



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**DIVERSIDAD BACTERIANA DE AGUAS RESIDUALES AISLADAS
DE TRES PARQUES INDUSTRIALES DE LA CIUDAD DE PUEBLA Y
TOLERANCIA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE
COLORANTES Y SOLVENTES**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

SALOMÓN FUENTES CRUZ

ASESOR DE TESIS:

DRA. ROCÍO PÉREZ Y TERRÓN

FEBRERO, 2015



Agradecimientos

Agradezco a mi tutora de Tesis la Dra. Roció Pérez y Terrón por brindarme su apoyo para la realización de este proyecto por creer y confiar en mí y darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio de Biología Molecular y Genética de la BUAP. A la Profesora Alejandra de Gante por su paciencia y dedicación. A la profesora Dalia Molina por aportarme un gusto en el área de Microbiología. A mis revisoras la Dra. Yolanda Elizabeth Morales García y la M.EN.C María del Roció Bustillos Cristales, por brindarme su valioso tiempo en leer mi trabajo y brindarme valiosas observaciones que me sirvieron para complementar este trabajo.

Dedicatorias

Esta tesis es dedicada especialmente para mi mamá Cirila Cruz y mi papá Salomón Fuentes por creer en mí, brindarme su confianza y darme su apoyo incondicional en esta etapa de mi vida y que siempre estaré agradecido con ellos por siempre.

A mis hermanos por siempre apoyarme y aguantar mis cambios de ánimo tan repentinos en casa, por confiar en lo que hacía y por siempre estar a mi lado. A mis sobrinos por darme un poco de su alegría en esos momentos que estaba estresado y cansado, haciendo que se me olvidaran los malos ratos que pase.

A la Señora Carmen García por abrirme las puertas de su hogar y por dejarme ser un integrante más de su familia y por haberme hecho sentir en casa. A la familia Pérez Moreno por siempre confiar en mí, por todo lo que me dieron a lo largo de mi carrera, por su apoyo y confianza que me brindaron para cumplir mi meta. A Chufo por siempre estar ahí y regalarme sus palabras de aliento y regaños.

A mis amigos (Que saben quienes son) con los cuales inicié mi carrera y los que fui conociendo con el paso del tiempo y que fueron importantes para crear este trabajo y nunca dejarme caer, ni mucho menos rendirme, regalándome risas, experiencias, abrazos, lágrimas, enojos, palabras de apoyo (“Mejor presenta el examen CENEVAL”), “Porros” y mucha sopa de caracol.

A las personas que no creyeron en mí, que me cerraron puertas, que siempre estuvieron ahí para verme caer, les agradezco por haberme hecho ser más fuerte. A mí por darme fuerzas de seguir adelante sin importar lo que pasara, por creer que si puedo, que si me lo propongo lo hago, que si lo sueño, lo puedo alcanzar.

Sé que esto no es final, si no el comienzo de mi formación, pero con esto me deja una experiencia y un gran aprendizaje que pocos se atreven a vivir.

Y sin más que decir ¡GRACIAS!

Índice de Tablas

Tabla

1	Tipos de Estrés de las cepas aisladas de las tres zonas de estudio	22
2	Solventes y Colorantes de uso industrial a diferentes concentraciones	23
3	Número de cepas tolerantes a tres colorantes del Parque Industrial Puebla 2000	39
4	Número de cepas tolerantes a tres colorantes del Parque Industrial FINSA	40
5	Número de cepas tolerantes a tres colorantes del Parque Industrial FINSA	40
6	Número de cepas tolerantes a tres Solventes del Parque Industrial Puebla 2000	41
7	Número de cepas tolerantes a tres Solventes del Parque de La Resurrección	42
8	Número de cepas tolerantes a tres Solventes del Parque FINSA	42

Índice de Figuras

Figura		Página
1	Parque Industrial Puebla 2000	16
2	Parque Industrial de la Resurrección	17
3	Parque Industrial FINSA	18
4	Estría cruzada en medio MacConkey	19
5	Tinción de Gram	20
6	A) Citrato de Simmons B) TSI C) MIO D) LIA	21
7	Galerías API20 NE	23

Índice de Gráfica

Gráfica

1	Total de cepas aisladas de los diez muestreos por zona de estudio	26
2	Temperatura de las tres zonas de muestreo durante los diez muestreos	27
3	Media de los diez muestreos realizados para medir el pH	28
4	Prueba T-student comparativa para el crecimiento bacteriano en dos grupos como consecuencia de la temperatura del Parque Industrial Puebla 2000 (Zona 1).	29
5	Prueba T-student comparativa para el crecimiento bacteriano en dos grupos como consecuencia de la temperatura del Parque Industrial de La Resurrección (Zona 2)	30
6	Prueba T-student comparativa para el crecimiento bacteriano en dos grupos como consecuencia de la temperatura del Parque Industrial FINSA (Zona 3)	31
7	Prueba T-student comparativa para el crecimiento bacteriano en dos grupos como consecuencia del pH del Parque Industrial Puebla 2000 (Zona 1)	32
8	Prueba T-student comparativa para el crecimiento bacteriano en dos grupos como consecuencia del pH del Parque Industrial de La Resurrección (Zona 2)	33
9	Prueba T-student comparativa para el crecimiento bacteriano en dos grupos como consecuencia del pH del Parque Industrial FINSA (Zona 3)	34
10	Prueba T-student comparativa para el crecimiento bacteriano entre dos concentraciones de NaCl del Parque Industrial Puebla 2000 (Zona 1)	36

11	Prueba T-student comparativa para el crecimiento bacteriano entre dos concentraciones de NaCl del Parque Industrial de la Resurrección (Zona 2)	37
12	Prueba T-student comparativa para el crecimiento bacteriano entre dos concentraciones de NaCl del Parque Industrial FINSA (Zona 3)	38
13	Total de especies identificadas de las tres zonas de estudio	44
14	Especies bacterianas identificadas de la Zona 1	45
15	Especies bacterianas identificadas de la Zona 2	47
16	Especies bacterianas identificadas de la Zona 3	48

