



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS AISLADAS A PARTIR  
DE TIERRA CONTAMINADA CON GASÓLEO PRIMARIO DE  
DIESEL EN LA ZONA DE POZA RICA, VERACRUZ.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUIMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:  
ERNESTO VELÁZQUEZ ALVAREZ



MÉXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA

2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

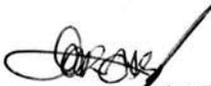
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Jesús Fernando Montiel Aguirre
Vocal	Prof. Eduardo Bonilla Espinosa
Secretario	Prof. Raquel Ortega Muñoz
1er. Suplente	Prof. Norma Angélica Castellanos Chávez
2º. Suplente	Prof. José Ignacio Páramo Ramírez

Facultad de Química.

Asesor	M. en C. Raquel Ortega Muñoz	
Supervisor técnico	Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre	
Sustentante	Ernesto Velázquez Alvarez	

## **AGRADECIMIENTOS.**

A mis Padres Luis Velázquez Solís y Eva Alvarez Almaguer por su ejemplo, apoyo, comprensión y por brindarme la mejor herencia que me pudieron dar.

A mis hermanos Tania y Jonathan por enseñarme el significado de la palabra responsabilidad, por ser mi razón de ser mejor y por confiar en mí en las decisiones que tome.

A la Familia Alvarez Almaguer, por su apoyo y sacrificio, pero principalmente por haber estado presentes cuando más los necesite.

A Raquel Ortega, Fernando Montiel y José Luis Bustos, por sus consejos, apoyo y por toda la ayuda brindada en la realización de este trabajo, sin olvidar la amistad otorgada hacia mí persona.

A María Elena Morales Parra por todo su cariño, confianza, amor, paciencia y por su ayuda para terminar un sueño y el comienzo de otro.

## CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
<b>I INTRODUCCIÓN</b>	3
1.0 Origen del petróleo	3
2.0 Contaminación del petróleo	4
3.0 Importancia de los hidrocarburos	4
3.1 Contaminación por hidrocarburos	7
4.0 Clasificación de petróleos mexicanos	7
5.0 Biorremediación	8
6.0 Ventajas y desventajas de la biorremediación	9
7.0 Factores que afectan la biorremediación	11
8.0 Tratamiento biológico de suelos	12
8.1 Métodos de biorremediación	13
8.2 Biorremediación <i>ex situ</i>	15
8.3 Requerimientos para la biorremediación	18
8.3.1 Humedad	19
8.3.2 Temperatura	19
8.3.3 pH	19
8.3.4 Aereación	20
8.3.5 Tipo y concentración del contaminante	21
8.3.6 Antigüedad de la contaminación	22
8.3.7 Presencia de microorganismos	22
8.3.8 Inoculación	23
8.3.9 Receptor de electrones	23
8.3.10 Bioaugmentación	23
8.3.11 Nutrientes	24
8.3.12 Presencia de metales y sales	25
8.3.13 Biodisponibilidad	25
8.3.14 Proceso metabólico	25
9.0 Perspectiva	27
10.0 Aplicaciones de la biorremediación	28
<b>II ANTECEDENTES</b>	30
<b>III HIPÓTESIS</b>	32
<b>IV OBJETIVOS GENERALES</b>	33
<b>V OBJETIVOS PARTICULARES</b>	34

## CONTENIDO

	Página
<b>VI MATERIALES Y MÉTODOS</b>	35
1.0 Muestreo	35
2.0 Curvas de crecimiento	37
3.0 Sinergismo	38
4.0 Identificación de bacterias degradadoras de diesel	39
4.1 Principio	39
4.2 Técnica	39
4.3 Preparación de la galería	40
4.4 Preparación del inóculo	40
4.5 Inoculación de la galería	40
4.6 Lectura de la galería	40
5.0 Extracción de ADN total	42
6.0 Extracción de ADN plasmídico	46
7.0 Técnica de eliminación del plásmido mediante naranja de acridina	48
8.0 Extracción de proteínas totales	49
9.0 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana	52
<b>VII RESULTADOS</b>	54
1.0 Muestreo	54
2.0 Características macroscópicas y microscópicas	55
3.0 Identificación	57
4.0 Curvas de crecimiento	60
5.0 Extracción de ADN total	66
6.0 Análisis de ADN cortado con enzima de restricción (Bam HI)	68
7.0 Extracción de ADN plasmídico	69
8.0 Eliminación del plásmido	70
9.0 Análisis de ADN después de "curar" a la bacteria del plásmido	70
10.0 Curva de crecimiento de las bacterias después de ser tratadas con naranja de acridina	71
11.0 Extracción de proteínas totales	73
12.0 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana	76
<b>VIII DISCUSIÓN</b>	78
<b>IX CONCLUSIONES</b>	82
<b>X REFERENCIAS</b>	85

**CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS AISLADAS A PARTIR DE TIERRA CONTAMINADA  
CON GASÓLEO PRIMARIO DE DIESEL EN LA ZONA DE POZA RICA, VERACRUZ.**

**RESUMEN.**

La contaminación de suelos, sedimentos marinos y otros medios ambientes por productos químicos tóxicos son un problema originado por la industrialización del mundo actual.

En términos cuantitativos, el petróleo es uno de los contaminantes orgánicos más importante en el medio marino estimándose anualmente que entre 1.7 y 8.8 millones de toneladas de petróleo y derivados acaban en las aguas marinas y de estuarios en el mundo. Por ello surge la necesidad de remediar los sitios dañados por estos productos mediante nuevas técnicas las cuales se enfocan en la destrucción o transformación de productos tóxicos a productos con menor grado de toxicidad. Una de estas técnicas es la biorremediación, que consiste en la utilización de sistemas biológicos, tales como enzimas y bacterias, para producir rupturas o cambios moleculares de tóxicos contaminantes que afectan el medio ambiente (suelo, lagos, ríos, mares, pantanos, etc.), generando compuestos de menor o ningún impacto ambiental. Este método fue probado originalmente en 1989 en un derrame de petróleo que se presentó en el Exxon Valdez en Alaska, lo cual confirmó el éxito de esta técnica para llevarse a operaciones de gran escala.

En nuestro estudio de biorremediación se trabajó una muestra de tierra de gasóleo primario ligero de diesel extraída de un manto petrolero en Poza Rica, Veracruz, la cuál se mezcló en un medio mínimo de nutrientes y como única fuente de carbono, diesel a una concentración de 1.5%.

De esta muestra se aislaron microorganismos en medio selectivos como agar diesel.

Seguido de esto, se determinaron las características microscópicas y macroscópicas, se identificaron a las bacterias mediante el uso de pruebas bioquímicas comerciales (Tiras API 20E).

Posteriormente, se realizaron curvas de crecimiento en medio mineral con diesel como única fuente de carbono y se evaluó la capacidad de crecimiento tanto de las cepas individuales como mezcladas lo cual indicó que el proceso de crecimiento es mucho mayor cuando se encuentran en consorcio. Esto podría sugerir que hay un proceso de simbiosis, donde una cepa utiliza ciertos compuestos que al ser metabolizados van a servir para ser el sustrato de otra cepa y así sucesivamente.

También se determinó cual era la concentración más adecuada de diesel para la bacteria que presento mayor capacidad de crecimiento en estas condiciones.

Se realizó una extracción de proteínas para observar que patrón presentan estas bacterias en posibles condiciones de estrés.

Después se hizo una búsqueda de en donde se encontraban los genes para degradar dichos hidrocarburos: si en el genoma de la bacteria o en plásmidos. Para esto, se "curó" (eliminación del plásmido) a la bacteria para ver si tenía la misma capacidad de respuesta ante el diesel una vez que se le extrajera el plásmido. Esto se realizó mediante el uso de naranja de acridina.

Una vez efectuada la eliminación del plásmido se evaluó una vez más la velocidad de crecimiento de las cepas involucradas.

Por ultimo se evaluó, si la presencia del plásmido confería alguna otra capacidad como puede ser la resistencia a antibióticos. Esto se evaluó mediante el uso de multidiscos combinados.

## I INTRODUCCIÓN:

### **1.0 Origen del petróleo:**

Los combustibles fósiles, como el petróleo o el carbón de mina, reciben este nombre por provenir de estratos geológicos formados hace millones de años. El petróleo comenzó a formarse cuando plantas y animales muertos se hundieron al fondo del mar y fueron cubiertos por sedimentos. A través de largos periodos de tiempo (millones de años), estos restos pasaron por dos etapas de degradación, una biológica y otra abiótica. En la primera etapa, los microorganismos anaeróbicos convirtieron los restos orgánicos en una mezcla compleja llamada kerogéno que contiene principalmente material orgánico compacto como algas y otras plantas primitivas, polen, esporas y larvas de insectos. El kerogéno es insoluble en agua y al calentarlo se descompone en dos fases, una gaseosa y otra líquida parecida al petróleo. Durante la fase abiótica posterior, las altas presiones y el calor cambian los sedimentos a rocas sedimentarias y el kerogéno a petróleo. Esta conversión parece estar catalizada por metales y por las mismas arcillas de los estratos. Gracias a la acumulación de gases (metano principalmente) que funcionan como propulsor, las pozas subterráneas de petróleo se movilizan hacia los poros y fracturas de las rocas y eventualmente afloran de manera espontánea a ras del suelo (Valderrama 2002).

Como consecuencia directa del uso masivo del petróleo como fuente de energía y como materia prima, ha surgido en los últimos 50 años el fenómeno de la contaminación ambiental entre otras muchas cosas. Ello ha ocasionado el deterioro progresivo de la calidad del medio ambiente generando una amenaza a la salud así como la extinción de gran cantidad de especies vegetales y animales (Chaineau *et al.*, 1999).

## **2.0 Contaminación del petróleo**

Uno de los principales problemas de hoy en día es la contaminación del suelo y sus efectos adversos en el medio ambiente. Esta contaminación puede ocurrir por diferentes vías, entre ellas las operaciones industriales, como las emisiones, fugas y derrames accidentales, descargas de efluentes y residuos. Estas operaciones involucran frecuentemente mezclas complejas de compuestos químicos, por ejemplo, el aceite crudo, el aceite refinado, los bifenilos policlorados (BPC) y algunos contaminantes que son combinaciones indefinidas de aceites, pesticidas, compuestos orgánicos e inorgánicos y metales pesados (Rodríguez *et al.*, 1999).

En el medio ambiente estos daños son a corto o largo plazo, dependiendo de diferentes factores como lo son: el tipo de contaminante, su distribución, la concentración y las características hidrogeológicas del suelo. Los daños a corto plazo incluyen el contacto directo, la inhalación de polvo y de gases tóxicos o el riesgo de fuego o explosiones. La migración de los contaminantes a través del agua de lluvia y su subsecuente infiltración en las aguas subterráneas (mantos freáticos), resulta en un peligro a largo plazo por la posible ingestión del agua contaminada (Leahy y Colwell, 1990).

## **3.0 Importancia de los hidrocarburos**

La mayor parte del petróleo se utiliza como combustible en forma de gasolina, diesel, turbosina, etc., y junto con algunas fracciones volátiles (metano, propano y butano) son nuestra principal fuente de energía, tanto industrial como doméstica. Alrededor de 15 % del petróleo es utilizado como sustrato para la síntesis de otros compuestos, principalmente plásticos, un grupo heterogéneo que incluye polialquenos (como el polietileno, polibutileno, polipropileno), poliestirenos y cloruro de polivinilo (PVC). El resto del petróleo, las fracciones más pesadas y menos valiosas llamados asfaltenos, se utilizan como componentes del pavimento (Valderrama, 2002).

La producción mundial de petróleo crudo es de más de tres mil millones de toneladas por año y cerca de la mitad de este es transportado por el océano.

México es uno de los grandes productores de petróleo y de productos de destilación en el mundo (PEMEX, 1998a); tiene una producción promedio de diesel de 278,000 barriles por día (PEMEX, 1998b), por lo que las actividades de extracción, refinación, transportación, distribución y comercialización han contribuido a provocar un serio daño ambiental. La gasolina y el diesel son la principal fuente de contaminación en suelo y agua (Sedesol 1993-1994).

En México tenemos importantes yacimientos en explotación en las zonas del Golfo de México y en el Istmo de Tehuán-tepec y otros más en reserva. Desde la expropiación en 1936, el petróleo existente bajo el suelo de nuestro país no puede pertenecer a particulares, sino que es administrado por el gobierno federal a través de la compañía paraestatal Petróleos Mexicanos. Las divisas obtenidas por la venta de petróleo crudo y sus derivados es la principal fuente de ingresos para nuestro país. La producción y el consumo de petróleo es de vital importancia en las relaciones internacionales y ha sido frecuentemente un factor decisivo en la determinación de políticas exteriores. La posición de un país en el sistema depende en su capacidad de producción relacionada con su consumo. Para cualquier país, la presencia o ausencia de yacimientos de petróleo dentro de sus fronteras ha sido de considerables consecuencias en su economía, siendo uno de los factores determinantes entre ser un país rico o un país pobre (Valderrama, 2002).

El transporte del petróleo a través del mundo es muy frecuente lo cual ayuda a los países a su mejor desarrollo. Esto tiene sus desventajas ya que debido a los grandes derramamientos de petróleo que se presenta en mar o en tierra, surge la necesidad de buscar una manera o método que ayude la restauración de estos medios ambientes así como buscar un mejor destino para dichos productos.

El petróleo crudo esta constituido de más de cien componentes, los cuales se separan en: Compuestos saturados, compuestos aromáticos, resinas y asfaltenos.

Los compuestos saturados son aquellos que presentan compuestos de peso molecular pequeño los cuales son fácilmente biodegradados especialmente en medio marinos (Overton, *et al.*, 1994).

Los compuestos aromáticos con uno, dos o tres anillos aromáticos son también eficientemente biodegradados, sin embargo aquellos con cuatro o más anillos aromáticos son muy resistentes a la biodegradación.

Las fracciones de resinas y asfaltenos contienen compuestos de alto peso molecular, cuyas estructuras químicas aun no han sido resueltas, por lo que su biodegradabilidad aun no es conocida (Harayama *et al.*, 1999)

A medida que un crudo envejece, su composición cambia de manera que los alcanos y compuestos aromáticos ligeros se disuelven o evaporan rápidamente y son metabolizados por los microorganismos, mientras, los componentes mas pesados que son a su vez menos volátiles y biodegradables, tienden a permanecer. Por lo tanto, no es posible que un crudo sea completamente biodegradado y afirmar que cualquier crudo ligero o mas de un 50 % de un crudo pesado pueda ser biodegradado en días o semanas es muy cuestionable (Cooney *et al.*, 1990). La biodegradación de hidrocarburos de petróleo es un proceso complejo que depende de la naturaleza y acumulación de petróleo o hidrocarburos presentes (Barathi *et al.*, 2001).

Debido a este problema ha surgido la necesidad de implementar o desarrollar diversas técnicas o tratamientos físicos, químicos y biológicos que ayuden a eliminar o reducir la cantidad de contaminantes en el medio ambiente.

### 3.1 Contaminación por hidrocarburos.

Tratamiento de derrames del petróleo y sus derivados;

Los métodos mas utilizados para suelos contaminados son el lavado de suelos y la excavación, así como la transferencia de agua o del suelo a recipientes para su almacenamiento o incineración.

Estos tratamientos consisten básicamente en transportar el contaminante de un lugar a otro, por lo que resulta excesivamente costosos y/o ineficaces para el tratamiento de mezclas complejas. Un ejemplo de ello se muestra en la **Tabla 1**.

COMPARACION DE COSTOS ENTRE TRATAMIENTOS *	
METODO	COSTOS ( DOLARES)
Incineración	530
Solidificación	115
Rehabilitación de suelos	670
Desorción térmica	200
Biorremediación	175

**Tabla 1**

\*Costo anual por tratamiento de una yarda cúbica (Rodríguez *et al.*, 1999). Como puede verse, uno de los procesos más efectivos y costeables para la restauración de los suelos contaminados es la biorremediación

### 4.0 Clasificación de petróleos mexicanos.

En México existen importantes campos petroleros que producen aceites crudos ligeros o condensados que constituyen cerca de 14% de la producción nacional y que juegan un papel importante para la industria petrolera nacional, ya que se utilizan en la formulación para aligerar los crudos pesados, dándoles un mayor precio comercial. Dichos condensados son materia prima casi directa para la obtención de la gasolina (<http://pemex.com/> y <http://www.imp.mx>).

Estudios geológicos y geoquímicos anteriores permiten diferenciar los 43 aceites estudiados en tres grupos:

1.-Los aceites de Chiapas-Tabasco que se relacionan con materia orgánica precursora de tipo algáceo, se encuentran con bajos contenidos de azufre (35-38 ° API. % S 0.8-0.95)

2.-Los aceites de la sonda de Campeche que se relacionan con materia orgánica precursora de tipo algáceo y altamente hidrogenada, del tipo lábil, encontrándose menos maduros que los anteriores y presentando mayores contenidos de azufre (20-24 API, % S>1).

3.-Los aceites de Veracruz que se relacionan con materia orgánica mixta celulósica ligno-celulósica-sapropelica-algácea, estos aceites son los mas maduros y contienen menores cantidades de azufre (>45° API y % S<0.3) (Guzmán *et al.*, 2001).

El diagrama propuesto por Thompson permite clasificar los aceites crudos y condensados de acuerdo al tipo de alteración: fraccionamiento evaporativo, madurez, lavado por agua y biodegradación.

Conforme a la metodología de Thompson, los aceites crudos de Veracruz claramente se distinguen del resto y forman un grupo de aceites maduros (Guzmán *et al.*, 2001).

Gasóleo: última fracción que se destila en la torre primaria de una refinería petrolera, que tiene un intervalo de ebullición de 250 a 310°C y contiene de 15 a 18 átomos de carbono, de aquí se obtiene el combustible llamado diesel.

### **5.0 Biorremediación.**

La biorremediación consiste en la utilización de sistemas biológicos, tales como enzimas y bacterias para producir rupturas o cambios moleculares de tóxicos contaminantes generando compuestos de menor o ningún impacto ambiental en ecosistemas de importancia ambiental (suelo, lagos, ríos, mares, pantanos, etc.), (Balba *et al.*, 1998).

