans*
negativa..... *B. firmus*
14. Crecimiento en agar en anaerobiosis: positiva..... *B. laterosporus*
negativa →15
15. Ácido y gas de glucosa (N inorg.): positiva..... *B. brevis*
negativa..... *B. sphaericus*
16. Crecimiento a 65°C: positiva *B. stearothermophilus*
negativa→17
17. Descomposición de la caseína: positiva *B. larvae*
negativa→18
18. Cuerpo paraesporal en el esporangio: positiva..... *B. popilliae*
negativa *B. lentimorbus*