Abreviaturas

LB	Luria Bertani
Z1	Zona 1
Z2	Zona 2
Z3	Zona 3
µL	Microlitros
UFC	Unidad Formadora de Colonias
TSI	Agar Hierro Triple Azúcar
LIA	Agar Hierro Lisina
MIO	Movilidad Indol Ornitina
NO₃	Nitrato Potásico
PNPG	4-nitrofenil-βD-galactopiranosida
GLU	D-glucosa
PAC	Acido fenilacético
ADH	L- arginina
URE	Urea
TRP	L- Triptofano
pH	Potencial de Hidronios
NaCl	Cloruro de Sodio
Å	Absorbancia

ÍNDICE

Dedicatorias

Agradecimientos

Índice de Tablas

Índice de Figuras

Índice de Gráficas

Abreviaturas

Resumen

1

2.- INTRODUCCIÓN

2

2.1 Aguas Residuales

2

2.2 Interacción de las bacterias en Aguas Residuales

3

2.4 Estrés bacteriano

3

2.4 Estrés Físico

4

2.4.1 Efecto de la temperatura sobre el crecimiento

4

2.4.2 Efecto del pH sobre el crecimiento bacteriano

5

2.5 Estrés Químico

5

2.5.1 Efecto de la salinidad sobre el crecimiento bacteriano

5

2.6 Tolerancia a solventes y colorantes

6

2.6.1 Tolerancia bacteria a colorantes industriales

7

2.6 Taxonomía Polifásica

8

2.8 Pruebas de identificación bacteriana

8

2.8.1 Pruebas Bioquímicas

9

2.8.2 API20 NE

10

3.- ANTECEDENTES

11

4.- JUSTIFICACIÓN

13

5.- HIPÓTESIS

14

6.- OBJETIVOS	15
6.1 Objetivo General	15
6.2 Objetivos Específicos	15
7.- MATERIAL Y MÉTODOS	16
7.4 Pruebas Bioquímicas y Fenotípicas	19
7.5 Ensayos de Crecimiento bacteriano por pH y temperatura	21
7.6 Estrés Químico	22
7.7 Método API20 NE	23
7.7.1 Preparación del inóculo	23
7.7.2 Lectura e interpretación	24
7.7.3 Ensayo de Nitrato Potásico (NO ₃)	24
7.7.4 Ensayo L- Triptófano (TRP)	24
7.7.5 Ensayos de asimilación	24
7.7.6 Interpretación	24
8.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
8.1 Tolerancia bacteriana a diferentes condiciones de temperatura y pH	27
8.1.2 Efecto de la temperatura sobre el crecimiento bacteriano	27
8.1.3 Efecto del pH sobre el crecimiento bacteriano	30
8.2 Estrés químico	33
8.2.1 Efecto de la Salinidad sobre el crecimiento bacteriano	33
8.2.3 Tolerancia a Colorantes Industriales de las tres zonas de estudio	36
8.2.4 Solventes Industriales de las tres zonas de estudio	39
8.3 Identificación bacteriana	40
8.3.1 Especies identificadas de las tres zonas estudio	41
8.3.2 Especies identificadas del Parque industrial Puebla 2000	44
8.3.3 Especies identificadas del Parque industrial Puebla 2000	45
8.3.3 Especies identificadas del Parque industrial FINSA	46
9.- CONCLUSIONES	47
10.-PERSPECTIVAS	48
11.- BIBLIOGRAFÍA	49
12.- ANEXOS	54

12.1 FUNDAMENTO DE PRUEBAS BIOQUIMICA	54
12.1.1 Tinción de Gram	54
12.1.2 Catalasa	54
12.1.3 Oxidación/ Fermentación	55
12.1.4 TSI (Hierro Triple Azúcar)	55
12.1.5 Citrato de Simmons	55
12.1.6 MIO (Movilidad, Indol, Ornitina)	55
12.2 Total de Cepas de las zonas de estudio con su carga bacteriana	57
12.2. Lectura API20 NE	59

DIVERSIDAD BACTERIANA DE AGUAS RESIDUALES AISLADAS DE TRES PARQUES INDUSTRIALES DE LA CIUDAD DE PUEBLA Y TOLERANCIA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE COLORANTES Y SOLVENTES

Fuentes Cruz Salomón, xalobio90@hotmail.com

1.- Resumen

Las aguas residuales son un medio de transporte para las bacterias, virus, hongos y parásitos, procedentes de reservorios humanos o animales. Algunas bacterias como *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Mycobacterium* entre otras, son capaces de modificar sustancias químicas peligrosas, transformándolas en otras menos tóxicas. Se aislaron de aguas residuales un total de 76 cepas totales de los tres corredores industriales, el Parque Industrial Puebla 2000 presentó un mayor número de cepas aisladas con un total de 27, en comparación del Parque Industrial de la Resurrección y FINSA teniendo un total de 25 y 24 cepas respectivamente. Las cepas aisladas se sometieron a tres tipos de crecimiento a diferentes rangos: Temperatura, pH y salinidad, determinando una diferencia significativa de acuerdo con la prueba *T-student* al tener afinidad por valores bajos por temperatura a 35°C por pH a 6.0 con una carga bacteriana de 10^9 UFC/mL y en salinidad al 30% presentaron una carga bacteriana de 10^{10} UFC/mL en las tres zonas respectivamente. Se realizaron medios enriquecidos añadiendo tres tipos de colorantes (Rojo Congo, Cristal Violeta y Azul de metileno) y solventes (Dicloroetano, Benceno y Tolueno) determinando que a concentraciones 3% - 15% las 76 cepas presentaron un crecimiento, mientras que a concentraciones de 30% inhibieron su crecimiento un total de 26 cepas. La concentración al 50% de colorantes y solventes se mantuvo un total de 50 cepas resistentes con un crecimiento normal al incubar a 27°C por un periodo de 24 hrs. Las 50 cepas resistentes se identificaron con el sistema AP20 NE teniendo un total de 12 especies identificadas: *Pseudomonas aeruginosa* (30%), *Pseudomonas fluorescens* (12%), *Acinetobacter baumannii* (16%), *Sphingomonas paucimobilis* (12%), *Aeromonas hydrophila* (12%), *Burkholderia cepacia* (4%), *Burkholderia pseudomallei* (2%),

Stenotrophomonas maltophilia (4%), *Grimontia hollisae* (2%), *Pseudomona luteola* (2%), *Aeromonas sobria* (2%), *Pasteurella aeurogenes* (2%). Siendo *Pseudomonas aeuroginosa* y *Acinetobacter baumannii* las especies con mayor número de cepas aisladas. Siendo el Parque Industrial FINSA el que presentó el mayor número de especies identificadas con el sistema API20 NE con un total de 8 cepas.