Esta técnica ayuda a combatir daños al medio ambiente y provee de una alternativa con mayor costo-beneficio que los tradicionales procesos físicos y químicos que se utilizan para la limpieza de zona contaminadas (**Tabla 1**).

El costo de la biorremediación es menor que mayoría de las otras técnicas (**Tabla 1**), las cuales dependen de las características del sitio a tratar.

### **6.0 Ventajas y desventaja de la biorremediación.**

Para que la biorremediación sea exitosa, los métodos de biorremediación dependen de tener los microorganismos adecuados en el lugar adecuado y de factores ambientales apropiados para que ocurra la degradación.

La biorremediación ofrece diversas ventajas sobre técnicas convencionales como el llenado en tierra o incineración. La biorremediación puede ser hecha sobre el sitio y es a menudo menos caro y el sitio afectado sufre menos daño (Mckee *et al.*, 1972)

La biorremediación también tiene sus limitantes; algunos químicos no son fácilmente biodegradados como lo son: los metales pesados, radionuclidos, y componentes clorinados (Boopathy, 2000).

La principal ventaja del método de biorremediación está asociada a que las transformaciones son generalmente llevadas a cabo por los microorganismos que habitan en el sitio de contaminación (proceso natural).

Los residuos o subproductos del proceso biológico (bióxido de carbono, agua y otros componentes) son usualmente integrados geoquímicamente en el ambiente como productos inocuos. Las bacterias y los hongos tienen una gran habilidad para metabolizar (transformar) diferentes compuestos químicos. Cuando es posible, se utiliza y se aumenta la producción microbiana presente en el sitio contaminado con el fin de acelerar su actividad para transformar los componentes tóxicos, mediante la adición de nutrientes o

por la introducción de otros microorganismos al sistema a tratar. El tratamiento en el sitio de contaminación de los suelos, lodos y mantos freáticos es más barato y menos destructivo que otras opciones frecuentemente utilizadas para su tratamiento, tales como la excavación seguida de la incineración o el tratamiento de suelos (Boopathy, 2000).

La logística y los equipos requeridos en la tecnología de biorremediación a menudo suelen ser muy sencillos, lo cual a su vez implica no solo trabajos menos intensivos sino además costos inferiores.

Aunque la biorremediación hace que la descontaminación del medio tenga lugar a mayor velocidad que los procesos de biodegradabilidad naturales, no se trata de una tecnología que produzca efectos a corto plazo, por lo que su aplicación probablemente no sea apropiada como una medida de tratamiento inicial cuando el medio tiene presente elevadas cantidades de hidrocarburos (Skladany *et al.*, 1998)

Otro inconveniente de las tecnologías de biorremediación, consiste en que no se tratan de procesos de aplicabilidad generalizada bajo condiciones estándar a cualquier medio, sino que cada localización requiere de un estudio para determinar las variables operacionales de esta tecnología (Rodríguez *et al.*, 1999).

El crecimiento de microorganismos en hidrocarburos presenta un problema particular debido a que los hidrocarburos son inmiscibles en agua. Muchas bacterias son capaces de emulsificar hidrocarburos en solución por la producción de un agente activo surfactante como biosurfactante (Koch *et al.*, 1991; Neu, 1996) lo cual incrementa la adhesión de células al sustrato (Baldi *et al.*, 1999). Los biosurfactantes reducen la tensión superficial por la acumulación en la interfase de fluidos inmiscibles, incrementando el área superficial de componentes insolubles los cuales permiten incrementar la biodisponibilidad y subsecuentemente la biodegradación de los hidrocarburos (Leahy y Colwell, 1990).

Las condiciones aeróbicas y los microorganismos apropiados son necesarios para un rango óptimo de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo. En suelos, la actividad microbiana depende del oxígeno contenido en el. Un bajo nivel de oxígeno en suelo ha demostrado un límite en la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos de petróleo. (Von Wedel *et al.*, 1988).

La realización de técnicas en biorremediación de suelos a escala requiere de un monitoreo así como controlar varias variables como lo son: tipo de microorganismo, fuente de energía, humedad, pH, nutrientes, temperatura y ausencia de toxicidad así como ausencia de microorganismos que compitan por las fuentes de energía (Boopathy, 2000).

### **7. 0 Factores que afectan la biorremediación.**

#### **Microbianos.**

Generación de una biomasa crítica

Mutación y transferencia de genes horizontales.

Inducción enzimática.

Enriquecimiento de poblaciones microbianas capacitadas.

Producción de metabolitos tóxicos.

#### **Medio ambiente.**

Agotamiento de sustratos preferenciales.

Falta de nutrientes.

Condiciones inhibitorias del medio ambiente.

#### **Sustratos.**

Mínima concentración de contaminantes.

Estructura química de los contaminantes.

Toxicidad de los contaminantes.

Solubilidad de los contaminantes.

**Biología aeróbica vs. Procesos anaeróbicos.**

Potencial óxido/reducción.

Habilidad para aceptar electrones.

Población microbiana presente en el sitio.

**Crecimiento de sustrato vs. co-metabolismo.**

Tipo de contaminantes

Concentración.

Presencia de una fuente de carbono alternativa.

Interacción microbiana.

**Biodisponibilidad físico-química de:**

Incorporación de materia húmica

**Limitaciones de transferencia de masa.**

Difusión y solubilidad de oxígeno.

Difusión de nutrientes.

Solubilidad/miscibilidad en/con agua

**8.0 Tratamiento biológico de suelos.**

El tratamiento biológico de suelos contaminados requiere del uso de microorganismos y/o vegetales para la degradación de los contaminantes orgánicos. La actividad biológica altera la estructura molecular del contaminante y el grado de alteración determina si se ha producido biotransformación o mineralización.

La biotransformación es la descomposición de un compuesto orgánico en otro similar no contaminante o menos tóxico, mientras que la mineralización es la descomposición a dióxido de carbono y agua (Ercoli E., 2000).

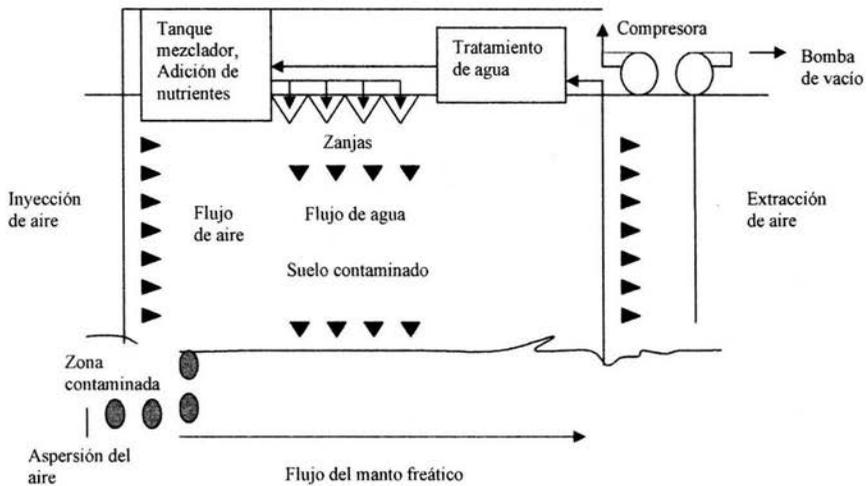
### **8. 1 Métodos de biorremediación.**

La tecnología de biorremediación puede ser clasificada en métodos *in situ* y *ex situ*. La tecnología *ex situ* comprende aquellos tratamientos, los cuales involucran remoción física de material contaminado por un proceso de tratamiento. En contraste, las técnicas *in situ* involucran tratamiento del material contaminado sobre el lugar. Algunos ejemplos de biorremediación *in situ* y *ex situ* se dan a continuación (Boopathy, 2000).

- 1.-Tierra de cultivo: Sistema de tratamiento en fase sólida para suelos contaminados. Puede ser hecha *in situ* y *ex situ*.
- 2.-Composta: Proceso de tratamiento termofílico aeróbico, en el cual el material contaminado es mezclado con agentes como agua u estiércol. Pueden ser usadas pilas estáticas o pilas aereadas.
- 3.-Biorreactores: Biodegradación en un contenedor o reactor puede ser usado para tratamiento de líquidos o granel.
- 4.-Bioventeo: Método para tratamiento de suelo contaminado mediante oxígeno a través de un suelo para estimular la actividad microbiana.
- 5.-Biofiltros: Uso de microorganismos colocados en columna para tratar emisiones de aire.
- 6.-Bioaugmentación: Adición de cultivos bacterianos a medios contaminados, frecuentemente aplicado a ambos sistemas *in situ* y *ex situ*.
- 7.-Bioestimulación: Estimulación de poblaciones de microorganismos nativos de suelo o agua para proveer de nutrientes necesarios.
- 8.-biorremediación extrínseca: Surtidor o bombeo de biorremediación de contaminantes; sólo es hecho en monitoreos regulares.

9.-Bomba tratamiento: Bombeo de agua subterránea a la superficie, tratamiento y reinyección (Boopathy, 2000)

La biorremediación *in situ* generalmente involucra un proceso de bioestimulación (Figura 1).



**Figura 1.** Biorremediación *in situ*.

La biorremediación *in situ* está caracterizada por una estimulación local de la actividad microbiana.

Existen tres tipos de sistemas que se aplican en la biorremediación *in situ*, en los cuales generalmente se hace circular aire y nutrientes a través de la región contaminada para promover el crecimiento de microorganismos aerobios (requieren oxígeno para su desarrollo) con el fin de degradar los compuestos contaminantes (Rodríguez *et al.*, 1999).

El primero de ellos es el bioventeo, que provee el oxígeno a la zona afectada por medio de bombas de vacío y los nutrientes por medio de inyectoros. Los otros dos sistemas

consisten en tratar las regiones que se encuentran por arriba o por debajo del manto freático (Rodríguez *et al.*, 1999).

En el segundo caso, se distribuye el oxígeno en forma de peróxido de hidrógeno y los nutrientes por medio de un inyector.

En el tercer caso, denominado aspersor de aire, se administra el oxígeno directamente en el manto freático y los nutrientes se distribuyen en el suelo con ayuda de inyectores (Rodríguez *et al.*, 1999).

## **8. 2 Biorremediación ex situ.**

En la biorremediación **ex situ**, los métodos que se emplean son los bioreactores, unidades de tratamiento de suelos, pilas de composteo y las biopilas.

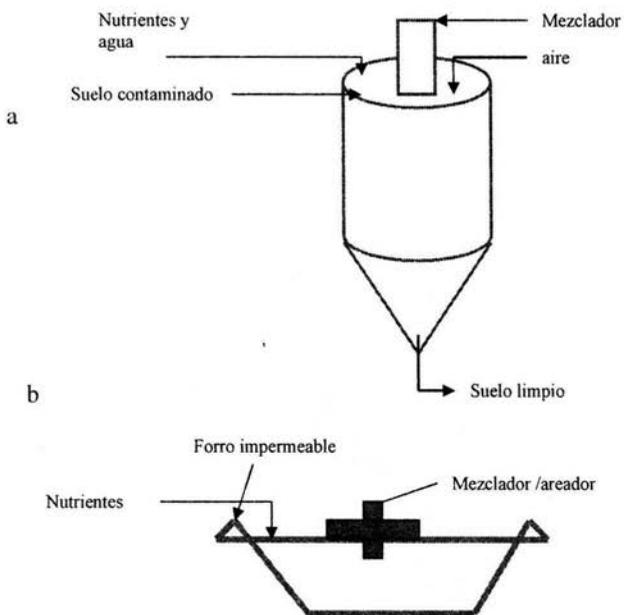
Los sistemas de bioreactores son principalmente usados para residuos líquidos (**Figura 2a**).

La desventaja de estos sistemas es su costo, que generalmente es elevado e involucra altas inversiones de capital, gastos de operación y de mantenimiento.

Las unidades de tratamiento de suelo (**Figura 3a**) consisten en mezclar el suelo con agua y nutrientes, y la posible adición de microorganismos. Estos tratamientos son económicos, pero requieren grandes áreas de terreno por períodos largos de tiempo.

En las pilas de composteo (**Figura 3b**) se adiciona algún material lignocelulósico como: bagazo, paja, viruta, pastos, etc., con el fin de aumentar la porosidad de la pila y favorecer la transferencia de oxígeno (Rodríguez *et al.*, 1999).

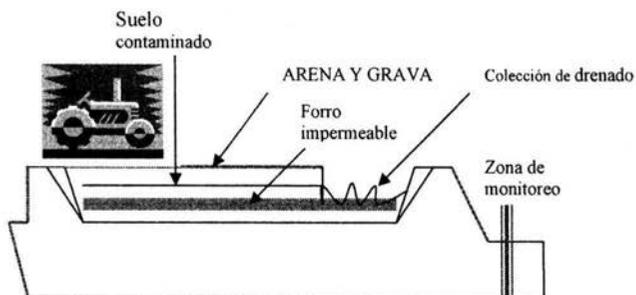
El composteo puede ser aerobio o anaerobio; estos últimos se utilizan generalmente para residuos volátiles altamente peligrosos. Las biopilas se forman por montículos de suelo que en su interior contienen ductos por los cuales se provee el aire y el agua (Rodríguez *et al.*, 1999).



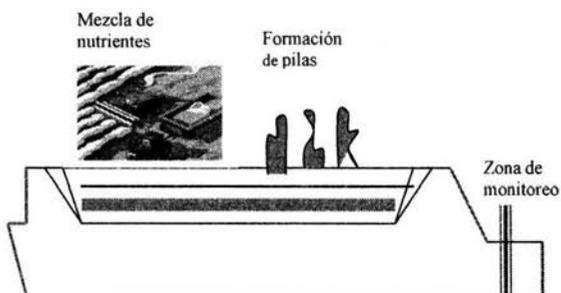
**Figura 2.** Tratamiento *ex situ*. **a** Bioreactor: **b**. Laguna

La velocidad de degradación se favorece con el empleo de biorreactores con los tratamientos en el campo, porque se pueden controlar las condiciones de operación del sistema.

a



b

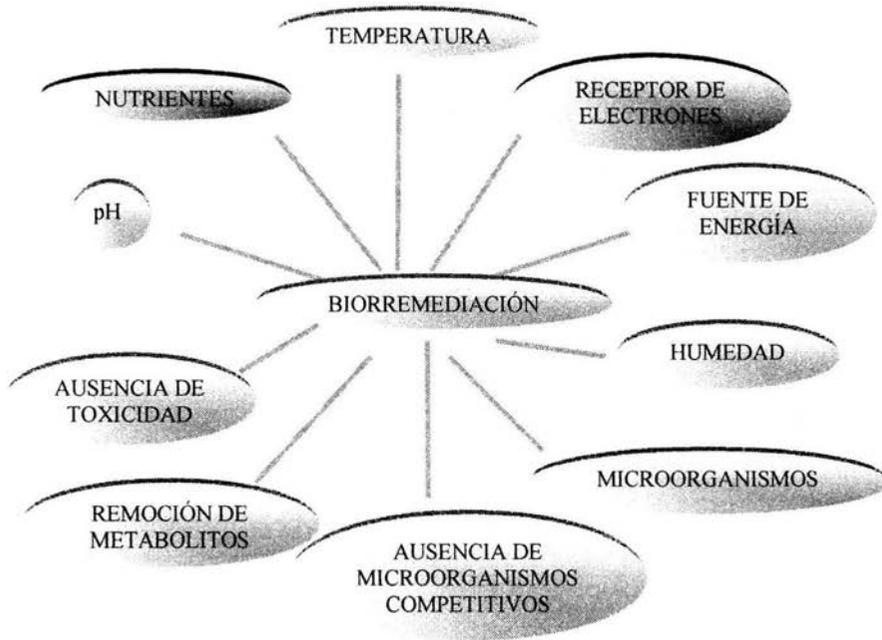


**Figura 3.** Técnica de biorremediación *ex situ*. **a** Unidades de tratamiento suelo.  
**b** Pilas de composteo.

Estos procesos pueden ser usados para degradar residuos sólidos, semisólidos y líquidos. Su aplicación depende de la velocidad de carga del residuo y de los métodos disponibles.

### 8. 3 Requerimientos para la biorremediación

Los requerimientos para la biorremediación son presentados a continuación (**Figura 4**).



**Figura 4.** Requerimientos para llevar a cabo la biorremediación. La fuente de energía y los receptores de electrones son incorporados por cada microorganismo a través de las reacciones de óxido-reducción

Por otro lado, el tipo de receptor de electrones establece el metabolismo y por lo tanto las reacciones específicas de degradación. Los receptores de electrones más importantes son: oxígeno, nitratos ( $\text{NO}_3$ ), sulfatos ( $\text{SO}_4$ ), bióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y algunos compuestos orgánicos.

### **8. 3. 1 Humedad.**

El agua es importante para el desarrollo de los microorganismos ya que actúa como medio de transporte de nutrientes y oxígeno a la célula. Un exceso de humedad produce inhibición del proceso por anaerobiosis y un déficit impide el desarrollo de los microorganismos (Ercoli *et al.*, 2000).

### **8. 3. 2 Temperatura.**

La temperatura influye en la velocidad de degradación marcadamente. Dependiendo del tipo de microorganismo disponible, las temperaturas más adecuadas se encuentran entre 20 y 40°C (microorganismos mesófilos). La temperatura tiene una marcada influencia sobre la velocidad de biorremediación, ya que la velocidad de degradación es una función directa de la temperatura. A bajas temperaturas la velocidad de degradación de los hidrocarburos por los microorganismos desciende (Leahy y Colwell, 1990).

Además de un descenso de la actividad microbiana, las bajas temperaturas disminuyen la volatilidad de las fracciones ligeras del petróleo, que a su vez suelen ser las más tóxicas para la microbiota. Así mismo, un descenso de la temperatura aumenta la viscosidad del crudo, con lo que disminuye la superficie de contacto microorganismo-crudo lo que provoca que el microorganismo pueda entrar en contacto con el hidrocarburo y así desdoblar las cadenas complejas de los hidrocarburos.

Cada microorganismo tiene una temperatura mínima de desarrollo, sin embargo, existen microorganismos que se adaptan a los cambios de temperatura. Los microorganismos que se ha encontrado que son efectivos para los procesos de biorremediación se desarrollan en un intervalo de -10 a 40 °C (Ercoli *et al.*, 2000).

### **8. 3. 3 pH.**

El pH del suelo es una de las medidas más indicativas de las propiedades químicas del suelo. Muchas bacterias crecen mejor a un pH neutro o ligeramente alcalino o ácido, siendo los mas adecuados entre 6 y 8 (Ercoli *et al.*, 2000).

#### **8. 3. 4 Aereación.**

La aeración es un requisito en la mayoría de los casos, porque provee del oxígeno necesario para el desarrollo de microorganismos aerobios. Es un mecanismo de intercambio de gases en las tierras, que evita la escasez de oxígeno y la toxicidad del bióxido de carbono. La eliminación del aire en los poros debido a la saturación de humedad o compactación del suelo, reduce la transferencia de oxígeno y hace que el proceso sea más lento (Rodríguez *et al.*, 1999).

La biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos ha sido observada bajo ambas condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas. La biodegradación anaeróbica es un proceso mucho mas lento que la biodegradación aeróbica y el mecanismo bioquímico no ha sido elucidado aún (Coates y Anderson, 1996 y Coates *et al.*, 1996) En contraste la biodegradación aeróbica, especialmente para hidrocarburos aromáticos policíclicos simples como el naftaleno y el fenantreno, ha sido estudiada extensivamente durante la pasada década.

Estas vías metabólicas inician la biodegradación por la introducción de dos átomos de oxígeno dentro de los núcleos aromáticos catalizando la reacción inicial por una dioxigenasa multicomponente, la cual consiste de una reductasa, una ferredoxina y una proteína hierro-sulfuro (Haramaya *et al.*, 1992)

Otros parámetros a considerar en un tratamiento biológico son: tipo y concentración de contaminante, concentración de microorganismos, concentración de nutrientes, condiciones macroambientales, presencia de inhibidores y biodisponibilidad del contaminante.

### **8. 3. 5 Tipo y concentración del contaminante.**

La biodegradabilidad de un compuesto orgánico se debe a que es utilizado por los microorganismos como fuente de carbono. No todos los compuestos se degradan con la misma facilidad (Niemi *et al.*, 1987).

Por ejemplo, la fuente de nitrógeno proporciona el elemento necesario para la producción de aminoácidos y enzimas. La fuente de fósforo interviene en la formación de compuestos energéticos dentro de la célula que se utilizan en los procesos de reproducción y degradación.

Los compuestos alifáticos de cadena lineal son degradados fácilmente, pero cuando se incluyen como sustituyentes alcanos de cadena larga se forman estructuras ramificadas que son inaccesibles para la degradación. De la misma manera, los compuestos alifáticos insaturados se degradan más lentamente que los saturados.

Los compuestos aromáticos simples se degradan por diferentes aperturas del anillo. La incorporación de halógenos disminuye la degradabilidad por estabilización del anillo.

Si bien la mayor parte de las sustancias orgánicas son degradadas por vía biológica, existe una gran cantidad de compuestos que resisten la biodegradación (se les denomina recalcitrantes) o esta ocurre tan lentamente que se hace ineficaz el tratamiento biológico en forma práctica.

De las diferentes fracciones del petróleo, los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) son los de mayor toxicidad y al mismo tiempo los más recalcitrantes a los métodos convencionales de biorremediación. Son contaminantes ubicuos que se forman naturalmente en el curso de algunas reacciones geológicas y a la fosilización de plantas o bien antropogénicamente en relación a las industrias del petróleo, de la producción de gas y de la preservación de madera. Los HPAs de bajo peso molecular son susceptibles de biorremediación, sin embargo, los de alto peso molecular son recalcitrantes a la degradación biológica (Cerniglia, 1993, Parkm, 1990 y Wilson, 1993).

Los compuestos nitrogenados y azufrados se degradan lentamente; los más resistentes al ataque microbiano son las fibras sintéticas, aunque se están aislando microorganismos capaces de degradar estos compuestos (Niemi *et al.*, 1987; Rochkind *et al.*, 1987; Vogel *et al.*, 1987).

Cuando la concentración de un contaminante es alta puede ocurrir que se produzca inhibición del desarrollo microbiano (disminuya su capacidad de metabolización) o, si es muy alta que intoxique a los microorganismos y que estos mueran (LaGrega *et al.*, 1996).

### **8. 3. 6 Antigüedad de la contaminación.**

A medida que transcurre el tiempo después de un derrame se va modificando la composición del hidrocarburo por acción de los agentes ambientales, ya que primero se pierden los compuestos volátiles y después se produce la eliminación de parafinas ya sea por evaporación, por actividad fotoquímica o actividad biológica. Posteriormente se eliminan otros componentes. Esto provoca que el contaminante se enriquezca en compuestos pesados, mas difíciles de degradar, por lo que la velocidad de reacción disminuye a medida que transcurre el tiempo (Ercoli *et al.*, 2000).

### **8. 3. 7 Presencia de microorganismos.**

Los microorganismos pueden degradar hidrocarburos u otras sustancias contaminantes en forma de cultivos puros (especie única) o cultivos mixtos (varias especies que mantiene una relación simbiótica).

Si es por una relación simbiótica, el tratamiento biológico implica una compleja interacción de especies microbianas. La velocidad de crecimiento y la utilización de sustratos es generalmente superior en cultivos mixtos que en cultivos puros. En una mezcla de poblaciones los consumidores primarios inician el proceso de degradación y los consumidores secundarios utilizan los productos metabólicos de los primeros para degradarlos. Además, puede facilitarse el crecimiento de los consumidores primarios

suministrándoles productos metabólicos, eliminando tóxicos mediante cometabolismo y produciendo intercambio de material genético (Tiedje *et al.*, 1990, Leahy *et al.*, 1989; Roberts *et al.*, 1989).

### **8. 3. 8 Inoculación.**

Es el proceso de incorporar microorganismos al suelo para realizar una función específica, como la degradación de contaminantes. Se usa cuando los microorganismos nativos del suelo no pueden degradar el contaminante presente o cuando se produce inhibición por presencia de sales o metales pesados o cuando no alcanza la masa crítica necesaria. La desventaja es que los microorganismos inoculados pueden desplazar a los existentes en el suelo por competencia y lograr poco efecto degradativo o bien pueden no adaptarse a las condiciones ambientales del lugar (Ercoli *et al.*, 2000).

### **8. 3. 9 Receptor de electrones**

El crecimiento y metabolismo de los microorganismos en ambientes naturales está limitada entre otras cosas por la disponibilidad de componentes para donar electrones, aceptar electrones y otros nutrientes esenciales. En donde el derrame de un hidrocarburo los donadores de electrones no están en forma limitante ya que este funciona como tal, generalmente el compuesto limitante es el aceptor de electrones, que puede ser oxígeno, nitrato, sulfato o hierro III. El uso de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) es comúnmente utilizado en sistemas de biorremediación ya que el oxígeno molecular es ligeramente soluble (8mg/L a 20° C) en el agua lo que limita su uso como aceptor de electrones (Chapelle, 1999; Zaidin, *et al.*, 1999).

### **8. 3. 10 Bioaugmentación.**

Consiste en incrementar considerablemente la masa microbiana del suelo mediante la adición de microorganismos similares a los presentes en el suelo obtenidos mediante medios de cultivos que simulen propiedades similares a las del suelo (Ercoli *et al.*, 2000).

### **8. 3. 11 Nutrientes.**

Son sustancias químicas necesarias para el desarrollo de los microorganismos y se pueden dividir en cuatro grupos: fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo y oligoelementos o elementos minoritarios (micronutrientes). La fuente de carbono en este caso es el contaminante y proporciona el carbono necesario para producir compuestos celulares, productos metabólicos (CO<sub>2</sub>, agua) y microorganismos (debido a la reproducción de los mismos).

La fuente de nitrógeno proporciona el elemento necesario para la producción de aminoácidos, y nucleótidos (Ercoli *et al.*, 2000).

La fuente de fósforo interviene en la formación de compuestos energéticos dentro de la célula que se utilizan en los procesos de reproducción, degradación así como en la síntesis de biomoléculas (ADN, ARN, etc.)

Los oligoelementos constituyen un conjunto variado de elementos como hierro, cobre, zinc, azufre, cobalto, manganeso, magnesio, calcio y otros compuestos que dependen del tipo de microorganismo y del proceso que se realiza. Las concentraciones son muy pequeñas, menor a 1 ppm en total.

El nitrógeno y fósforo son los que en la mayoría de las ocasiones pueden suponer un factor limitante en la biodegradación de hidrocarburos. Son diversos los estudios que han mostrado que una concentración inadecuada de estos nutrientes tiene como consecuencia una ralentización de la biodegradación (Lee y Levy, 1989).

Aunque el petróleo es rico en carbono orgánico, es deficiente en los nutrientes minerales necesarios para el crecimiento microbiano (Atlas, 1988).

Además de los factores limitantes anteriormente mencionados (nitrógeno y fósforo), algunos organismos autóctonos pueden también requerir nutrientes de carácter orgánico conocidos como factores de crecimiento, los cuales suelen ser precursores o

constituyentes del material orgánico celular que el microorganismo no puede sintetizar a partir de otras fuentes de carbono. Aunque los requerimientos y los tipos de factores de crecimiento varían de un organismo a otro los principales pueden agruparse en aminoácidos, purinas, pirimidinas y vitaminas.

### **8. 3. 12 Presencia de metales y sales.**

Los metales y las sales en altas concentraciones intoxican a los microorganismos o actúan como biocidas (metales pesados, sodio en altas concentraciones, sales inorgánicas, etc). Por lo que la presencia de sales y metales disminuye la velocidad de crecimiento a menos de que se cuente con microorganismos tolerantes a dichos compuestos.

### **8. 3. 13 Biodisponibilidad.**

La degradación de un contaminante en el suelo depende además de una serie de factores, tales como la actividad de los microorganismos y la transferencia de masa desde el suelo hasta el microorganismo (Zaidin *et al.*, 1999)

### **8. 3. 14 Proceso metabólico.**

El metabolismo primario de un compuesto orgánico ha sido definido como el uso de sustrato como fuente de carbono y energía. Este sustrato sirve como donador de electrones resultando un crecimiento microbiano. La aplicación de co-metabolismo a sitios de biorremediación de xenobióticos es requerido cuando el componente no puede servir como fuente de carbono y energía por la naturaleza de su estructura molecular, con lo cual no se induce el requerimiento de enzimas catabólicas.

El término co-metabolismo ha sido definido como el metabolismo de un componente que no sirve como fuente de carbono ni energía o como un nutriente esencial y solo puede ser alcanzado en la presencia de un sustrato primario (inducción enzimática).

Los procesos aeróbicos son caracterizados por actividades metabólicas involucrando oxígeno como reactivo. Dioxigenasas y monooxigenasas son dos de las enzimas primarias empleadas en organismos aeróbicos durante la transformación y mineralización de xenobióticos. Los microorganismos anaeróbicos toman ventaja en el rango de aceptores de electrones, lo cual depende de su habilidad y condiciones redox, incluye nitrato, hierro, manganeso, sulfato y bióxido de carbono (Boopathy, 2000).

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

- 1-Confieren una ventaja fenotípica como resistencia a antibióticos, metales, toxinas, etc.
- 2-Puede haber propagación de bacteria a bacteria con alta eficacia
- 3-Permite la herencia vertical a las células hijas.

Hoy en día se conoce que los plásmidos confieren a varias especies bacterianas la capacidad de degradar varios hidrocarburos utilizándolos como fuente de carbono, además de otros compuestos orgánicos e inorgánicos (Bingle y Thomas, 2001; Farrell R., Chackabarty, 1979). En los plásmidos se encuentran los genes que codifican para las enzimas que tienen esta función. Actualmente, los genes que codifican para la dioxigenasa han sido clonados y secuenciados en plásmidos que pertenecen a las familias TOL y NAH (Burlage *et al.*, 1989).

Otros estudios han reportado que existen enzimas que participan en el catabolismo de hidrocarburos y estas se encuentran codificadas en el DNA cromosómico (Hamnn C. *et al.*, 1999).

## **9. 0 Perspectiva.**

Desde el punto de vista biológico tienen importancia aquellos microorganismos expuestos a hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs), debido a que han desarrollado la habilidad para utilizar algunos de ellos. Interesantemente, casi todos son eubacterias, aunque en algunos casos se encontraron bacterias y eucariontes (Magott, 1996 y Voordouw *et al.*, 1996).

Aunque no han sido caracterizados en su totalidad, muchos de estos microorganismos poseen actividades de peroxidasa y oxigenasa que permiten la oxidación más o menos específicas de algunas fracciones del petróleo. Esta oxidación cambia las propiedades de los compuestos, haciéndolos susceptibles de ataques secundarios y facilitando su conversión a dióxido de carbono y agua (Vázquez-Duhalt *et al.*, 2000).

La actividad microbiana hacia estos compuestos hidrofóbicos es diversa e involucra diferentes mecanismos de degradación.

Después de todas estas consideraciones surge una interrogante. ¿Cómo adquirieron los microorganismos la capacidad de degradar compuestos a los que tal vez nunca habían estado expuestos? Para entenderlo hay que tener en consideración que para cualquier organismo (inclusive para los humanos) lo más importante es reproducirse y perpetuar sus genes, por lo que cualquier condición ambiental o nutricional que reduzca su probabilidad de reproducirse despertará una reacción inmediata a nivel metabólico, en segunda instancia, a nivel genético.

Una de las estrategias que se han observado en respuestas a este tipo de retos es el reclutamiento. Cuando un organismo se encuentra ante una condición ambiental completamente desconocida de manera abrupta sólo puede utilizar lo que ya tiene. Es decir, que puede explotar alguna actividad enzimática existente para degradar un compuesto nuevo y sobrevivir al reto. (Valderrama, 2002, Skladany *et al.*, 1998)

### 10. 0 Aplicaciones de la biorremediación:

La biorremediación se ha aplicado con éxito para eliminar una gran variedad de contaminantes de suelos y acuíferos. En la **Tabla 2** se muestran algunos casos donde se han aplicado procesos de biorremediación.

Tipo de remediación	Lugar	Contaminante	Nivel de degradación	Duración del tratamiento	Autor
Adición de receptores de electrones (amonio y fosfatos)	*NR	Aceite de refinería	50-70%	300 días	Dott et al., 1995
Adición de aceptores de electrones (perclorato de hierro [III], nitrato de hierro[III] y peróxido de hidrógeno)	Suelo contaminado artificialmente	Diesel	>99%	1 hora	Watts y Dilly, 1996
Adición de aceptores de electrones (sulfato de hierro [III] y perclorato de hierro [II])	Suelo contaminado artificialmente	Diesel	70-80%	1 hora	Watts y Dilly, 1996
Bioaumentación con <i>Arthrobacter</i>	Fábrica de herbicidas Arkansas, EUA	Pentaclorofenol	Reducción de la vida media del tóxico	15 horas	Finn, 1983
Bioaumentación con bacterias y aplicación de fertilizantes	Exxon Valdez, Alaska	Derrame de aceite contaminado con hidrocarburos polinucleares aromáticos y alifáticos	60-90%	20-30 días	Atlas, 1995
Bioaumentación con un cultivo mixto de bacterias	*NR	Aceite de refinería	*NR	10 semanas	Dott et al., 1995
Bioreactores	Fábrica de pesticidas	Compuestos orgánicos clorados	20-90%	300 días	Dott et al., 1995
Bioreactores con adición de <i>Pseudomonas</i>	Fábrica de Herbicidas Arkansas, EUA	Compuestos orgánicos clorados	100%	14 horas	Finn., 1983
Bioreactores, nivel laboratorio	Fábrica de BPCs Checoslovaquia	BPCs	70-94%	22 días	Kastenek et al., 1995
Bioreactores, planta piloto	Fábrica de BPCs Checoslovaquia	BPCs	75-85%	5 semanas	Kastenek et al., 1995
Reactor sólido/líquido inoculado con <i>P. Chrysosporium</i>	Oregón, EUA	Hidrocarburos policlorados	83%	1 mes	Stroo et al., 1989
Tratamientos de suelos	Oregón, EUA	Pentaclorofenol y creotosa	80-99%	4-8 semanas	Stroo et al., 1989

\*NR= no reportado

**Tabla 2.** Ejemplo de aplicaciones de biorremediación

La tecnología de biorremediación es una versión más intensiva de la aplicación sobre el terreno. El sedimento contaminado es retirado del área afectada y mezclado con agentes que le proporcionen porosidad, además de nutrientes y fuentes de carbono complementarias. Para ello, se puede utilizar virutas de madera, forraje, abono vegetal, etc. La selección adecuada de estos compuestos se basa en el balance adecuado de carbono y nitrógeno que promueve la actividad microbiana. La máxima eficiencia de biodegradación se alcanza mediante la oxigenación diaria y la irrigación necesaria de acuerdo con los resultados de análisis del grado de humedad y temperatura (Skladany *et al.*, 1998 y Zaidi *et al.*, 1999).

Los siguientes factores pueden limitar la aplicabilidad y efectividad de esta tecnología:

Se requiere una gran cantidad de espacio.

Se requiere la excavación de los sedimentos contaminados y esto puede causar una liberación incontrolada de compuestos orgánicos volátiles.

El compostaje produce un incremento del volumen del material debido a la adición de materiales de mejora (residuos de poda).

Deben realizarse pruebas de biodegradabilidad de los contaminantes y de la dosis de nutrientes a adicionar (Boopathy, 2000).

## II ANTECEDENTES.

Debido al uso masivo del petróleo como fuente de energía y como materia prima, ha surgido en los últimos 50 años el fenómeno de la contaminación ambiental, lo cuál ha ocasionando el deterioro progresivo de la salud, así como la extinción de diversas especies animales y vegetales. Esta condición reta a nuestra sociedad, para encontrar medidas efectivas que remedien los efectos negativos del avance tecnológico (Valderrama, 2002).