2.- INTRODUCCIÓN

El término diversidad nos evoca frecuentemente la imagen de ecosistemas en los que abundan especies vegetales y animales, como es el caso de las selvas tropicales. Sin embargo, en nuestro planeta los organismos que presentan una mayor diversidad biológica y funcional son los microorganismos (González, 2010).

Las bacterias son microorganismos capaces de adaptarse a cualquier medio, sin embargo al no llevar un control, pueden ocasionar un severo problema con el medio ambiente (González, 2010).

2.1 Aguas Residuales

Las aguas residuales son un medio de transporte para las bacterias, virus, hongos y parásitos, procedentes de reservorios humanos o animales. En general estos microorganismos son de origen fecal y con un nivel de patogenicidad elevado. La diversidad microbiana que existe en las aguas residuales ha causado enfermedades gastrointestinales y de vías respiratorias, ya que las bacterias han logrado un nivel de adaptación y resistencia a diferentes antibióticos, solventes y colorantes, originado por mutación genética (Guo, Z, 2006).

El agua resulta indispensable para la salud y el bienestar humano, así como para la preservación del medio ambiente. Además de ser una sustancia imprescindible para la vida, por sus múltiples propiedades, es ampliamente utilizada en actividades diarias como la principal fuente de energía eléctrica. También resulta indispensable para la agricultura y forma parte de numerosos procesos industriales (ONU, 2011).

Aunque la industrialización es un elemento esencial del crecimiento económico en los países en desarrollo, la actividad industrial puede tener también consecuencias negativas sobre la salud ambiental, como resultado de la

liberación de contaminación en el aire y el agua y de la eliminación de los residuos peligrosos (Lenski, 2012).

La eliminación inadecuada y a menudo negligente de los residuos industriales, y el vertido incontrolado tanto a los cursos de agua y de suelo han ocasionado un foco de infección que puede causar diferentes enfermedades, por el mal manejo y por no establecer los límites permisibles de contaminantes para las aguas residuales, así como lo indican la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM 003 SEMARNAT 1997.

2.2 Interacción de las bacterias en Aguas residuales

Algunas bacterias como *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Mycobacterium* entre otras, son capaces de modificar sustancias químicas peligrosas, transformándolas en otras menos tóxicas (Osorio, 2011).

Entre los factores biológicos que constituyen un recurso importante en la eliminación de contaminantes se encuentran, la diversidad de especies microbianas y sus capacidades metabólicas (Martínez, 2005); sin embargo, los ambientes marinos contaminados están habitados por microorganismos capaces de tolerarlos (Mashreghi, 2005).

2.3 Estrés bacteriano

El estrés es una situación que condiciona a cambios en la bacteria, normalmente este es un estado transitorio que le permite tener condiciones de resistencia a una situación no favorable para su crecimiento, lo que finaliza cuando las condiciones de estrés se eliminan (Mukamolova G, 2003).

2.4 Estrés Físico

2.4.1 Efecto de la temperatura sobre el crecimiento

La temperatura de incubación afecta drásticamente la tasa de crecimiento de las bacterias debido a que influye en su actividad enzimática. Cada microorganismo tiene una temperatura óptima para su crecimiento, casi siempre relacionada con la temperatura de su hábitat (Marchand, 2002).

Para cada microorganismo se ha definido una temperatura mínima, por debajo de la cual no crece; más aún, a bajas temperaturas (0°C o inferiores) el metabolismo cesa por disminución de la actividad enzimática y porque el agua, que puede estar cristalizada, no permite llevar a cabo reacciones metabólicas, el ingreso de nutrientes ni la eliminación de desechos. (Romero, 2007). Se puede explicar en función de un descenso de la fluidez de la membrana, de modo que se disminuyen los procesos de transporte de nutrientes y el gradiente de protones.

También se ha definido una temperatura máxima, sobre la cual las bacterias tampoco crecen e incluso puede ocurrir la desnaturalización e inactivación de proteínas enzimáticas esenciales, de la membrana citoplasmática y a veces lisis térmica de la bacteria que provocan muerte celular. Las bacterias cultivables crecen en un intervalo de temperatura; Con base en la temperatura óptima de crecimiento y el intervalo de temperatura en el cual se pueden desarrollar, las bacterias se dividen en cuatro categorías principales: las psicrófilas se desarrollan entre 5 y 20°C, las bajas temperaturas son las más favorables para este tipo de bacterias, las mesófilas crecen entre 5 y 47°C, cuya temperatura óptima es de 30°C - 45°C, las termófilas son organismos especializados para sobrevivir a 37°C crecen muy poco teniendo una temperatura óptima de 50-60°C y las hipertermófilas las cuales cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra estrictamente por encima de los 80°C; dentro de los procariotas, encontramos hipertermófilos tanto en Bacteria como en *Archea* siendo este último grupo en el que se encuentran en mayor número (Tortora y col., 2007).

2.4.2 Efecto del pH sobre el crecimiento bacteriano

El pH es otro de los factores determinantes para el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos. La tolerancia de las bacterias a los cambios de pH es limitada, ya que cambios bruscos pueden producir su muerte. No obstante, la mayor parte de la diversidad de las bacterias corresponde a las neutrófilas. Sin embargo, muchas bacterias neutrófilas modifican el pH del medio y resisten entornos relativamente ácidos o alcalinos, como lo son algunas bacterias fermentativas que excretan ácidos, mientras otras alcalinizan el medio, produciendo amonio a partir de desaminación de aminoácidos (Sundberg, 2004).

Aunque los microorganismos pueden crecer en un margen más o menos amplio de pH (alrededor de un óptimo), los cambios bruscos pueden ser lesivos afectando a la membrana y al transporte de solutos, e inhibiendo enzimas. Si el pH interior cae en torno a 6 o 5.5, las bacterias inducen una respuesta de tolerancia a ácidos, consistente en ATPasas translocadoras de protones (expulsan protones al exterior) y chaperonas (proteínas celadoras) para corregir las proteínas desnaturalizadas (Buchanan, 1992).