El 24 de Marzo de 1989, el buque naviero Exxon Valdez derramó cerca de 11 millones de galones en la zona de Alaska, debido a un error de navegación. La capa de hidrocarburo derramada fue extendida en aproximadamente 2,000 Km. de la línea costera de Alaska, estimando que entre 3500- 5500 animales dejaron de existir. La limpieza sólo en el primer año después del incidente tuvo un monto de 2.5 mil millones de dólares (Overton, *et al.*, 1994).

El 28 de Marzo de 1993, un rompimiento ocurrido en lo oleoductos en Fairfax Country, Virginia causó el derrame de 400, 000 galones de gasóleo afectando 9 millas de la costa de río Potomac (Jones, 1998).

El 2 de Enero de 1997, ocurrió un derrame masivo de petróleo por el hundimiento de un buque ruso por lo que se desperdició más de 4500 toneladas de combustóleo de alta densidad en la mar de Japón, aproximadamente a 65 millas de la costa oeste (Jones, 1998).

El petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos y otros compuestos orgánicos, incluyendo algunos componentes organometálicos (Van *et al.*, 2003). Algunos de estos componentes son fuente de sustratos para los microorganismos, estos hidrocarburos son el objetivo para el metabolismo de algunos microorganismos (Ehrlich, 1995).

Diversos estudios han demostrado el éxito de la biotransformación, biodegradación y la biorremediación de hidrocarburos del petróleo y el interés de utilizar a organismos que

degradan hidrocarburos para limpiar el medio ambiente se ha convertido en el punto principal de la microbiología en el petróleo (Atlas, 1981).

Como se ha demostrado en nuestro laboratorio diversos estudios en biorremediación nos han proporcionado suficientes antecedentes para poder planear diversas hipótesis sobre este tema.

En el presente trabajo se pretenderá determinar si la capacidad de degradación de hidrocarburos en bacterias Gram (-) se encuentra codificada en plásmidos o en ADN genómico y si este plásmido proporciona alguna otra capacidad a las bacterias como lo puede ser la resistencia a antibióticos, así como el aislamiento y caracterización de bacterias Gram (-), a partir de una muestra de tierra contaminada con gasóleo de diesel.

También se pretende realizar una extracción de proteínas totales, con lo cuál observaremos un patrón electroforético.

### **III HIPÓTESIS.**

Ciertos géneros de bacterias Gram (-), nativas de terrenos de Poza Rica, Veracruz, contaminados con diesel son capaces de degradar hidrocarburos.

#### **IV OBJETIVOS GENERALES.**

1-Aislamiento de microorganismos nativos de zonas de Poza Rica, Veracruz, contaminadas con hidrocarburos, que sean capaces de degradar hidrocarburos.

2-Determinar las características macroscópicas y microscópicas de dichos microorganismos para observar las condiciones favorables en su uso posterior en biorremediación.

3-Identificar en que parte del genoma de estos microorganismos se encuentra codificada la capacidad de degradar hidrocarburos.

## **V OBJETIVOS PARTICULARES.**

1-Aislamiento de microorganismos Gram (-), capaces de degradar hidrocarburos en medio mineral adicionado con diesel.

2-Aislamiento de microorganismos capaces de degradar hidrocarburos en medios selectivos como: agar diesel.

3-Determinación de la velocidad de crecimiento en un medio mínimo con diesel como única fuente de carbono.

4-Identificación inicial de los microorganismos mediante pruebas bioquímicas.

5-Determinar el posible sinergismo que presenten los microorganismos en condiciones de estrés (condiciones con diesel).

6-Aislamiento de ADN total y, en caso de tener plásmido, el aislamiento de ADN plasmídico de bacterias degradadoras de hidrocarburos.

7-En caso de tener plásmido, eliminarlo de los microorganismos para observar su capacidad de degradación de hidrocarburos.

8-Determinar si estas bacterias tienen multiresistencia a antibióticos

9-Comparar el patrón de proteínas totales que presentan estas bacterias sometidas a diesel con aquellas que no fueron sometidas a éste.

## **VI MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1.0 Muestreo**

La muestra de tierra se colectó de la planta petrolera de Poza Rica, Veracruz, cerca de donde se obtiene el gasóleo primario diesel a 15 cm. de profundidad.

La obtención de microorganismos de la muestra se hizo pesando 1 g de tierra, la cual se resuspendió en 100 mL de medio mineral, el cual se incubó con agitación constante durante 2 hrs. a 28°C. Al término de este periodo se tomó 10 mL y se transfirieron a un matraz que contenía 95 mL de agua peptonada y se dejaron crecer durante 24 hrs. con agitación constante a 28°C. Posteriormente se realizaron diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000, de esta última dilución se sembraron por vaciado en placa en agar medio mineral-diesel como única fuente de carbono, se incubaron durante 48 hrs. a 28°C.

De las colonias que crecieron se seleccionaron aquellas que presentaron un mejor crecimiento y que se encontraban bien aisladas. A dichas colonias se les determinó la morfología macroscópica y microscópica. Cada una de las colonias fueron crecidas en medio mineral adicionado con diesel al 1.5% y estas se dejaron creciendo durante 72 hrs. con agitación constante a 28°C.

El medio mineral es un medio líquido que proporciona el pH adecuado, minerales necesarios y micronutrientes para el crecimiento microbiano. Sin embargo, no contiene fuente de carbono, la cual es únicamente proporcionada por el hidrocarburo.

Preparación de soluciones stock. Macronutrientes (**Tabla 3**)

Soluciones Stock	Pesar (g)	Llevar a 100 mL	Concentración final (g/mL)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20	√	0.2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.9	√	0.039
MgSO <sub>4</sub>	7.5	√	0.075
NaCO <sub>3</sub>	2.0	√	0.020
EDTA	0.1	√	0.001
Citrato de Na	0.6	√	0.006
FeSO <sub>4</sub>	0.3	√	0.003

**Tabla 3.** Concentración de las soluciones stock para la preparación de medio mineral (macronutrientes).

Micronutrientes. (**Tabla 4**)

Soluciones Stock	Pesar (g)	Llevar a 100 mL	Concentración final (g/mL)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86	√	0.0286
MnCl <sub>2</sub>	0.181	√	0.0018
ZnSO <sub>4</sub>	0.222	√	0.0022
NaMoO <sub>4</sub>	0.191	√	0.0019
CuSO <sub>4</sub>	0.079	√	0.00079
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.0494	√	0.00049

De estas soluciones se toma 1 mL de c/u y se lleva a un volumen final de 100 mL, a esta solución se le denominará micronutrientes.

**Tabla 4.** Concentración final para la elaboración de micronutrientes

La composición es la siguiente:

Soluciones stock	mL para 1L de medio	Concentración final (g/mL)
NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	10	2.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0	0.039
MgSO <sub>4</sub>	1.0	0.075
NaCO <sub>3</sub>	1.0	0.020
EDTA	1.0	0.001
Citrato de sodio	1.0	0.006
FeSO <sub>4</sub>	1.0	0.003
Micronutrientes	1.0	Ver <b>Tabla 4</b>
Total	17.0	
H <sub>2</sub> O destilada	983.0	
	1000	

**Tabla 5.** Composición del medio mineral. Todas las soluciones, incluyendo el agua se encuentran estériles y se manejan así. Estas cantidades fueron determinadas experimentalmente.

Como medio selectivo se utilizó un agar diesel como única fuente de carbono, presentando la siguiente composición (**Tabla 6**):

REACTIVO	PROPORCION PARA ½ L
Medio mineral	500 mL
Agar bacteriológico	6 g
Diesel*	7.614 mL (correspondiente al 1.5 %)

**Tabla 6.** Composición del medio mineral con diesel como única fuente de carbono.

\*Al diesel fue tratado con peróxido de hidrógeno en una relación 2:1 como donador de electrones y para ayudar a romper y desdoblar cadenas ramificadas del hidrocarburo.

## **2.0 Curvas de crecimiento.**

Para realizar una curva de crecimiento es necesario poner a crecer a la bacteria seleccionada en medio peptonado de 24 a 48 horas; facilitando su crecimiento, y para realizar el ajuste en el espectrofotómetro a 660 nm a 0.05 de absorbencia (abs.).

El crecimiento bacteriano se cuantificó por aumento en la biomasa con respecto al tiempo. Se tomó un mililitro del cultivo y se colocó en un tubo eppendorf, se centrifugó por 5 minutos a 10,000 rpm.

El pellet se resuspendió en un mililitro de medio mineral estéril, y se centrifugó nuevamente, repitiendo este procedimiento 3 veces en cada decantación, se limpiaron las paredes del tubo y por último se resuspendió el pellet en un mililitro de medio mineral y se procedió a hacer la lectura en un espectrofotómetro a 660 nm.

Como blanco se tomó medio mineral, el muestreo se realizó por triplicado para cada una de las curvas de crecimiento.

Se realizó una solución stock microbiana cuantificando el número de células por mililitro, con el fin de que se involucrara el mismo número de células por matraz, para que todas las curvas de crecimiento al tiempo cero tuvieran una concentración inicial de 0.05 de abs. en 100 mL de medio mineral adicionado con diesel al 1.5%.

Las curvas control se realizaron con medio mineral adicionado con 0.5% de peptona. Estos matraces se colocaron en las mismas condiciones de crecimiento que los matraces que contenían diesel como única fuente de carbono. El blanco utilizado fue medio mineral peptonado estéril.

El ajuste se realizó de la siguiente forma:

- 1.-Se coloca en un tubo eppendorf 990 $\mu$ L de medio mineral + 10 $\mu$ L del cultivo peptonado crecido previamente durante 24 ó 48 hrs., se mezcla.
- 2.-Se lee a 660 nm contra un blanco de medio mineral peptonado.
- 3.-La absorbancia obtenida es tomada como la dilución de la cantidad de células presentes en el medio.
- 4.-Se calcula la cantidad de mL a tomar del cultivo para obtener una absorbancia de 0.05, con un límite de 0.04-0.06 abs. tomando esta como primer lectura.
- 5.-Se inoculan de forma estéril a un matraz con la cantidad deseada de medio mineral y se adiciona también la cantidad necesaria de diesel para alcanzar una concentración del 1.5%.

Las lecturas se tomaron todos los días durante 3 semanas tratando cada muestra de la siguiente forma:

- 1.-Se toma 1mL. Se coloca en un tubo eppendorf.
- 2.-Se deja reposar por 10 min. para permitir que el diesel que se encuentra en el medio de cultivo se concentre en la superficie, sobre la fracción acuosa.
- 3.-Con cuidado se transfiere 1 mL de la fase acuosa a la celda tomando desde el fondo para dejar el diesel pegado a la pared del eppendorf y la punta de la pipeta.
- 4.-Se toma la lectura a 660 nm contra un blanco de medio mineral.

### **3.0 Sinergismo.**

De manera simultánea se realizó una curva de crecimiento donde las cepas se encontraban mezcladas en la misma cantidad de unidades por microorganismo para observar su velocidad de crecimiento en un sistema de sinergismo.

#### **4.0 Identificación de bacterias degradadoras de diesel.**

Para la identificación, las colonias seleccionadas, fueron crecidas en medios selectivos (medio para *Pseudomonas*, agar cetrimida y MacConkey). Además de realizar pruebas bioquímicas utilizando el sistema comercial API 20E (bacilos Gram (-) no fermentadores).

##### **Medio para *Pseudomona* (1Lt):**

-Bacto-peptona.....	20g
-Cloruro de magnesio.....	1.4g
-Sulfato de potasio.....	10 g
-Irgasan.....	0.025g
-Bacto-Agar.....	13.6 g

La siguiente parte de la identificación se realizó mediante el uso de tiras API 20E.

Esta prueba consiste de 23 pruebas bioquímicas estandarizadas y miniaturizadas, además de una base de datos.

##### **4.1 Principio:**

API 20 E consta de 20 microtúbulos conteniendo sustratos deshidratados. Estas pruebas se inoculan con una suspensión bacteriana la cual hidrata el medio. Durante la inoculación, se producen cambios de color espontáneos o revelados por adición de reactivos.

La lectura de las reacciones se hace de acuerdo con la tabla de lectura y la identificación mediante el API 20 E Index o el programa informático para la identificación.

##### **4.2 Técnica.**

Tratamiento de las muestras:

Los microorganismos a identificar deben ser crecidas en un medio de cultivo para bacilos Gram-negativos no exigentes (ejemplo: MacConkey).

#### **4.3 Preparación de la galería:**

Reunir el fondo y la tapa de una cámara de incubación y repartir aproximadamente 5 ml de agua destilada o desmineralizada (agua sin aditivos o derivados susceptibles de liberar gases (Cl<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> etc.)), en los alvéolos del fondo con el fin de crear una atmósfera de humedad. Sacar la galería de su envase y colocar la galería en su cámara de incubación.

#### **4.4 Preparación del inóculo.**

Abrir una ampolleta de NaCl 0.85% Medium (5mL) o utilizar un tubo que contenga 5 mL de agua estéril o de agua destilada estéril, sin aditivos.

Con la ayuda de una pipeta, tomar una sola colonia bien aislada de la placa de agar MacConkey.

Realizar una suspensión bacteriana homogeneizando cuidadosamente las bacterias en el medio.

#### **4.5 Inoculación de la galería.**

Llenar los tubos y las cúpulas de las pruebas [CIT], [VP], [GEL], con la suspensión bacteriana, utilizando la pipeta que sirvió para extraer la muestra.

Llenar sólo los tubos y no las cúpulas de las otras pruebas.

Crear una anaerobiosis en las pruebas ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S, URE, llenando su cúpula con aceite o parafina.

Cerrar la cámara de incubación e incubar a 35-37°C durante 18-24 horas.

#### **4.6 Lectura de la galería.**

Después de 18-24 horas a 35-37°C leer la galería con la ayuda de la tabla de lectura.

Anotar en la hoja de resultados las reacciones espontáneas.

Si 3 pruebas o más (pruebas GLU + o -) son positivas, registrar la lectura de la prueba GLU, y después revelar las pruebas que requieren reactivos:

-Prueba TDA: añadir 1 gota de reactivo TDA. Una coloración marrón-rojiza indica una reacción positiva, que debe anotarse en la hoja de resultados.

-Prueba IND: añadir 1 gota de reactivo de James. Una coloración rosa difundida por toda la cúpula indica una reacción positiva.

-Prueba VP: añadir 1 gota de reactivo VP 1 y VP 2. Esperar como mínimo 10 minutos. Una coloración roja o rosa indica una reacción positiva. La aparición de una coloración rosa pálido después de 10 minutos debe ser considerada como negativa.

-Prueba NO<sub>2</sub>: añadir 1 gota de reactivos NIT 1 Y NIT 2 en el tubo GLU. Esperar de 2 a 5 minutos. Una coloración roja indica una reacción positiva. Una reacción negativa (coloración amarilla) puede deberse a la reducción de los nitratos a N<sub>2</sub> (acompañada muchas veces con la formación de burbujas): añadir de 2-3 mg de reactivo de Zn en la cúpula GLU. Si después de 5 minutos el tubo permanece amarillo indica una reacción (N<sub>2</sub>) positiva, si la cúpula adquiere una coloración naranja-roja, la reacción es negativa, por cuanto los nitratos que todavía se encuentran presentes en el tubo han sido ya reducidos a nitritos por la presencia de zinc.

Esta reacción es importante para los bacilos Gram-negativos oxidasa positivos.

**Nota:** Las pruebas de reducción de nitratos y de producción de indol deben realizarse al final, debido a que estas reacciones liberan gas con riesgo de alterar la interpretación de otras pruebas de la galería. No colocar la tapa de la cámara de incubación tras añadir los reactivos.

Al mismo tiempo se realizaron otras pruebas bioquímicas para la identificación de la bacteria. Las pruebas que se realizaron fueron: Voges Proskhauer, Rojo de metilo, Ureasa, Nitratos y se usaron los medios Cetrimida, XLD, EMB, Mac Conkey.

Se utilizó un agar específico con diesel para comprobar si efectivamente solo se tenía una especie bacteriana. (como se mencionó en la pag. 35).

### **5.0 Extracción de ADN total**

Posteriormente se realizó la extracción de ADN a las 3 bacterias tomando las muestras de medio peptonado en donde crecieron durante 48 hrs y de medio mineral con diesel al 1.5%.

Se corrió el gel de agarosa al 0.8% con dichas muestras con y sin corte. La técnica fue la siguiente:

- 1.-Crecer a las bacterias en medio luria durante toda una noche, del medio de cultivo se tomaron 10 mL en condiciones de esterilidad, estos se transfieren a tubos de centrifuga de 15 mL estériles.
- 2.-Centrifugar por 10 min. a 3000 rpm.
- 3.-Decantar y resuspender en 1mL de buffer E+ 2mL de solución de lisis 2.
- 4.-Poner las muestras a baño maría por 20 min. a 55°C.
- 5.-Agregar 2 volúmenes de fenol-cloroformo a cada muestra. (pag. 43).
- 6.-Centrifugar a 3000 rpm por 30 min. 3 veces.
- 7.-Separar la fase de la solución de lisis que es donde se encuentra el ADN.
- 8.-Agregar 1/20 de volumen de acetato de sodio 3M y 2.5 volúmenes de etanol concentrado. La mezcla se incuba por 30 min. a -70°C.
- 9.-Se centrifuga a 3000 rpm por 20 min. y se decanta, el pellet se resuspende en 1mL de etanol al 70%.
- 10.-Se centrifuga por 20 min. a 3000 rpm y se decanta para resuspender en 20 ó 30 mL de Buffer TE.

Estas muestras se guardan en congelación hasta su uso. Con estas muestras se realizó la electroforesis en gel de agarosa. Se tratan las muestras de la siguiente forma:

- 1.-En un tubo eppendorf se ponen 6 $\mu$ L de agua estéril + 1 $\mu$ L de buffer de la enzima (kit)+ 2 $\mu$ L de ADN de la muestra + 1 $\mu$ L de enzima (BAM H1).
- 2.-Se pone a incubar a baño maría por 30 min. a 37°C.
- 3.-Se le agrega 1 $\mu$ L buffer de carga.
- 4.-Se coloca la muestra en el gel.

Los pozos del gel se cargan con una mezcla de la siguiente composición:

Muestra de ADN.....5 $\mu$ L  
Buffer de carga 10X.....1 $\mu$ L  
H<sub>2</sub>O destilada esterilizada....4 $\mu$ L

Se corre a 80 volts en un gel de agarosa al 0.8% y se utiliza Tris-borato 0.5X como buffer de corrida.