2.7 Estrés Químico

2.5.1 Efecto de la salinidad sobre el crecimiento bacteriano

Las habitas salinos son aquellos hábitats con elevadas concentraciones de cloruro de sodio u otras sales; estos hábitats están colonizados por una gran diversidad de comunidades microbianas, apropiados para el crecimiento de microorganismos llamados halófilos. Estos microorganismos son capaces de tolerar satisfactoriamente a la deshidratación y resistencia a la desnaturalización proteínica causada por la sal (Zahran, 1997).

Por tanto las bacterias pueden tener un crecimiento óptimo en ambientes moderados de cloruro de sodio, pero al alterar su estado, es decir al aumentar la concentración de cloruro de sodio pueden provocar la muerte celular. La mayoría de estas bacterias se encuentran en mares y aguas termales con alta concentración salina (Yeon, 2005).

Las bacterias halotolerantes poseen múltiples aplicaciones biotecnológicas como la producción de enzimas, aminoácidos, exopolisacáridos, entre otros. No obstante, de todas estas, la producción de enzimas es el área más promisoría, pues estas bacterias poseen características como mantener estabilidad a altas concentraciones salinas lo que con lleva a una versatilidad de uso y bajo riesgo de contaminación durante su cultivo, que en conjunto favorecen su escalamiento a nivel industrial (Márquez, 1998).

2.8 Tolerancia a solventes y colorantes

2.6.1 Tolerancia bacteria a colorantes industriales

La industria textil es una de las más importantes; Sin embargo, es una de las industrias con mayor consumo de agua y las aguas residuales que se generan contienen un gran número de contaminantes de diferente naturaleza. Entre los contaminantes se destacan los colorantes. Estos compuestos se diseñan para ser altamente resistentes, incluso a la degradación microbiana, por lo que son difíciles de eliminar en las plantas de tratamiento convencionales (Díaz y col., 2007).

Los colorantes están formados por un grupo de átomos responsables del color (cromóforos). Los grupos cromóforos más comunes son los azo (-N=N-), carbonilo (C=O), metilo (-CH₃), nitro y grupos quinoides. Además de clasificarse por su grupo cromóforo, los colorantes también se clasifican de acuerdo a su aplicación: directos, reactivos, dispersos, entre otros (Christie, 2001).

Algunas causas de la toxicidad acuática son las sales como NaCl y Na₂SO₄ (provenientes del teñido), agentes surfactantes como fenoles, metales pesados, que están presentes en los colorantes, son compuestos orgánicos como solventes clorados (provenientes del lavado y la limpieza de máquinas), biocidas como el pentaclorofenol (proveniente de fibra de lana contaminada) y aniones tóxicos como el sulfuro (presente en algunos colorantes), entre otros (Bae y col., 2005).

Dependiendo del tipo de colorante, se estima que del 2 al 50% de estos compuestos se desechan en las aguas residuales y se consideran como contaminantes persistentes que no pueden removerse con los métodos convencionales de tratamiento de aguas, debido a su origen y las estructuras complejas que presentan (Kuhad y *col.*, 2004; Días y *col.*, 2007 y Dos Santos).

2.6.2 Tolerancia bacteriana a solventes

Las actividades del ser humano producen un alto número de solventes químicos a partir de las ramas industriales ocasionado una alteración principalmente a los ríos o lagos donde son descargadas estas aguas residuales (Saldaña, 2002).

Las bacterias Gram negativas son un poco más tolerantes a solventes industriales que las Gram positivas ya que esto se debe a que presentan sus membranas externas que actúan como una barrera a la penetración de agentes hidrofóbicos. La acción tóxica de los solventes se debe a su capacidad de acumularse en la membrana citoplasmática, al alterar su estructura y evitar que la célula realice funciones esenciales, y de inhibir las funciones de las proteínas de membrana. Esto llevará a lisis y muerte celular (Osorio, 2011).

Varios mecanismos podrían ser responsables de la tolerancia de las Gram negativas a los solventes. Uno de ellos sería la modificación de las propiedades físicas de las membranas, como el aumento de la rigidez o la disminución de la permeabilidad. Esto se puede realizar por isomerización de ácidos grasos insaturados, modificaciones en los grupos fosfolípidos o lipopolisacáridos, cambios en la hidrofobicidad de la superficie celular. De igual manera, éstos son mecanismos de acción breve y se requieren otros de largo plazo para poder resistir la presencia del solvente (Tsuboy, 2007).

Las bacterias tolerantes a diferentes concentraciones de solventes y colorantes son de gran importancia en la actualidad. Al llevar a cabo una identificación de las especies bacterianas nos brinda un panorama para llevar a cabo procesos de biocontrol o biodegradación de compuestos tóxicos con ayuda de bacterias.

2.7 Taxonomía Polifásica

La taxonomía polifásica, surgió hace 25 años y está destinada a la integración de diferentes tipos de datos e información (fenotípica, genotípica, y filogenético) sobre los microorganismos y esencialmente indican un tipo de consenso de la taxonomía. El término "taxonomía polifásico" fue acuñado por Colwell (Colwell, R. ,1970) y se utiliza para la delimitación de los taxones en todos los niveles. Además, los términos clasificación e identificación polifásica puede ser válidamente utilizado en este contexto. La evolución reciente de la taxonomía polifásica y filogenia constituyen claramente un punto central en la taxonomía bacteriana moderna (Murray, R y col., 1970).

Generalmente la taxonomía se toma como sinónimo de la sistemática o biosistemática y esta se divide en tres partes: (1) clasificación, es decir, la disposición ordenada de los organismos en grupos taxonómicos sobre la base de similitud; (2) la nomenclatura, es decir, el etiquetado de las unidades definidas en (1); y (3) identificación de organismos desconocidos, es decir, el proceso de determinación si un organismo pertenece a una de las unidades definidas en (1) (Cowan, S, 1968.). Se necesitan de dos partes adicionales para definir completamente la biosistemática modernas: la filogenia y la genética de poblaciones. En la última década, se convirtió en general aceptación que la clasificación bacteriana debe reflejar lo más fielmente posible, las relaciones naturales entre las bacterias, que son la relación filogenética que existe entre ellas (Romaniuk, P, 1987).

En la actualidad existen varios métodos para llevar a cabo una identificación acertada de las bacterias que podemos encontrar en diferentes ambientes, tomando en cuenta caracteres fenotípicos y sus propiedades bioquímicas y metabólicas.

2.8 Pruebas de identificación bacteriana

Los esquemas tradicionales de identificación fenotípica bacteriana se basan en las características observables de las bacterias, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas. Algunas de estas

pruebas son técnicas rápidas, ya que evalúan la presencia de una enzima preformada y su lectura varía entre unos segundos hasta unas pocas horas. Otras pruebas requieren para su lectura el crecimiento del microorganismo con una incubación previa de 18 a 48 hrs; a este grupo pertenecen la mayoría de las pruebas que detectan componentes metabólicos, o aquellas que determinan la sensibilidad de un microorganismo a una sustancia dada, tras cultivo en medios de identificación que contienen el sustrato a metabolizar. No obstante, algunas de estas pruebas pueden realizarse de forma rápida tras incubación de unas 2 a 6 hrs; en general, se trata de reacciones enzimáticas criogénicas o pruebas convencionales modificadas (Murray, 2002)

Conocer el metabolismo que llevan a cabo las bacterias es de gran importancia, ya que no todas las especies bacterianas llevan las mismas actividades enzimáticas, esta característica nos ayuda a determinar una identificación dependiendo de sus caracteres metabólicos.

2.8.1 Pruebas Bioquímicas

La identificación definitiva de una especie requiere entre otras, de pruebas bioquímicas, lo que nos permite conocer las actividades metabólicas y enzimáticas de los microorganismos y así mismo la clasificación de bacterias. Generalmente llevan incorporado un indicador de color que vira dependiendo si el pH del producto metabólico final es ácido o alcalino (Walker, 2002)

Es posible conocer las características metabólicas de los microorganismos por su inoculación en medios de cultivos, con diversos sustratos, que puedan ser utilizados como fuentes de energía, carbono, donadores de electrones, así como de otros nutrientes esenciales necesarios para su crecimiento. Existen numerosas pruebas bioquímicas con medios de cultivo adicionados de indicadores de pH como se a mencionado, para detectar la producción de ácido, con inhibidores selectivos como bilis, cianuro o con colorantes, sulfuros, etc., que facilitan la determinación de diferentes actividades metabólicas. Las actividades que se evalúan con mayor frecuencia son: capacidad para fermentar carbohidratos (glucosa, lactosa, sacarosa, etc.), para catabolizar

aminoácidos y urea, la producción de enzimas hidrolíticas específicas de tipo endo o exo como oxidasas, reductasas, amilasas, lipasas, etcétera. Por la importancia que tienen estas pruebas bioquímicas para la identificación de especies bacterianas en áreas de alimentos, clínica y ambiental, se han desarrollado sistemas bioquímicos miniaturizados (Api), Micro ID, Microgen que se realizan en forma más rápida y segura pero que mantienen los criterios de evaluación de las pruebas bioquímicas convencionales **ANEXO 1** (Díaz, 1999).

2.8.2 API20 NE

El sistema API 20NE facilita la identificación de bacilos Gram-negativos no exigentes no perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. La galería API 20NE consiste en 20 microtubos que contienen medios deshidratados y sustratos. Esta prueba es realizada durante periodos de 24 a 48 horas para tener una lectura correcta, basado en la coloración y turbidez que presente cada microtubo. Los microtubos de sustrato contienen pruebas de asimilación y son inoculados con un medio mínimo. Si las bacterias son capaces de utilizar los correspondientes sustratos, entonces van a tener un crecimiento. Las lecturas se reportaran como positivas (+) o negativas (-) en esta prueba para poder introducir estos datos en la al software de la página www.apiweb.com y conocer la especie identificada con dicho sistema (BioMérieux, 2010).

3.- ANTECEDENTES

Echeverri y col., 2011 determinaron la carga bacteriana de dos sitios de muestreos del suelo-bahía de Cartagena, midiendo la absorbancia durante seis días de muestreo adicionándole diferentes concentraciones de fenol : 200 PPM (Partes Por Millón), 500 PPM y 1000 PPM a un medio enriquecido; lo que observaron una disminución de la carga bacteriana en cuanto pasaban los días del ensayo evidenciando un cambio en el crecimiento bacteriano, dando a notar que la presencia de este hidrocarburo es un factor importante para la inhibición del crecimiento bacteriano.

En el año 2012 se aislaron microorganismos de diversos ambientes en diferentes condiciones de crecimiento, con la cual cada cepa aislada fue sometida para conocer la capacidad que tiene para degradar uno de los dos colorantes a estudiar, Rojo Congo y Azul de levafix, teniendo un total de 27 cepas capaces de degradarlos siendo los géneros: *Shewanella* y *Pseudomonas* las principales en degradar 97.52 % de Rojo Congo y 100 % de Azul de levafix (**Pedraza y col., 2012**).

Se realizó un estudio en el cual caracterizaron bacterias halotolerantes aisladas de aguas termales de Tarapoto, recolectando muestras de agua durante un mes. Durante el tiempo de muestreo aislaron un total de 14 bacterias tomando en cuenta características fenotípicas y morfológicas; sometiéndolas a un estrés salino hasta 3% - 7% de NaCl, estrés térmico de 30 a 40°C y un estrés por pH entre 5,0 a 8,0. Determinando que las bacterias aisladas son halotolerantes y resistencias a diferentes pH y temperatura. Teniendo un total de 93% cepas Gram negativos y móviles con capacidad hidrolítica (**Jackelyn E Borja y col., 2014**).

En el año 2014 realizaron un estudio en biorreactores de aguas residuales y determinaron si las poblaciones microbianas juegan un papel importante en la degradación de hidrocarburos. Realizando una identificación y pruebas de ensayos de degradación de benceno preparando medios de agar nutritivo

suministrado con altas concentraciones (30% y 50%) de benceno. Midieron la Absorbancia durante un periodo de 5 días. Teniendo como resultado, un total de 32 cepas de las cuales 8 cepas fueron identificadas por pertenecer a los géneros *Pseudomonas* y *Sphingomonas*, al determinar que hay una remoción del 70 % de benceno durante un periodo de incubación de 5 días **(Vuono y col., 2014)**.