Posteriormente se tiñe con bromuro de etidio (cancerígeno) durante 5 min.Después se enjuaga el gel y se visualiza mediante el uso de luz UV.

**Medio Luria:**

- Tryptona.....10g
- NaCl.....5g
- Extracto de levadura.....5g
- H<sub>2</sub>O.....1000mL

**Buffer E:**

- Tris acetato.....40mM
- EDTA.....2mM
- H<sub>2</sub>O.....100mL

**Solución de lisis 2:**

- SDS.....3%
- Tris-base.....0.05M
- Se ajusta el pH a 12.6 con NaOH 2N.

**Buffer TE:**

- Tris-HCl pH 7.5..... 0.010M
- EDTA.....0.001M
- H<sub>2</sub>O.....100mL

**Composición del gel de agarosa al 0.8%:**

- 0.40 g de agarosa
- Tris 1X (10 mL de Tris 5X+ 40 mL de agua destilada)

**Buffer Tris borato 5X:**

-Tris base pH=8.....	10.8g
-H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	5.5g
-EDTA.....	0.74g
-H <sub>2</sub> O.....	200mL

**Buffer de corrida 0.5X:**

-Buffer Tris borato 5X.....	22mL
-H <sub>2</sub> O.....	198mL

**Buffer de carga 10X:**

-Sacarosa.....	37%
-EDTA.....	50Mm
-Azul de bromofenol.....	0.1%
-SDS.....	0.1%

Para hacer la comparación se coloca también muestra de ADN sin cortar; esta contiene lo mismo que la anterior pero sin la enzima de restricción.

## **6.0 Extracción de ADN plasmídico.**

### **Preparación de ADN plasmídico**

(Birnboim y Doly, 1979)

- 1.-Crecer a las bacterias durante toda la noche (12 hrs.) en medio Luria.
- 2.-Tomar 1.5 mL del cultivo anterior y pasarlo a un tubo eppendorf y centrifugar durante 1 min.
- 3.-Decantar dejando el pellet formado lo mas seco posible.
- 4.-Resuspender a las células en 100 $\mu$ L de la solución I fría.
- 5.-Incubar 15 min. a temp. ambiente.
- 6.-Agregar 200 $\mu$ L de la solución II fresca, mezclar por inversión (no usar vortex).
- 7.-Incubar 10 min. en hielo.
- 8.-Agregar 150 $\mu$ L de la solución III fría. Mezclar por inversión e incubar por 15 min. en hielo.
- 9.-Centrifugar por 5 min.
- 10.-Recuperar el sobrenadante y centrifugar por 5 min.
- 11.-Resuspender el sobrenadante y agregar 20  $\mu$ g/mL de RNAsa (opcional), incubar por 20 min. a 37°C.
- 12.-Agregar un volumen igual de fenol:cloroformo (1:1) saturado con TE. Mezclar vigorosamente (centrifugar 30 segundos).
- 13.-Recuperar la fase acuosa y agregar 2.5 volúmenes de etanol. Incubar a -70°C por 5 min.
- 14.-Centrifugar por 5 min.
- 15.-Decantar y enjuagar el pellet con 100 $\mu$ L de etanol al 70%.
- 16.-Secar el pellet y resuspender con 20 $\mu$ L de agua.

**Solución I.**

Sacarosa.....	15%
Tris-HCl pH 8.0.....	25mM
EDTA.....	10 mM

**Solución II.**

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

**Solución III**

Acetato de potasio.....	5 M (60 mL)
Ácido acético.....	11.5 mL
H <sub>2</sub> O.....	28.5 mL

Al fenol se le realizó un tratamiento de la siguiente forma:

Colocar una cantidad de fenol en un recipiente para someter a baño maría hasta que el fenol este completamente líquido y cristalino.

Una vez en estado líquido, agregar una cantidad suficiente de agua y agitar constantemente para lograr una hidratación adecuada, descartar posteriormente la fase acuosa.

Ajustar el pH entre 7-8 agregando Tris 1M. Una vez ajustado el pH, se conserva en refrigeración.

La relación 1:1 con cloroformo se hace en el momento de la técnica.

### **7.0 Técnica de eliminación de plásmido mediante naranja de acridina.**

Actualmente la técnica de curación con naranja de acridina es el método más aceptable.

Se elabora una solución con naranja de acridina de 500µg/mL en agua, se esteriliza en autoclave y se almacena en oscuridad.

Se utiliza un medio que contenga 10g de extracto de levadura y 10g de peptona por litro de agua, en el cual se ajusta el pH a 7.6 con NaOH (el pH es importante).

Después se inocula el cultivo que va ser curado toda la noche en el medio de cultivo.

Se inocula alrededor de  $10^4$  células dentro de una serie de tubos que contengan el medio de cultivo y concentraciones de naranja de acridina que van de 0, 10, 20, 30,....100µg/mL. Incubar estos tubos toda la noche a 37°C en oscuridad.

Tomar el cultivo el cual muestre crecimiento a la mayor concentración de naranja de acridina.

La eliminación del plásmido puede alcanzar un rango de 100%, pero frecuentemente es de 10 %.

Nota: algunos episomas no pueden ser curados por este método.

### **8.0 Extracción de proteínas totales.**

La extracción de proteínas y observación de las bandas formadas en electroforesis unidimensional de peso molecular se realizaron de la siguiente manera:

**(Figura 13, resultados).**

Técnica:

- 1.-Crecer las bacterias en un medio rico (medio luria), durante toda la noche.
- 2.-Tomar 1 mL del medio y centrifugar por 3 o 4 min. decantar.
- 3.-Repetir el paso anterior 2 veces más.
- 4.-Resuspender en 1 mL de H<sub>2</sub>O, centrifugar por 3 min. y decantar.
- 5.-Resuspender en 1 mL de buffer de muestra.
- 6.-Colocar a las muestras en baño maría a ebullición por 3 minutos.
- 7.-Centrifugar durante 3 minutos, las proteínas quedaran en el sobrenadante.

Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida.

Correr en un gel concentrador al 6.0% a 150 volts constantes y luego aumentar el voltaje al entrar las muestras al gel separador al 12.5% a 180 volts constantes.

**Gel de poli(acrilamida) 12.5%****Gel separador al 12.5 %**

Sol. stock bis- acrilamida (30:0.8).....	16.60mL
Buffer Tris-HCl pH=8.3, 3 M (8X).....	5.0 mL
SDS 10% .....	320µL
H <sub>2</sub> O destilada.....	18.02mL
Persulfato de amonio (APS) al 10%.....	300µL
TEMED.....	20µL

**Gel concentrador al 6.0%**

Sol. Stock bis-acrilamida (30:0.8).....	2mL
Buffer Tris-HCl pH 6.8, 0.5M (4X) .....	2.5mL
SDS al 10%.....	100µL
H <sub>2</sub> O destilada.....	50.4mL
APS 10%.....	150µL
TEMED.....	125µL

**Solucion stock bis-acrilamida**

Acrilamida.....	58.4g
Bisacrilamida.....	1.6g

**Buffer de muestra**

Tris-HCl pH=6.8.....	0.125M
SDS.....	4%
Glicerol.....	20%

Ajustar a un volumen final de 10 mL almacenar en un tubo eppendorf a -20°C

**Solución teñidora**

Azul de coomassie.....	1.25g
Metanol.....	500 mL
Ácido acético glacial.....	100 mL
Agua destilada.....	1000 mL
Filtrar con filtros Whatman #1	

**Solución de electrodos**

Agua destilada.....	1000 mL
Metanol.....	70 mL
Ácido acético glacial.....	100 mL

**Buffer de electrodos (5X)**

Agua destilada.....	600 mL
Tris base.....	9 g
Glicerina.....	43.2 mL
SDS.....	3 g

**Buffer de carga para proteínas (10X)**

$\beta$ -mercaptoetanol.....	10 %
Tris-HCl.....	0.125 M
Glicerol.....	20%
SDS.....	4%
Azul de bromo fenol.....	2 mg/mL

### **9.0 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana.**

Se prepara medio para antibióticos y medio Luria (10 mL para cada tubo). Se inocula por asada en caldo Luria cada cepa.

Se incuba a 35°C durante 8 horas, se toma una alícuota de 0.1 mL y se resuspende en medio para antibióticos. Homogenizar perfectamente.

Verterlo en cajas que contienen medio para antibióticos, homogenizar y colocar el multidisco combinado e incubar durante 24 horas a 37°C.

Medir los halos de inhibición en los antibiogramas.

El medio empleado fue un medio para antibióticos No.1 de Grove y Randall, hecho por Bioxon de México S.A de C.V.

Medios para antibióticos.

30.5 g de medio para antibióticos.....1000 mL

Fórmula para 1000ml de agua destilada:

Peptona de gelatina.....6.0g

Peptona de caseína.....4.0g

Extracto de levadura.....3.0g

Extracto de carne.....1.5g

Dextrosa.....1.0g

Agar.....15.0g

pH.....6.6+/-0.1.

Los multidiscos combinados utilizados contienen los siguientes 12 antimicrobianos con las siguientes concentraciones (**Tabla 7**):

ANTIMICROBIANO	ABREVIATURA	CONCENTRACIÓN microgramos ( $\mu\text{g}$ )
Amikacina	Ak	30
Ampicilina	AM	10
Cefalotina	CF	30
Ceftriaxona	CRO	30
Cloranfenicol	CL	30
Dicloxacilina	DC	1
Enoxacina	ENX	10
Eritromicina	E	10
Gentamicina	GE	10
Netilmicina	NET	30
Penicilina	PE	10 U
Tesulfametaxazol	SXT	25

**Tabla 7.** Concentraciones de los antimicrobianos utilizados en los multidiscos combinados

## **VII RESULTADOS.**

### **1.0 Muestreo.**

Como se puede apreciar en la **Tabla 8**, estas son las características inicialmente apreciadas de la muestra de tierra que se tomó de una planta petrolera ubicada en la zona de Veracruz. La muestra se recolectó en la sección de gasóleo primario en una parte donde la tubería se encontraba con una fuga, la cual derramaba diesel sobre la tierra, por lo que se decidió tomar una porción debido a que esa zona llevaba ya tiempo con ese derrame pudiendo existir la posibilidad de que la población microbiana se hubiese ya adaptado a esta condición.

**Tabla 8.** Reporte de la identificación de la muestra de tierra.

Color	Café oscuro (casi negro)
Consistencia	Arenosa, se maneja normalmente pero se encuentra grasosa, deja manchas al tocarla
Olor	A diesel, no muy penetrante
Apariencia	Tierra con humedad

Una vez obtenidos los microorganismos de la muestra de tierra, se decidió sembrarlos en medio selectivo que nos permitiera seleccionar aquellos que fueran capaces de crecer en hidrocarburos, por lo que se utilizó agar medio mineral con 1.5% de diesel.

De esta selección se tomaron 3 colonias a las cuales se les determinó sus características macroscópicas y microscópicas; dichas características son presentadas en la **Tabla 10**. Como puede observarse en esta tabla, los microorganismos seleccionados son bacilos Gram (-), rectos con bordes curvos, sin la formación de esporas, lo que concuerda con otros reportes, que indican que la gran mayoría de microorganismos capaces de crecer en hidrocarburos son bacilos Gram (-).

## 2.0 Características macroscópicas y microscópicas.

Se eligieron tres colonias distintas inicialmente denominadas Grande, Tornasol y Transparente por sus características morfológicas en MacConkey y sus características microscópicas (**Tabla 10, resultados**), las cuales se manejan por letras de la siguiente forma:

A	Tornasol
B	Transparente
E	Grande

**Tabla 9.** Terminología empleada para todos los experimentos.

Los resultados del análisis macro y microscópico de las colonias seleccionadas se presenta en la **Tabla 10**. Se utilizó un medio que nos proporcionara las características deseadas para nuestro estudio como lo es el agar MacConkey el cual es un medio selectivo y diferencial para la detección de organismos coliformes y patógenos entéricos, debido a su concentración de sales biliares y cristal violeta lo hace selectivo para microorganismos Gram negativos y el color de las colonias indica su capacidad de degradación para lactosa.

Otro medio de cultivo que se utilizó fue agar nutritivo para la identificación de *Pseudomonas* por su producción de coloración azul verdosa por la producción de pigmentos de piocianina y fluoresceína además de su color característico en este medio.

**Tabla 10.** Características macro y microscópicas.

De A, B y E se tuvieron las siguientes características:

Cepa	Características macroscópicas (en Agar nutritivo)	Características microscópicas
A	Crecimiento de una sola colonia grande, de color tornasol, con pigmento hidrosoluble amarillo verdoso, de borde regular y consistencia butarícea. Con olor a uvas y movilidad	<ul style="list-style-type: none"><li>• Bacilos cortos rectos con bordes curvos, Gram (-);</li><li>• Con forma de diplobacilos, presentan cápsula.</li></ul>
B	Crecimiento de una sola colonia mediana, de borde regular, consistencia butirícea, de color blanco traslúcido con pigmento hidrosoluble rojo-café Sin olor.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Bacilos cortos Gram (-) pero muy pequeños casi no se distinguen a 100x</li></ul>
E	Crecimiento de una sola colonia blanca grande, de borde regular y consistencia butirícea.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Bacilos cortos Gram (-), con bordes curvos</li></ul>

Las colonias de los microorganismos denominados "A" y "B" eran planas, presentan márgenes lacerados, pigmento verde-azul, olor a uvas y son opacas gris verdoso. Microscópicamente son bacilos cortos Gram negativos. Con estos resultados y en base a la morfología colonial, olor característico y la producción de pigmentos fluorescentes de manera presuntiva se pudo identificar a ambas cepas como *Pseudomonas*, lo cual lo comprobaremos mediante pruebas bioquímicas (**Tabla 11 y 12**).

Con respecto a la cepa denominada "E" las colonias era de color blanca, grande con borde regular y consistencia butarícea. Microscópicamente es un bacilo corto Gram negativo con bordes curvos. Estos resultados no fueron concluyentes para la identificación de esta cepa, por lo que se procedió a realizar pruebas bioquímicas (**Tabla 11 y 12**).

**Tabla 11. Pruebas Bioquímicas.**

Prueba bioquímica	Cepa A	Cepa B
Crecimiento a 42°C	+	+
Crecimiento en Agar Mac Conkey	Muy bien	Buen crecimiento
Catalasa	+	+
Motilidad a 37°C	+	+
O/F glucosa oxidativo	+ no fermentador	+ no fermentador
Indol	-	-
Citrato de Simmons	+	+
Rojo de metilo	-	-
Voges-Proskauer	-	-
Producción de pigmento	+ verde	+ rojo-café
Oxidasa	+	+
Aerobios estrictos	√	√
Licuefacción de gelatina a 22°C	++	+

**Tabla 12. Pruebas Bioquímicas.**

Prueba bioquímica	Cepa E
Crecimiento en Agar Mac Conkey	+, colonias grandes, mucoide roja
Licuefacción en gelatina a 22°C	-
Indol	-
Rojo de metilo	-
Voges-Proskauer	+
Citrato de Simmons	+
Motilidad	+
Oxidasa	-
Reducción de nitrato	+
Reducción de nitrito	-
O/F	+
Ureasa	-

### 3.0 Identificación.

Para poder identificar a los microorganismos obtenidos, estos fueron sometidos a pruebas bioquímicas, mediante el uso de Tiras Api 20E, las cuales, como ya se mencionó, constan de 20 microtúbulos los cuales tienen los substratos deshidratados, a los cuales se les inoculaba la suspensión bacteriana. Durante la inoculación se producirán cambios de color espontáneos o revelados por la adición de reactivos. Las lecturas de estas reacciones se hacen mediante una tabla de lectura y la identificación se realiza con el Api 20E index o bien con el programa informativo para la identificación.

El resultado de las tiras Api 20E se presenta a continuación:

**Tabla 13.** Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas con tiras Api 20E, a las colonias aisladas.

Prueba bioquímica	Colonia A	Colonia B	Colonia E
OPNG	-	-	+
Arginina	+	-	+
Lisina	-	-	-
Ornitina	-	-	+
Citrato	+	+	+
Sulfuro de hidrógeno	-	-	-
Ureasa	-	-	-
Triptofano deaminasa	-	-	-
Indol	-	-	-
Voges Proskauer	-	-	+
Gelatina	+	+	-
Glucosa	+	+	+
Manitol	-	-	+
Inositol	-	-	-
Sorbitol	-	-	+
Ramnosa	-	-	+
Sacarosa	-	-	+
Melibiosa	-	-	+
Amigdalina	-	-	+
Arabinosa	-	-	+
Oxidasa	+	+	-
Movilidad	+	+	+
Aerobios estrictos	+	+	+

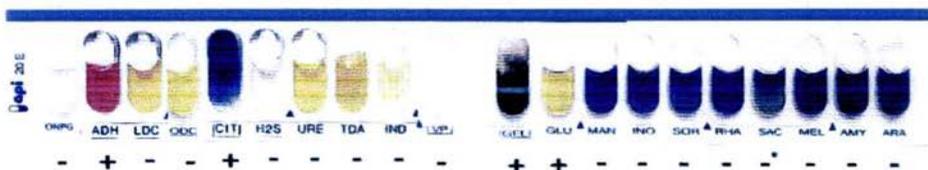
De los resultados de las Tiras Api 20E, las pruebas bioquímicas adicionales, observaciones microscópicas y morfología colonial se pudo concluir con seguridad sobre la identificación de los microorganismos en este proyecto.

El resultado de identificación es presentado en la **Tabla 14** y **Figuras 5,6 y 7**.