Aislaron un total de 59 cepas del género *Pseudomonas* a partir de productos cárnicos; realizaron pruebas de estrés a un pH de 5,0 a 9,0 y de temperatura 7°C a 59 °C. Observaron que *Pseudomona fragi* y *Pseudomonas fluorescens* tenían un crecimiento constante con la elevación de temperatura y pH. De acuerdo a la ecuación Gompertz la especie dominante es *P. fluorecens* mientras que *P.fragi* presento tiempos retardados en su crecimiento **(Lebert y col., 1997)**.

C-W Lee y col., 2009 caracterizaron y aislaron algunas bacterias cultivables de las aguas costeras tropicales de Malasia Penisular; Obteniendo 54 cepas durante los meses de agosto-diciembre, destacando las especies: *Pseudomonas aeuriginosa*, *Grimontia hollisae*, *Acinetobacter junni* como las más representativas del lugar. Su identificación la realizaron con pruebas API20 NE de Biomeriux, así como pruebas de tinción de Gram, catalasa, oxidasa y bioquímicas como pruebas de identificación primarias.

4.- JUSTIFICACIÓN

Actualmente debido al fuerte crecimiento demográfico que ha tenido la ciudad de Puebla, y a la gran cantidad de industrias que operan en ellas, la infraestructura para el depósito de desechos ha originado un efecto negativo al medio ambiente.

El impacto causado por el aparente manejo inadecuado de desechos industriales hace que exista un foco de infección, por las diferentes sustancias tóxicas que se evacúan de las diferentes fábricas, teniendo una diversidad bacteriana que podría llevar a cabo su crecimiento en condiciones desfavorables.

Por lo anterior el presente trabajo identificó la diversidad bacteriana que habita en los principales corredores industriales de la ciudad de Puebla; además de determinar el nivel de tolerancia a diferentes concentraciones de colorantes y solventes de usos industriales.

5.- HIPÓTESIS

Existirá una diversidad bacteriana abundante de tres parques industriales de la Ciudad de Puebla y presentarán una tolerancia a concentraciones altas de solventes y colorantes debido a su origen de aislamiento.

.

6.- OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Identificar la diversidad bacteriana que existe en aguas residuales de tres parques industriales de la ciudad de Puebla y evaluar el nivel de tolerancia a diferentes concentraciones de solventes y colorantes.

6.2 Objetivos Específicos

- Identificar la diversidad bacteriana de los Parques Industriales: Puebla 2000, La Resurrección y FINSA de la ciudad de Puebla.
- Determinar el nivel de tolerancia a tres tipos de solventes y colorantes de uso industrial.
- Evaluar la carga bacteriana a diferentes condiciones de crecimiento: pH, Temperatura y Salinidad.

7.- MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Zona de Estudio

El Estado de Puebla se localiza al centro oriente del país, cuenta con una superficie de 34,306 km². El clima en la entidad es templado. La temperatura media anual es de 17.5 °C, con una precipitación media de 1 270 mm anuales, las lluvias se presentan en verano en los meses de junio a octubre (INEGI, 2013).

Las zonas de muestreo se determinó para tres corredores industriales que se localizan en la Ciudad de de Puebla:

ZONA 1: Parque industrial Puebla 2000 (**Z1**)

Cuenta con empresas relacionadas con la fabricación de refacciones automotrices, planta tratadora de agua y bodegas de almacenamiento en su mayoría de usos textiles (**Figura 1**).



Figura 1. Parque industrial Puebla 2000

ZONA 2: Parque industrial de la Resurrección (Z2)

Esta zona se caracteriza por industrias textiles en su mayoría, industrias relacionadas con pinturas para autos, además de que la población aledaña usa una zona como relleno sanitario (**Figura 2**).



Figura 2. Parque industrial de la Resurrección

ZONA 3: Parque industrial FINSA (Z3)

La zona 3 su principal producción es la fabricación de autopartes, pintura y hojalatería, ensamblajes de autos y cuenta con plantas tratadoras de aguas residuales (**Figura 3**).

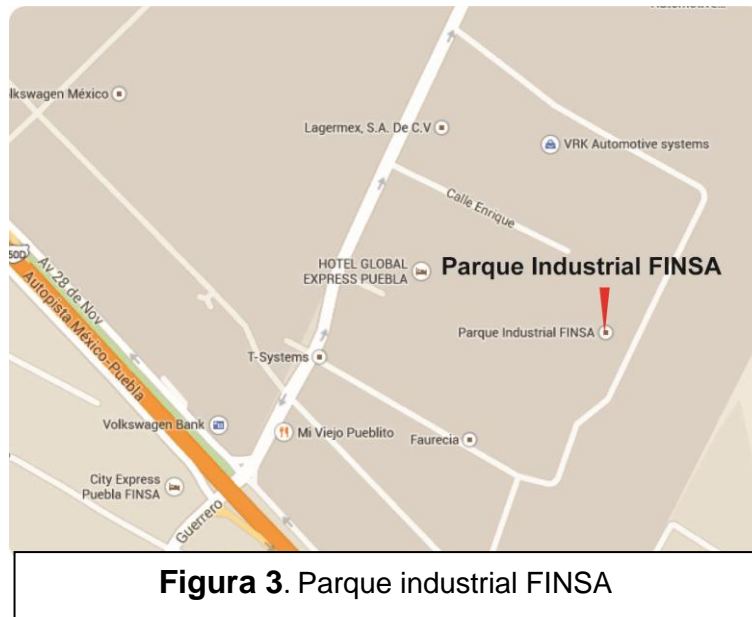


Figura 3. Parque industrial FINSA

Todas las muestras fueron recolectadas durante el periodo Enero – Febrero de 2014, llevando a cabo dos muestreos por semana, teniendo un total de 10 muestras por cada zona de estudio.

7.2 Recolección de Muestra

Para la obtención de las muestras de aguas residuales se utilizaron recipientes de plástico previamente estériles. Cada muestra fue tomada de la parte donde desembocan las tuberías de los parques industriales. Las muestras fueron etiquetadas, almacenadas y trasladadas en refrigeración para su análisis en el laboratorio.