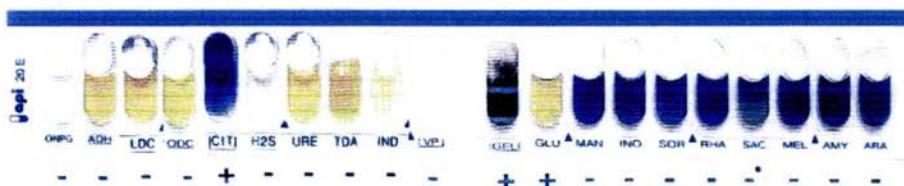
Denominada	Identificación
A	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
B	<i>Pseudomonas putida</i>
E	<i>Enterobacter cloacae</i>

**Tabla 14.** Identificación de las bacterias mediante Tiras Api 20E.

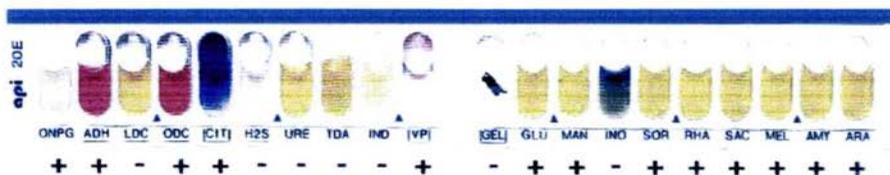
**TIRAS API 20E.**



**Figura 5.** Tira API 20E, identificación de la cepa A (*Pseudomonas aeruginosa*)



**Figura 6.** Tira API 20E, identificación de la cepa B (*Pseudomonas putida*)



**Figura 7.** Tira API 20E, identificación de la cepa E (*Enterobacter cloacae*)

Como se puede observar, dos de las tres bacterias identificadas son *Pseudomonas*. lo cual nos habla de la facilidad que presenta esta especie para adaptarse a condiciones difíciles de alimentación para otras especies microbianas. De acuerdo a reportes *Pseudomonas* es una de las especies microbianas que frecuentemente se encuentra en derrames de hidrocarburos constituidos tanto por compuestos saturados, como por compuestos aromáticos, resinas y asfaltenos.

En lo que respecta a la bacteria denominada "E", ésta resultó ser *Enterobacter cloacae* la cual es una bacteria que solo se ha reportado una sola vez que sea degradadora de hidrocarburos. Este reporte lo realizó en el 2002 Saadoun I. Jordan.

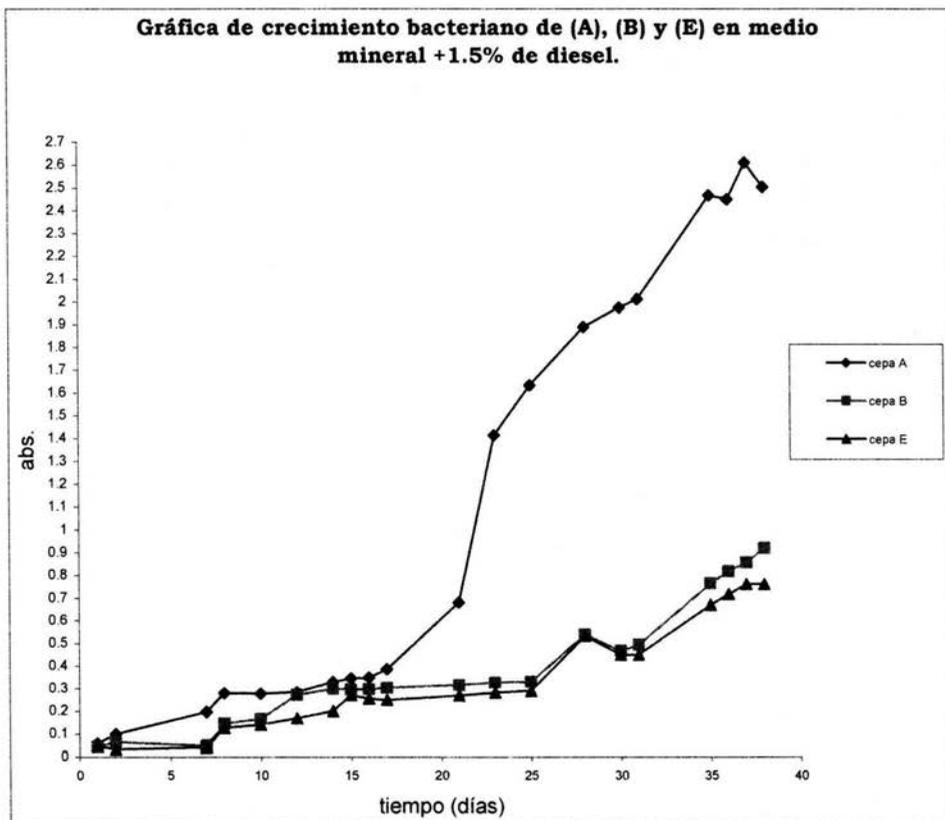
#### **4.0 Curvas de crecimiento.**

Con este estudio se intentó observar la velocidad a la cual los microorganismos alcanzan su mayor crecimiento en un determinado intervalo de tiempo, ya que, pese a que esto no demuestra que realmente estén utilizando directamente el hidrocarburo (diesel) como fuente de energía nos da una idea clara de que bacteria puede tolerar estas condiciones y, además, crecer en un medio donde la única fuente de carbono que está presente es el diesel, la cual es esencial para producir compuestos celulares, productos metabólicos, etc. Además de la fuente de carbono que es nuestro parámetro principal de este estudio, el medio en que se encuentran los microorganismos también cuenta con los otros nutrientes requeridos para su crecimiento como lo es el N, P y oligoelementos, ya que pese a que los hidrocarburos son ricos en fuente de carbono orgánico, son deficientes en nutrientes minerales necesarios para el crecimiento microbiano (Atlas, 1988).

Al correrse la curva de crecimiento se comparan los resultados de las tres bacterias en una sola tabla para tener una mejor perspectiva de cual de las tres bacterias crece mejor en medio mineral con diesel:

**Tabla 15.** Resultado de la curva de crecimiento de A, B y E

	<b>Tornasol (A)</b> <b>(<i>Pseudomonas</i></b> <b><i>aeruginosa</i>)</b>	<b>Transparente (B)</b> <b>(<i>Pseudomonas</i></b> <b><i>putida</i>)</b>	<b>Grande (E)</b> <b>(<i>Enterobacter</i></b> <b><i>cloacae</i>)</b>
Tiempo ( días )	ABS ( nm )	ABS ( nm )	ABS ( nm )
1	0.057	0.044	0.045
2	0.097	0.063	0.031
7	0.195	0.048	0.040
8	0.278	0.144	0.124
10	0.276	0.164	0.138
12	0.282	0.270	0.168
14	0.329	0.297	0.199
15	0.344	0.294	0.269
16	0.347	0.295	0.253
17	0.385	0.302	0.248
21	0.680	0.314	0.267
23	1.413	0.326	0.280
25	1.631	0.329	0.288
28	1.888	0.538	0.532
30	1.973	0.466	0.448
31	2.011	0.492	0.449
35	2.467	0.764	0.670
36	2.450	0.818	0.717
37	2.610	0.856	0.760



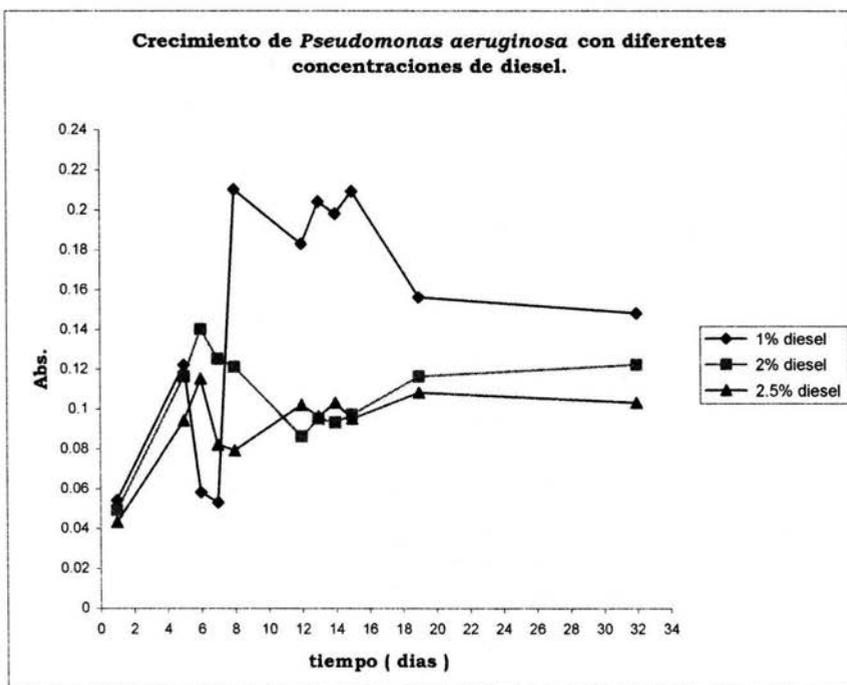
**Figura 8.** Crecimiento de las bacterias *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* y *Enterobacter cloacae* en medio mineral con diesel al 1.5 %, aisladas de tierra de la planta de Poza Rica (gasóleo primario ligero).

En la **Figura 8** puede apreciarse claramente que la cepa A, *Pseudomonas aeruginosa*, no solo muestra una mayor velocidad de crecimiento, sino que alcanza a producir concentraciones elevadas de biomasa, muy por arriba de lo que son capaces las cepas B y E. Por el contrario, B y E se comportaron de una manera muy parecida, creciendo lentamente y formando, relativamente poca biomasa después de 37 días de incubación.

Debido a que *Pseudomonas aeruginosa* (A) fue la que presentó un crecimiento superior con respecto a las otras se decidió estudiarla a diferentes concentraciones de diesel. Se realizaron 3 curvas más de crecimiento a diferentes concentraciones (1.0, 2.0, y 2.5% de diesel) (**Tabla 16**). Esto se realizó con la finalidad de encontrar la concentración más adecuada para que *Pseudomonas aeruginosa* (A) tenga una mejor velocidad de crecimiento.

	<b>Diesel al 1.0%</b>	<b>Diesel al 2.0%</b>	<b>Diesel al 2.5%</b>
Tiempo (días)	ABS (nm)	ABS (nm)	ABS (nm)
1	0.054	0.049	0.043
5	0.122	0.116	0.094
6	0.058	0.140	0.115
7	0.053	0.125	0.082
8	0.210	0.121	0.079
12	0.183	0.086	0.102
13	0.204	0.095	0.096
14	0.198	0.093	0.103
15	0.209	0.097	0.095
19	0.156	0.116	0.108
32	0.148	0.122	0.103

**Tabla 16.** Datos de las curvas de crecimiento para conocer la concentración adecuada de diesel para la cepa *Pseudomonas aeruginosa* (A).



**Figura 9.** Absorbencias tomadas a 660 nm a diferentes concentraciones de diesel, contra un blanco de medio mineral.

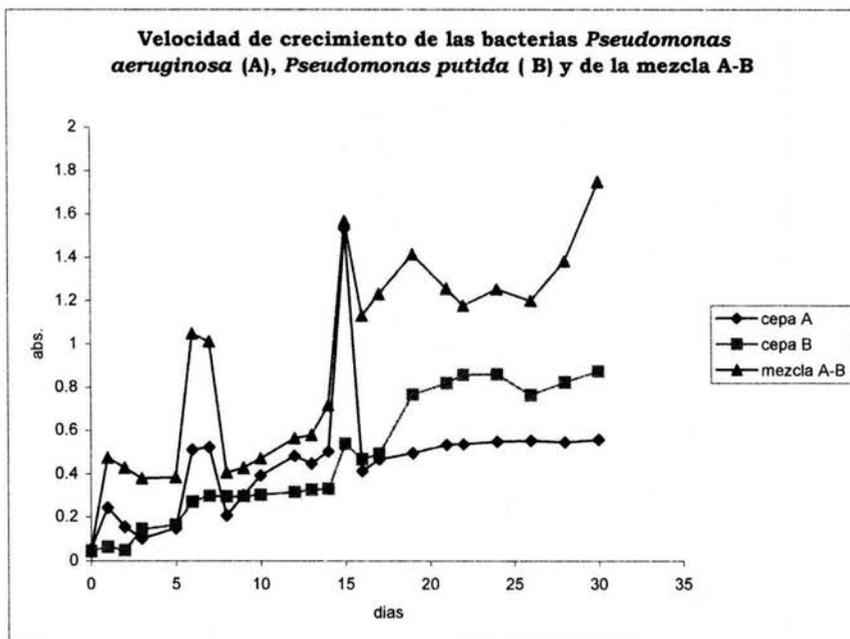
Posteriormente se intentó observar mediante una curva de crecimiento el posible sinergismo que pudieran presentar estas bacterias, utilizando una mezcla de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (A) y de la cepa *Pseudomonas putida* (B) (Tabla 17). Como ya se apuntó anteriormente en la Figura 8, son las que mejor capacidad de crecimiento presentaron.

El sinergismo es un proceso que se puede presentar comúnmente sobre las especies ya que lo que sucede en estos casos es que los nutrientes que le sirven a una de las especies le permiten desdoblarse y sintetizar algunas estructuras moleculares que serían muy complejas para otra especie, pero una vez comenzado la degradación de estos

componentes, la siguiente especie puede hacer uso de estos para así continuar con su crecimiento.

Día	Cepa A	Cepa B	Mezcla A-B
0	0.050	0.044	0.042
1	0.242	0.063	0.473
2	0.155	0.048	0.427
3	0.101	0.144	0.378
5	0.148	0.164	0.383
6	0.510	0.270	1.047
7	0.522	0.297	1.010
8	0.207	0.294	0.404
9	0.301	0.295	0.426
10	0.391	0.302	0.469
12	0.482	0.314	0.563
13	0.447	0.326	0.579
14	0.502	0.329	0.714
15	1.530	0.538	1.566
16	0.412	0.466	1.130
17	0.466	0.492	1.230
19	0.494	0.764	1.414
21	0.533	0.818	1.255
22	0.536	0.856	1.178
24	0.548	0.860	1.253
26	0.552	0.763	1.199
28	0.545	0.822	1.382
30	0.557	0.872	1.746

**Tabla 17.** Valores de absorbencia a 660 nm de los cultivos de la cepa A, de la cepa B y de la mezcla A-B.



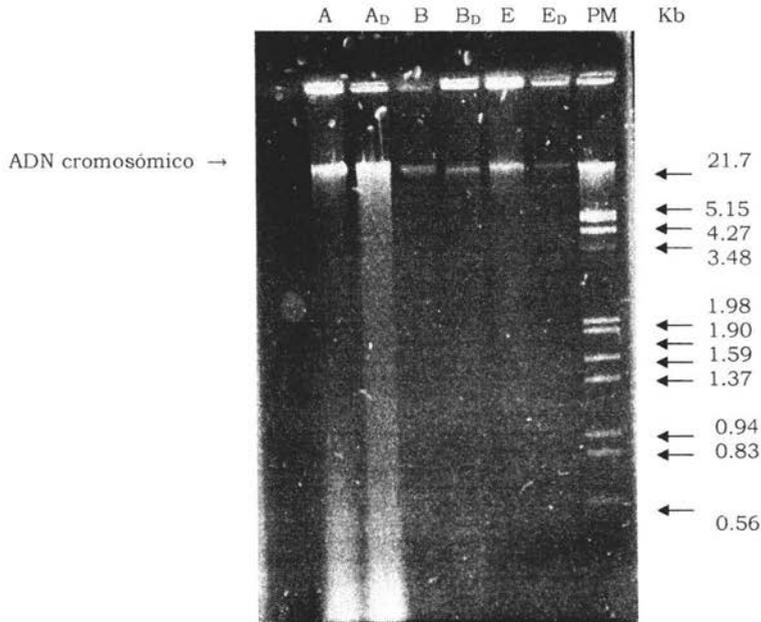
**Figura 10.** Grafica de los valores reportados en la **Tabla 15**. Las cepas A, B y A-B. Fueron crecidas durante 30 días en medio mineral con 1.5% de diesel como fuente de carbono.

### 5.0 Extracción de ADN total.

El objetivo de la extracción de ADN total fue el visualizar el ADN cromosómico y a su vez conocer si mediante esta técnica, también se podría visualizar ADN plásmidico de gran tamaño que pudieran tener las bacterias de nuestro estudio. Ya que como se sabe las bacterias de origen silvestre frecuentemente presentan plásmido, este es generalmente de gran tamaño. Esto se estudió mediante el uso de una enzima de restricción, ya que si en la extracción de ADN se obtuviese ADN plásmidico, al momento de ser cortado con la enzima de restricción en el gel de agarosa de visualizarían bandas nítidas y perfectamente distinguibles. Por lo contrario, si se trata de ADN cromosómico y plásmidico lo que se observará será un barrido a consecuencia de la cercanía en tamaño de las bandas de peso molecular presente en el ADN cromosómico.

De la extracción de ADN total analizada en un gel de agarosa puede observarse el comparativo de ADN de bacterias aisladas de muestras de tierra y crecidas sin diesel con respecto a bacterias que estuvieron crecidas en presencia de diesel (**Figura 11**).

ADN TOTAL. GEL DE AGAROSA AL 0.8 %



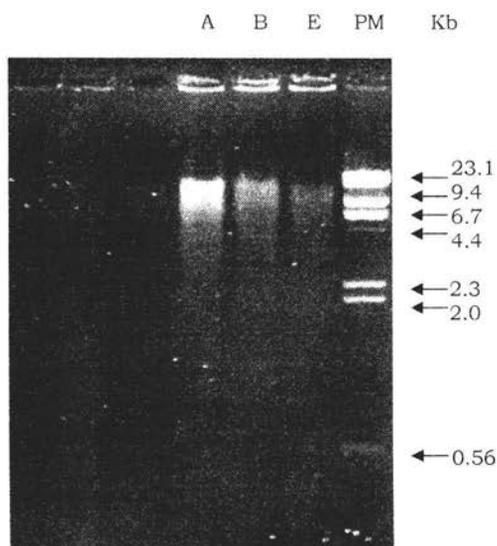
**Figura 11.** Extracción de ADN total en muestras crecidas con diesel y en muestras crecidas sin diesel.