7.3 Manejo de la Muestra

Se tomaron 100 μ L directos de la muestra de agua industrial para inocular en placa con medio LB (Luria Bertani) y medio selectivo MacConkey, sembrando mediante la técnica de estría cruzada (**Figura 4**).

Posteriormente se incubó durante un periodo de 24 horas a una temperatura de 27°C para su crecimiento.



Figura 4. Estría Cruzada en Medio de Cultivo MacConkey

Consecutivamente se aislaron las cepas que crecieron en los medios de cultivo, tomando como referencia características fenotípicas. Nuevamente se sembraron en medio de cultivo para su crecimiento como cepa pura. Para preservar cada cepa se realizó la preparación de gliceroles y se almacenaron a una temperatura de -70°C para conservarlas para las futuras pruebas.

7.4 Pruebas Bioquímicas y Fenotípicas

Al tener todas las cepas preservadas se realizaron las técnicas de identificación bacteriana, como tinción de Gram; esta tinción diferencial nos ayudara a reconocer la morfología celular bacteriana, y así poder realizar la primera aproximación para su diferenciación bacteriana (**Figura 5**); además se realizaron pruebas de catalasa y oxidasa para determinar la actividad metabólica de dichas enzimas.

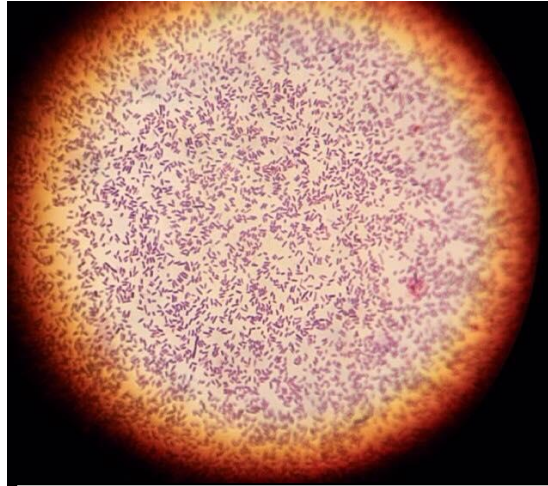


Figura 5. Tinción de Gram (Bacilos Gram -)

Todas las cepas puras fueron sometidas a prueba de movilidad directa, para ello se tomo una pequeña muestra directamente de la placa, resemebrando en medio LB líquido para incubarse durante 24 horas a una temperatura de 27°C en constante agitación a 100 RPM.

Al pasar el periodo de incubación, se tomó una alícuota de 100 μ L, colocando la muestra en un portaobjetos, para visualizarla en microscopio y observar si presentaba movilidad.

Para determinar la UFC/mL a cabo el método de conteo en placa sembrando en tubo LB estéril 2 μ L directamente de la cepa conservada en glicerol y se deja durante un periodo de 24 horas a una temperatura de 27° C.

De un cultivo de 24 horas, se realizaron diluciones seriadas con factor 1:10 , para ello se agregaron 900 ml de agua destilada estéril en un tubo eppendorf y se inoculó 100 mL de la cepa ya crecida del tubo LB; esto se realiza en serie, es decir que el tubo -1 será donde se tomara una alícuota de 100 ml para el tubo -2 posteriormente del tubo -2 será la cual se tomara una alícuota para el tubo -3, así sucesivamente hasta llegar al tubo -8.

Al tener las diluciones se sembraron en placa con medio LB, colocando por triplicado cada dilución, cada gota tendrá un volumen total de 2 μ L, esto se realizó para cada tubo eppendorf.

Se incubó a una temperatura de 27 °C durante un periodo de 24 horas. Pasando el periodo de incubación, se llevó a cabo el conteo de colonias en la dilución que se observaron visibles.

Para la cuantificación de UFC/mL se realizó con la siguiente fórmula:

$$\frac{UFC}{ml} = \left(\frac{Num. Colonias Contadas}{3} \right) \left(\frac{1}{Dilución} \right) \left(\frac{1}{Vol. Sembrado (mL)} \right)$$

Se realizaron las pruebas bioquímicas: Agar Hierro Triple Azúcar (**TSI**), Agar Hierro Lisina (**LIA**), Agar Citrato de Simmons, Movilidad Indol Ornitina (**MIO**) para determinan las actividades metabólicas y enzimáticas de las muestras (Figura 6). Estas pruebas se realizaron por triplicado para cada una de las cepas aisladas de las tres zonas de muestreo

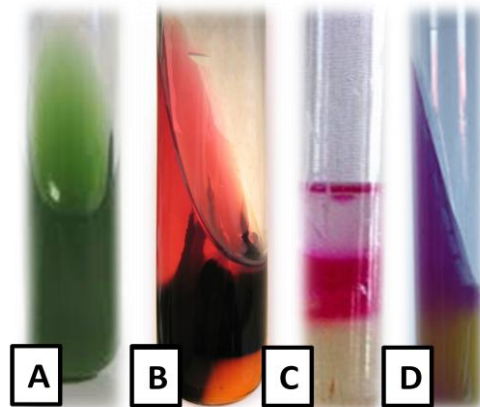


Figura 6. A) Citrato de Simmons B) TSI C) MIO D) LIA

Cada cepa se sembró en medio solido CHROMOagar orientador ya que es un medio diferencial, que nos permitió una identificación presuntiva de las cepas aisladas de acuerdo a la coloración que presentan.

7.5 Ensayos de Crecimiento bacteriano por pH y temperatura

A) Todas las cepas puras fueron puestas a prueba a diferentes tipos de estrés por triplicado para reconocer su resistencia, sembrando en medio LB líquido cada muestra para ver si presentan un crecimiento a diferentes rangos de estrés como se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Tipos de estrés de las cepas aisladas de las tres zonas de muestreo

Estrés	Rango
Temperatura	35°C - 40°C
pH	6.5 -7.5

7.8 Estrés Químico

B) Se prepararon medios con agar nutritivo en placa agregando los solventes y colorantes a diferentes concentraciones, cada cepa fue estriada en el medio de cultivo, para observar si existe un crecimiento o una inhibición en el medio incubando a una temperatura de 27 °C durante 24 horas **Tabla 2**.