- A=*Pseudomonas aeruginosa*
- A<sub>D</sub>=*Pseudomonas aeruginosa* crecida en medio mineral con diesel
- B=*Pseudomonas putida*
- B<sub>D</sub>=*Pseudomonas putida* crecida en medio mineral con diesel
- E=*Enterobacter cloacae*
- E<sub>D</sub>=*Enterobacter cloacae* crecida en medio mineral con diesel
- PM=marcador de peso molecular (ADN de  $\lambda$  cortado con Hind III y Bam HI)
- Kb=Kilobases

## 6.0 Análisis de ADN cortado con enzima de restricción (*Bam HI*).

Con el análisis de ADN cortado con una enzima de restricción, nuestro objetivo fue intentar observar bandas de peso molecular discreto para así poder calcular el tamaño de estas bandas y a su vez el conocer si mediante esta técnica podríamos distinguir al posible ADN plasmídico.

Desafortunadamente, el tamaño de dichos fragmentos no generó bandas discretas por lo que solo se logra observar un barrido debido a la cercanía en pesos moleculares de las bandas presentes (**Figura 12**).

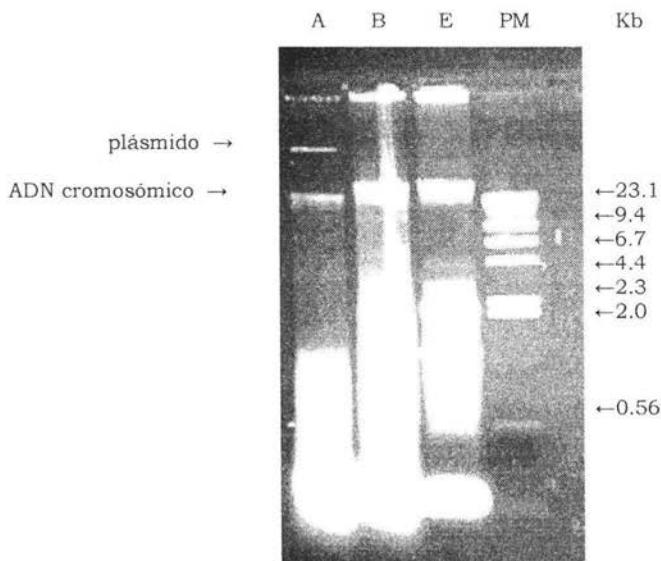


**Figura 12.** El ADN se cortó con *Bam HI* y se analizó mediante un gel de agarosa.

A=*Pseudomonas aeruginosa*  
B=*Pseudomonas putida*  
E=*Enterobacter cloacae*  
PM=marcador de peso molecular  
(ADN de  $\lambda$  cortado con HIND III)  
Kb=Kilobases

### 7.0 Extracción de ADN plasmídico.

Dado que mediante la extracción de ADN total no fue posible determinar si las bacterias aisladas eran o no portadoras de plásmidos, se procedió a hacer una extracción de ADN plasmídico mediante la metodología de Birnboim y Doly. El ADN extraído se analizó en un gel de agarosa como se muestra en la **Figura 13**.



**Figura 13.**

La cepa A (*Pseudomonas aeruginosa*) es la única que presenta plásmido.  
B (*Pseudomonas putida*), E (*Enterobacter cloacae*),  
PM=marcador de peso molecular, Kb=kilobases.

### **8.0 Eliminación del plásmido.**

Con este experimento se trató de estudiar la capacidad que podrían proporcionar los plásmidos a las bacterias en caso de estar presentes, ya que se ha demostrado que puede haber microorganismos del mismo género y especie con diferentes capacidades para la degradación de hidrocarburos. En nuestro estudio se trató, en caso de tener plásmido nuestras bacterias, eliminarlo mediante alguna de las diversas técnicas que en la actualidad existen como lo son: el crecimiento en presencia de benzoato de sodio, crecimiento en SDS, crecimiento mediante resiembras sucesivas y crecimiento en naranja de acridina. Esta última fue la técnica empleada en nuestro estudio para eliminar al posible plásmido. Para ello, como ya se apuntó, primero se hizo una extracción de ADN plasmídico para saber si alguna de las tres cepas bacterianas portaban plásmido.

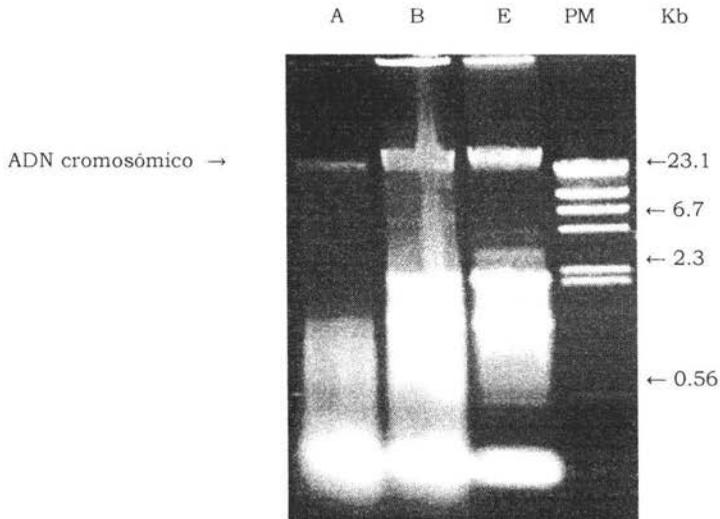
Como puede observarse en la **Figura 13**, la única especie que tiene plásmido es la cepa *Pseudomonas aeruginosa* (A), lo cual podría relacionarse con los resultados reportados en la **Figura 8** sobre la velocidad de crecimiento donde se puede observar que el crecimiento de esta bacteria es muy superior con respecto a las otras dos cepas.

Este resultado sugirió que este plásmido podría estar involucrado en la degradación de diesel pero, para tomar una decisión final, fue necesario hacer otra serie de experimentos que a continuación se describen.

### **9.0 Análisis de ADN después de "curar" a la bacteria del plásmido.**

Una vez observado que la única cepa que tiene plásmido es *Pseudomonas aeruginosa* (A), (**Figura 13**) se intentó eliminar dicho plásmido mediante la técnica de crecimiento en naranja de acridina, para su posterior estudio en una nueva curva de crecimiento y así observar su comportamiento una vez que la cepa ya no tuviera plásmido.

Como se puede observar en la **Figura 14**, mediante el uso de naranja de acridina el plásmido fue eliminado de *Pseudomonas aeruginosa* (A), con lo que ahora se podrá estudiar la utilidad de dicho plásmido en la degradación de hidrocarburos mediante una curva de velocidad de crecimiento con diesel.



**Figura 14.**

Extracción de ADN bacteriano. Análisis en un gel de agarosa.  
A (*cepa Pseudomonas aeruginosa*), B (*Pseudomonas putida*), E (*Enterobacter cloacae*),  
PM=marcador de peso molecular, Kb=kilobases.

### **10.0 Curva de crecimiento de las bacterias después de ser tratadas con naranja de acridina.**

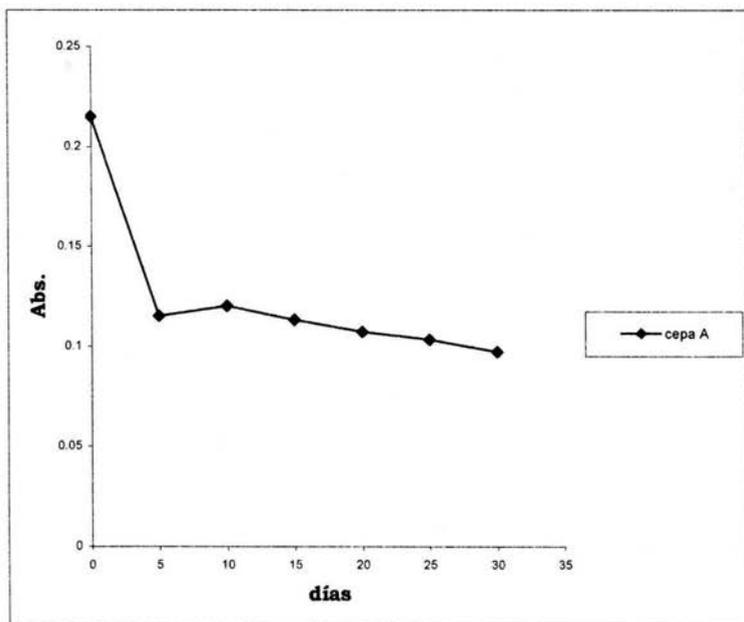
Después del tratamiento para eliminar el plásmido con naranja de acridina se realizó otra curva de crecimiento con el objeto de comprobar si el plásmido encontrado en la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (A) estaba involucrado en la degradación de hidrocarburos. Si es así, esta bacteria tendrá una velocidad de crecimiento menor al obtenido en la velocidad de crecimiento de la bacteria cuando tenía plásmido (**Figura 8**).

Se observó que sin el plásmido la velocidad de crecimiento decae considerablemente (**Tabla 18, Figura 15**).

DIA	Abs. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (A)
0	0.215
5	0.115
10	0.120
15	0.113
20	0.107
25	0.103
30	0.097

**Tabla 18.** Valores de absorbencia de *Pseudomonas aeruginosa* una vez eliminado el plásmido de la bacteria.

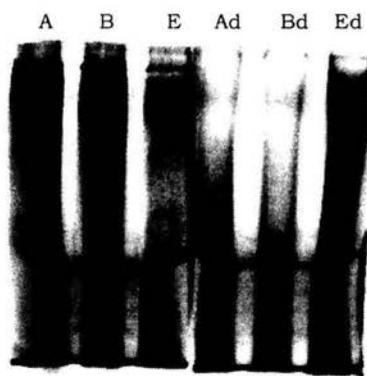
Como se puede ver en la **Figura 15**, la curva de crecimiento de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (A) es mucho menor con respecto a la gráfica de curva de crecimiento de la **Figura 8**. Esto se debe a que probablemente el plásmido que tenía la bacteria está involucrado en la degradación de hidrocarburos, ya que cuando comprobamos que la bacteria tenía plásmido, presentaba un buen crecimiento en un medio mínimo que tenía diesel como única fuente de carbono. Por lo contrario, cuando se eliminó el plásmido de la bacteria, su velocidad de crecimiento disminuyó considerablemente. Con estos resultados se puede concluir que al menos una de las funciones involucradas en la degradación de hidrocarburos está contenida en el plásmido.



**Figura 15.** Curva de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*, después del tratamiento con naranja de acridina.

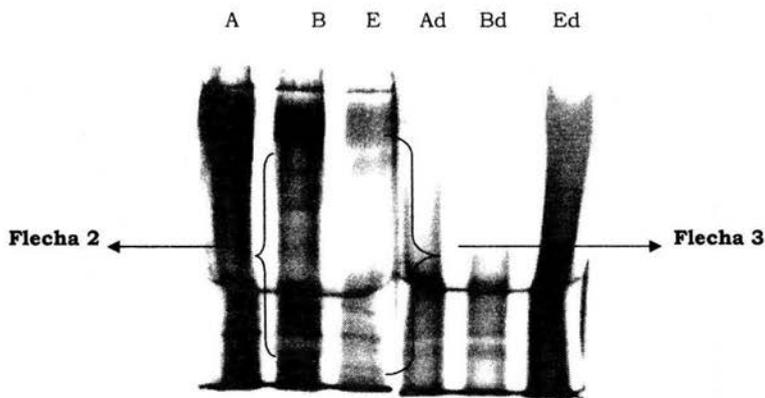
### **11.0 Extracción de proteínas totales.**

Con esta extracción de proteínas se observan las bandas formadas en electroforesis unidimensional de poliacrilamida (**Figura 16 A, B y C**). En el gel se comparan muestras bacterianas crecidas en diesel y muestras crecidas sin tener dicha sustancia, para tratar de buscar una expresión diferencial de proteínas en cepas que crecieron con diesel en comparación con aquellas que no tuvieron diesel en el medio.

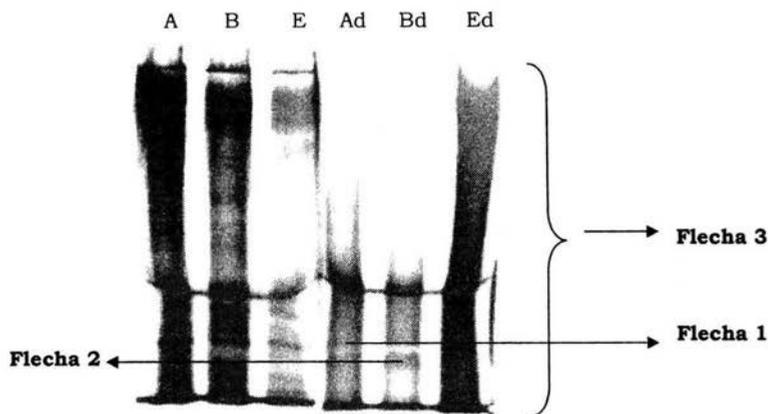


**Figura 16A.** Bandas formadas en electroforesis unidimensional (gel original)

A=*Pseudomonas aeruginosa*.  
 Ad=*Pseudomonas sp* crecida en medio mineral con diesel.  
 B=*Pseudomonas putida*.  
 Bd=*Pseudomonas putida* crecida en medio mineral con diesel.  
 E=*Enterobacter cloacae*.  
 Ed=*Enterobacter cloacae* crecida en medio mineral con diesel.



**Figura 16B.** Bandas formadas en electroforesis unidimensional (menor contraste). (abreviaturas igual que en la **Figura 16A**)



**Figura 16C.** Bandas formadas en electroforesis unidimensional (menor contraste). (abreviaturas igual que en la **Figura 16A**)

Una vez obtenido el gel fue necesario ajustarlo a diferentes contrastes con el objeto de identificar bandas que no son tan notorias a simple vista y lo que pudimos distinguir fue en *Pseudomonas aeruginosa* con respecto a *Pseudomonas aeruginosa* que estuvo en contacto con diesel (**Figura 16C**) que en el pocillo Ad se logra identificar una banda que no aparece en el pocillo A (**Flecha 1**). Por lo que respecta a *Pseudomonas putida*, ésta tiene bandas pequeñas junto con una banda que es muy notoria y gruesa que a diferencia de *Pseudomonas putida* que estuvo en contacto con diesel sólo aparece esta misma banda pero mucho mas delgada (**Flecha 2, Figura 16B y C**).

Por último, la cepa que aparentemente presentó mas cambios fue *Enterobacter cloacae* con respecto a *Enterobacter cloacae* que estuvo en contacto con diesel, ya que como se puede observar la cepa E expresa una serie de proteínas las cuales no aparecen en Ed (**Flecha 3, Figura 16B y C**).

### 12.0 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

Con este estudio lo que se intentó fue demostrar la posible resistencia que pudieran presentar estas bacterias ante antimicrobianos ya que en algunas ocasiones el plásmido que presentan las bacterias no solo les puede brindar la capacidad de degradar hidrocarburos, sino también de resistir a ciertos antibióticos.

Estos resultados se cuantificaron de acuerdo al tamaño del halo de inhibición que presentó cada bacteria, ya que a medida que el tamaño del halo se incrementa, aumenta la susceptibilidad del microorganismo al antimicrobiano y por el contrario, si el tamaño de halo es pequeño, esto nos indica que el microorganismo es resistente al antimicrobiano.

De la prueba ante antimicrobianos los resultados fueron los siguientes (**Tabla 17**).

ANTIMICROBIANO	ABREVIATURA	TAMAÑO DEL HALO MILÍMETRO (mm)
Amikacina	AK	5 mm
Ampicilina	AM	8 mm
Cefalotina	CF	10 mm
Ceftriaxona	CRO	10 mm
Cloranfenicol	CL	5 mm
Dicloxacilina	DC	3 mm
Enoxacina	ENX	11 mm
Eritromicina	E	6 mm
Gentamicina	GE	3 mm
Netilmicina	NET	4 mm
Penicilina	PE	8 mm
Tesulfametaxazol	SXT	11 mm

**Tabla 17.** Sensibilidad a diferentes antibióticos de la cepa *Pseudomonas aeruginosa*. (A)

Las bacterias *Pseudomonas putida* (B) y *Enterobacter cloacae* (E) no presentaron crecimiento alguno en los multidiscos combinados, por lo que se concluye que son sensibles a antimicrobianos.

Los resultados obtenidos en este experimento indican que muy probablemente el plásmido encontrado en la cepa *Pseudomonas aeruginosa* (A) está involucrado en la resistencia a antibióticos ya que fue la única de las tres bacterias que presentó halos de inhibición y como fue la única en presentar plásmido, podríamos concluir que este plásmido es el causante de la resistencia a antimicrobianos que presenta esta cepa. Por el contrario las cepas B y E, *Pseudomonas putida* y *Enterobacter cloacae* respectivamente, al no presentar plásmido, no presentaron resistencia alguna a los antibióticos presentes en los multidiscos ya que se observó total inhibición en el crecimiento de estas cepas.

## **VIII DISCUSIÓN.**

La finalidad de estas pruebas fue encontrar microorganismos silvestres que tengan la capacidad de degradar hidrocarburos pero, además, conocer algunas de sus características biológicas para aprovechar de esta forma al microorganismo en la biorremediación.

Al realizar la observación de la tierra nos damos cuenta que lleva mucho tiempo en contacto con el diesel, lo que nos permite suponer que si hay presencia de bacterias en ese lugar, es porque pueden tolerar los efectos tóxicos de los hidrocarburos y que existe una alta posibilidad de encontrar bacterias degradadoras.

La selección y aislamiento de las bacterias que pueden degradar hidrocarburos es difícil ya que muchas veces estas son codependientes para degradar exitosamente los hidrocarburos. Por lo tanto, hay que realizar varios ensayos poniendo a crecer al microorganismo con diesel y esperar para observar si dicha bacteria es capaz de sobrevivir con esta única fuente de carbono.

Para facilitar esto se ideó un agar que ya tuviera incorporado el diesel como fuente de carbono para que, de esta manera, no crecieran otras bacterias que no fueran las degradadoras de diesel.

Una vez que fueron seleccionadas las bacterias que presentaban un mejor crecimiento en medio mineral con diesel al 1.5%, éstas fueron identificadas mediante el uso de pruebas bioquímicas y de Tiras Api 20E, para poder conocer que especies de bacterias están involucradas en la degradación de hidrocarburos y si alguna de estas no se había reportado anteriormente. Los resultados obtenidos nos indican que solamente una sola vez se ha reportado que *Enterobacter cloacae* está involucrada en la degradación de hidrocarburos

# ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

El estudio del crecimiento de las bacterias en medio selectivo demuestra que *Pseudomonas aeruginosa* (A) crece de manera muy satisfactoria alcanzando un máximo de 2.61 nm de Abs. a 660 nm. Hay que observar que las bacterias *Pseudomonas putida* (B) y *Enterobacter cloacae* (E) también presentan una curva aceptable de crecimiento pero en comparación con *Pseudomonas aeruginosa* (A) muestran menor crecimiento. Sin embargo, estas dos últimas alcanzan un máximo de 0.8 nm y 0.7 nm de absorbencia respectivamente.

Cabe notar que la frecuencia con la que se le adiciona de nuevo diesel al cultivo es mucho mayor en *Pseudomonas aeruginosa* (A) debido a su alto grado de consumo aparente. El diesel se le vuelve a adicionar cuando al observar el cultivo no se encontraba la película inmisible de diesel flotando, y se observaban pequeñísimas burbujas en algunas orillas. Esto es un indicativo empírico de que en realidad es el diesel el que proporciona la fuente de carbono.

En especial en *Pseudomonas aeruginosa* (A), ésta comenzó a adquirir una coloración rosa salmón a partir de la segunda semana de crecimiento con diesel y a formar pequeños grumos en los que al parecer encapsulaba al diesel. También se observaba la formación de una espuma blanca en la superficie del cultivo. Se puede suponer, de acuerdo a reportes previos, que esta espuma es debida a la producción de alguna clase de biosurfactante que le permite tener mejor disposición del diesel para degradarlo. Esta pigmentación rosada se hizo presente también en las cajas de cultivo de medio mineral después de 8 horas.

Una vez observado que podían crecer en un medio mineral con diesel, se decidió averiguar cual era la concentración a la cual presentaba mayor y menor respuesta de crecimiento. Se seleccionó a *Pseudomonas aeruginosa* (A), puesto que fue la que mayor crecimiento presentó en las curvas de crecimiento iniciales (**Figura 8**). El estudio se hizo colocándola en diferentes concentraciones de diesel y el resultado de la **Figura 9** nos muestra que su

mejor crecimiento es a la concentración de diesel del 1% y a su vez a una concentración de 2.5% de diesel *Pseudomonas aeruginosa* presenta una disminución en su velocidad de crecimiento.

Posteriormente, se estudió si estas bacterias presentaban algún tipo de sinergismo. El resultado mostrado en la **Figura 10** nos indica que entre *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida* hay un sinergismo el cual da como resultado un crecimiento mayor cuando se colocan juntas en un medio mineral con diesel que cuando se colocan de manera individual.

Por lo que respecta a la extracción de ADN total, este fue un estudio preliminar llevado a cabo para tratar de saber si las bacterias presentaban o no plásmido ya que se intentó mediante una técnica de extracción de ADN total, ver si también se podría observar el ADN plasmídico. Como se mencionó anteriormente, las bacterias de origen silvestre que presentan plásmido éste es generalmente de un gran tamaño. Este sería entonces el punto de partida para poder suponer que las bacterias involucradas en este estudio tienen o no plásmido. Esto se estudió primero mediante el corte del ADN con una enzima de restricción. El resultado fueron bandas electroforéticas muy cercanas que produjeron un barrido debido a la cercanía en tamaño en los corte de ADN y, a su vez, muy probablemente del ADN plasmídico (**Figura 12**).

Posteriormente, se confirmó que una de las bacterias presentes poseía plásmido y que este probablemente estaba involucrado en la degradación de hidrocarburos y susceptibilidad a antimicrobianos. Esto es muy notorio puesto que cuando la bacteria presentaba plásmido como se observa en la **Figura 13**, su velocidad de crecimiento es alta (**Figura 8**), a diferencia de cuando fue eliminado dicho plásmido (**Figura 14**), ya que su velocidad de crecimiento fue mucho menor (**Figura 15**).

Por lo contrario, la afirmación de que el plásmido está involucrado en la susceptibilidad a antimicrobianos no es posible como la aseveración de que el plásmido está involucrado en la degradación de hidrocarburos, ya que consideramos que faltó un estudio adicional donde se evaluara la susceptibilidad a antimicrobianos de esta bacteria una vez que le fue retirado el plásmido. De esta manera, se podría tener un comparativo de antes y después de que presentara elemento genético como lo fue en el caso de la degradación de hidrocarburos donde sí se tiene este comparativo.

Por lo que respecta a la extracción de proteínas totales se intentó demostrar si se presentaba una expresión diferencial de proteínas entre bacterias que no habían estado creciendo con diesel contra bacterias que crecían con dicho hidrocarburo como única fuente de carbono. Los resultados preliminares parecerían sugerir que no presentan cambio en su expresión de proteínas (**Figura 16A**), pero manejando esta imagen a diferentes contrastes pudimos observar una expresión diferencial de algunas proteínas lo que nos sugiere que efectivamente, el estar en contacto con agentes externos promueve la expresión de proteínas que la bacteria no presentaría en condiciones naturales favorables.

## **IX CONCLUSIONES.**

Aunque desde hace muchos años existían indicios de la complejidad ecológica, bioquímica y molecular microbiana, no es sino hasta recientemente que estamos adquiriendo clara conciencia de la enorme cantidad de recursos bioquímicos que están esperando ser descubiertos.

Las bacterias examinadas en nuestro estudio resultaron ser bacilos Gram-negativos, como lo son la gran mayoría de los microorganismos involucrados en biorremediación que se encuentran en el medio ambiente

Por las pruebas de identificación que se realizaron se concluye que las bacterias con la que se trabajó en nuestro estudio son:

Denominada	Identificación
A	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
B	<i>Pseudomonas putida</i>
E	<i>Enterobacter cloacae</i>

Por los resultados obtenidos podemos concluir que las bacterias nativas aisladas de zonas contaminadas con hidrocarburos del estado de Veracruz tienen la capacidad de degradar diesel como fuente de carbono, debido a que presentan una velocidad de crecimiento adecuado en presencia del hidrocarburo.

Se concluye que la concentración de hidrocarburo a la cual *Pseudomonas aeruginosa* (A) presenta mejor crecimiento es al 1% de diesel.

Se logró comprobar el efecto de sinergismo que presentan estas bacterias puesto que en el estudio de velocidad de crecimiento de manera conjunta tanto *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida*, su crecimiento se vio considerablemente favorecido con respecto a su velocidad de crecimiento de manera individual.

Se logró identificar la capacidad fenotípica que le proporciona el ADN plasmídico a *Pseudomonas aeruginosa*, ya que una vez que se le retiró el plásmido, se volvió a evaluar su velocidad de crecimiento y el resultado fue que ésta ya no tuvo el mismo crecimiento que presentaba antes del tratamiento para eliminar el plásmido.

También suponemos que este plásmido proporciona cierta resistencia ante antimicrobianos debido a que se les hizo un estudio de susceptibilidad a los mismos y debido a que *Pseudomonas aeruginosa* era la única cepa que poseía plásmido, está presentó cierta resistencia, lo que las otras dos bacterias no presentaron, pero esto es solo una suposición ya que para estar totalmente seguros se debe evaluar su susceptibilidad a antimicrobianos después de que la bacteria no presenta plásmido.

Se pudo constatar que en contacto con diesel las bacterias expresan unas determinadas proteínas las cuales podrían estar involucradas en la degradación del diesel debido al cambio que se observó en el gel de proteínas.

Por lo que respecta a la extracción de ADN cromosómico de las bacterias este estudio nos ayudo a conocer si mediante esta técnica podríamos visualizar ADN plasmídico de alto peso molecular y así poder elegir la técnica para la extracción de ADN plasmídico adecuada. El objetivo de usar una enzima de restricción fue el conocer el tamaño aproximado de ADN de las bacterias pero debido a la cercanía en tamaño de las bandas ADN este no se pudo conocer con exactitud.

Es claro que ciertos casos de contaminación ambiental pueden ser disminuidos con la tecnología de biorremediación.

Por lo observado en las referencias, en la mayoría de las ocasiones, se requiere hacerse una evaluación de cada caso para establecer una solución específica.

La biorremediación de diferentes contaminantes deberá estar basada en el tipo de químico presente, así como el uso de microorganismos nativos de la zona y la optimización de las condiciones ambientales más importantes.

Por último, muchos de los procesos industriales que se desarrollarán en los próximos años tendrán su fundamento en recursos biotecnológicos: tendrán que ser eficientes, limpios y autosustentables. Los métodos tradicionales de biorremediación se verán beneficiados con el desarrollo de nueva tecnología. Somos testigos del renacimiento de la microbiología, con alcances sólo comparables a los de la época de oro de la segunda mitad del siglo XIX.

## **X REFERENCIAS.**

- Atlas, R.M. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol. Rev.* 45, 180-209.
- Atlas, R.M. (1988). Biodegradation of hydrocarbons in the environmental biotechnology. G.S. Omen, New York, N.Y: Plenum Press, p.214.
- Balba, M.T. AL-Awadhi, N y Al-Daher, R. (1998). Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *J. Microbiol. Methods* 32, 155-164.
- Baldi F, Ivosevic N, Miaui A, Pepi M, Fani R, Svetlicii V, Zutii V. (1999). Adhesion of *Acinetobacter Venetian* to diesel fuel droplets studied with in situ electrochemical and molecular probes. *Appl Environ Microbiol.* 65, 2041-2048 .
- Barathi S. , Vasudevan N. (2001). Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. *Environment International* 26, 413-416.
- Bingle L.E, Thomas C.M. (2001). Regulatory circuits for plasmid survival. *Curr Opin Microbiol.* Apr;4(2):194-200.
- Boopathy R. (2000). Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology* 74, 63-64.
- Burlage R.S. , Hooper SW, Saylor GS. (1989). The TOL (pWWO) catabolic plasmid. *Appl Environ Microbiol.* JUN;55(6):1323-8.
- Cerniglia C.E. (1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation.* 3, 351-368.
- Chaineau, C. H, J, Morel J. Dupont , E, Bury and J. Oudot (1999). Comparison of oil biodegradation potential of a hydrocarbon-assimilating microorganism isolated from a temperate agricultural soil. *Sci Total Environ.* 227-247.
- Chakrabarty A.M. , Chou G, Gunsalus I.C. (1973). Genetic regulation of octane dissimilation plasmid in *Pseudomonas*. *Proc Natl Acad Sci U S A .* Apr;70 (4):1137-40.
- Chapelle, F. H. (1999). Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated ground water: The perspectives of history and hydrology. 27, 122-132.
- Coates J.D. ,Anderson R.T. , Woodward J.C. , Phillips E.J.P. , Lovley D.R. (1996). Anaerobic hydrocarbon degradation in petroleum-contaminated harbor sediments under sulfate-reducing and artificially imposed iron-reducing conditions. *Environ Sci Tech.* 30, 2784-2789.
- Coates J.D. , Anderson R.T. , Lovley D.R. (1996). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons under sulfate-reducing conditions. *Appl Environ Microbiol.* 62,1099-1101.
- Cooney J (1990). Microbial Ecology and Hydrocarbon Degradation presented at the Alaska Story Symposium Cincinnati. Sept. 17-18, p.2
- Diemar H. Pieper and Walter Reineke (2000). Engineering bacteria for bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology.* 11:262-270.

Dott W; Feidieker. D; Streiof. M; Becker. PM; Kaempfer. P. (1995). Structural features associated with degradable and persistent chemicals. Biosorption and bioremediation pp. 301-316, International Biodeterioration & Biodegradation, vol. 35, no. 1-3.

Ehrlich, H.L. (1995). Geomicrobiology. Marcel Dekker, Inc. , New York, N.Y.

Ercoli, E.C., Ríos R; Gálvez J.A., Cantero J. (2001). Evaluation of biological techniques applied to the treatment of highly contaminated soils. The Society of Petroleum Engineers Latin American and Caribbean Petroleum Engineering Conference, Buenos Aires (Argentina), 25-28 Mar.

Farrel, R. , Chackrabarty, A.M (1979). Degradative plasmids. Molecular nature and mode o evolution. En K.N. timmis and A. Puhler (ed.) Plasmids of medical, environmental and commercial importance. Elsevier/North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 97-109.

Finn, RK.(1983). Use of specialized microbial strains in the treatment of industrial waste and in soil decontamination. Cornell Univ., Ithaca, NY 14853, USA Vol. 39, no. 11, pp. 1231-1235.

Guzmán, M. A.: Castro, L.; Ramos, J. R.; Valdés, C.; Medrano, L.; Vázquez, E. Bol. (2001). AMGP, XLIX, 36-46.

Hamann C. Jorg Hegemann, Armin Hildebrandt (1999). Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation genes in different soil bacteria by polymerase chain reaction and DNA hybridization. FEUMS Microbiology letters. 173 , 255-263.

Harayama S, Kok M, Neidle EL (1992). Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. Annu Rev Microbiol. 46,565-601.

Harayama S., Kishira H. , Kasai Y. , Shutsubo K., (1999). Petroleum biodegradation in marine environments. J. Molec. Microbiol. Biotechnol. 1( 1), 63-70.

[http://omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen1/ciencia2/39/html/sec\\_9.html](http://omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen1/ciencia2/39/html/sec_9.html)

<http://pemex.com/>

<http://www.imp.mx>.

Jones, W.R. (1998). Practical applications of marine bioremediation. Current Opinion in Biotechnology. 9, 300-304.

kado, C.I. ,Liu, S.T. (1981).Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. Journal of Bacteriology.143, 1365-1373.

Kastanek F; Kuncova G; Demnerova. K; Pazlarova J; Burkhard J; Maletterova Y (1995). Laboratory and pilot-scale sorption and biodegradation of polychlorinated biphenyls from ground water. Biosorption and Bioremediation.vol 35, no. 1-3, 287-300.

Koch AK, Kappeli O, Fiecheter A, Reiser J (1991). Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in Pseudomona aeruginosa mutants. J Bacteriol. 173, 4212-4219.

Leahy, J. G. and R.R. Cowell (1990). Microbial Degradation of hydrocarbons in the environment. Appl Environ Microbiol. 54, 305-315.

Lee, K and Levy E, M (1989). Biodegradation of petroleum in the Marine environment and its enhancement . Aquatic toxicology and water Quality Management J.O. Nrigau and Lacks haminarayana J.S.S (New York, N.Y: John Wiley and sons) p. 221.

Magott, M (1996). Similar bacteria in remote oil fields. Nature 379:681

Mckee J.E. ,Laventy, F.B. Herte, R.N. (1972). Gasoline in groundwaters. Journal of the water pollution control federation. 44, 293-302.

Miller J.H. (1977). Experiments in molecular genetics. ed. Cold spring Harbor laboratory, New York

Neu, TR (1996). Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces . Microbiol Rev. 60, 151-166.

Niemi, G.J. , Veith. G.D. , Regal. R.R. , Vaishnay. D.D. (1987). Environmental Toxicology and Chemistry. vol. 6, no. 7, 515-527.

Nora, K. Cañipa-Morales, Carlos A. Galán-Vidal, José A. Pérez-Ortiz y Mario A. Guzmán-Vega (2003). Clasificación de petróleos mexicanos mediante cromatografía de gases y análisis de componentes principales. Revista de la sociedad Química de México, Vol. 47, Num. 3 275-282.

Overton, E.B., Sharp, W., Roberts, P. (1994). Toxicity of petroleum. En basic Environmental toxicology. 133-153. USA.

Parkm, K. S, R. C. Sims and R.R Dupon (1990). Transformation of PAHs in soil systems. J Environ. Eng. 116, 632-641.

Pemex, 1998a. Anuario Estadístico. Gerencia corporativa de evaluación e información, petróleos Mexicanos, México.

Pemex ,1998b, en cifras petróleos mexicanos. Web site: <http://www.pemex.gob.mx>.

Rodríguez Vázquez y Rojas Avelizapa NG (1999). Resources conservation and recycling. 27,(1-2); 15-26 Jul.

Saadoun, I. Jordan ( 2002). Isolation and characterization of bacteria from crude petroleum oil contaminated soil and their potential to degrade diesel fuel. Journal of basic microbiology 42,(6), 420-428.

Skladany, G.J. , Meeting, F.B. (1998). Bioremediation of contaminated soil. Journal of bacteriology. 483-509.

Sedesol, 1993-1994. Informe de la situación general en materia de equilibrio ecológico y protección al ambiente. Secretaria de Desarrollo Social. Instituto Nacional de Ecología, México.

Stroo, H. (1989). Bioremediation of creosote and PCP-contaminated soils by white fungus. Hazardous Materials Control Research Institute 10th National Conference & Exhibition, Washington, DC (USA), 27-29 Nov .

Valderrama B. B. (2002) Microbiología del petróleo y sus derivados. web site: <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros>.

Van, H. ,Jonathan, D. , Ajay, S. , Owen, P. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. 67.4, 503-549.

Vazquez-Duhalt, R (2001). Environmental oil biocatalysis, in Olguin , E, J, Sánchez, G y Hernandez E. (eds) Environmental biotechnology and cleaner bioprocesses, London:2000, Taylor and Francis Publishers. 191-207.

Von Wedel RT, Mosquera SF, Goldsmith CD, Hater GR, Wong A, Fox TA, Hunt WT, Paules MS, Quiros JM, Wiegand JW (1988).Bacterial bidegradation of petroleum hydrocarbons in ground water: in situ augmented bioreclamation with enrichment isolates in California. Water Sci Technol. 20, 501-503.

Voordouw , G. S . M Armstrong , M .F .Remier, B . Fouts ., A. J Telang , Y, Shen and D. Gevetz (1996). Characterization of 16S rRNA genes from oil field microbial communities indicates the presence of a variety of sulfate-reducing, fermentative and sulfideoxidizing bacteria . Appl. Environ. Microbiol. 62, 1623-1629.

Wilson, S.C. and K.C Jones (1993). Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): Environ. Pollut. 80, 229-249.

Zaidi, B.R. , Iman, S.H. , (1999). Factors affecting micribial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene in the caribbean coastal water. Marine pollution bulletin. 8,737-742.