Tabla 2. Solventes y Colorantes de uso industria a diferentes concentraciones

% de Concentración para Colorantes y Solventes	Colorantes
3	Rojo Congo
5	Azul de Metileno
10	Cristal Violeta
15	Solventes
30	Tolueno
50	Benceno
	Dicloroetanol
30%-50%	NaCl

Al realizar la prueba de crecimiento de los medios con colorantes y solventes, se seleccionaron las cepas que presentaron crecimiento a concentraciones >30% y así poder identificarlas con ayuda del sistema de identificación API 20 NE.

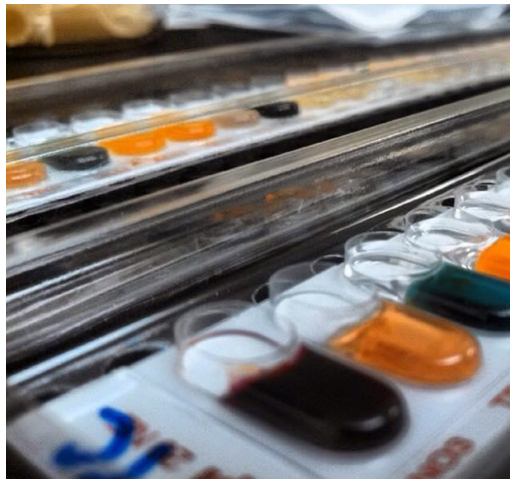


Figura 7. Galería API20 NE

7.7 Método API20 NE

Las cepas se incuban en medio LB líquido se dejan incubar durante un periodo de 24 horas a una temperatura de 27 °C; Posteriormente se prepara una cámara húmeda para colocar la galería API.

7.7.1 Preparación del inóculo

Se abre un ampolleta de API NaCl 0.85% y se colocan 2 ml en el medio LB líquido con el crecimiento de la bacteriana; se rellenan los tubos desde el NO₃ (Nitrato Potásico) al PNPG (4-nitrofenil-βD-galactopiranosida) con ayuda de una pipeta sin formar burbujas en los tubos. Utilizando una ampolleta API AUX Medium se transfiere 200 μL al medio LB líquido,

Al igual se tienen que rellenan de GLU (D-glucosa) al PAC (Ácido fenilacético) pero estos medios deshidratados se tienen que rellenan las cúpulas y los tubos de forma completa. Se rellenan con glicerol las cúpulas GLU, ADH (L-

arginina), URE (urea) únicamente. Al finalizar se cierra la cámara de incubación e incubar a 27°C durante 24-48 horas.

7.7.2 Lectura e interpretación

Después de la incubación, la lectura de las galerías debe realizarse con ayuda de las hojas de resultados. El revelado de los ensayos NO₃ (Nitrato Potásico) y TRP (L- triptófano) debe realizarse poniendo los reactivos correspondientes para su lectura.

7.7.3 Ensayo de Nitrato Potásico (NO₃)

Añadir una gota del reactivo NIT 1 y NIT 2 en la cúpula NO₃, pasado 5 minutos la coloración nos indicara si es prueba positiva o negativa.

7.7.4 Ensayo L- Triptofano (TRP)

Se añade una gota del reactivo de JAMES, el cambio de coloración es inmediato y nos indicara una prueba positiva o negativa como resultado.

7.7.5 Ensayos de asimilación

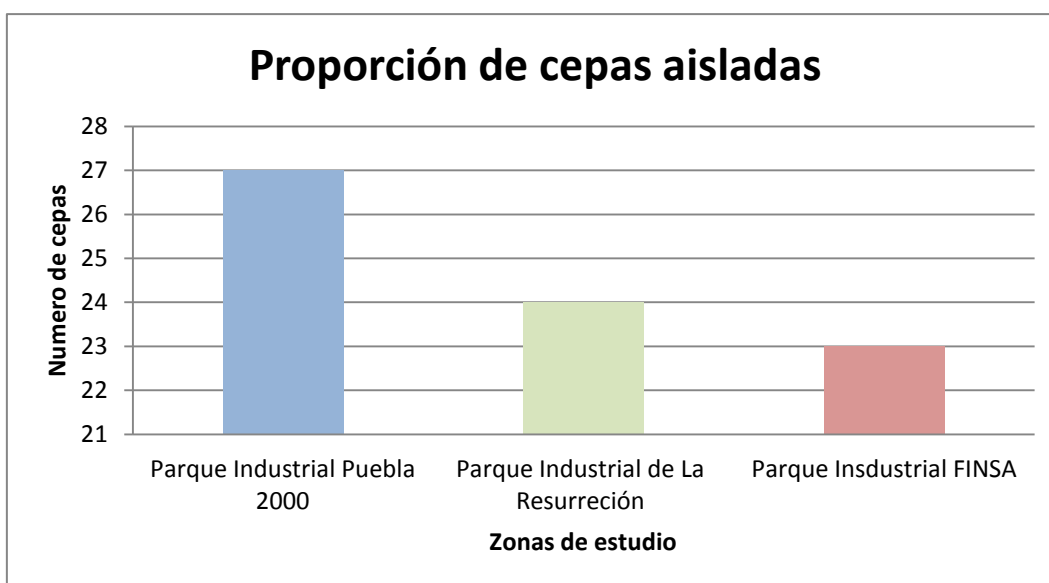
Se observa el crecimiento bacteriano para dar a conocer si es prueba negativa no presenta una turbidez, si es prueba positiva presentara turbidez. Este ensayo tiene que dejarse durante un periodo de 24 a 48 horas de incubación.

7.7.6 Interpretación

La identificación se obtiene a partir de un perfil numérico dependiendo si la prueba es positiva se sumaran, si la prueba es negativa los valores numéricos no se tomaran en cuenta, estos datos se registraran en la hoja de resultados que vienen incluido en el kit 25 Test de BioMérieux serán capturados e interpretados en el software apiweb™.

8.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El tratamiento de aguas industriales es quizá una de las operaciones más común es que debe existir en toda industria, ya sea para cumplir normas ambientales o para producir agua de calidad que pueda ser reutilizada. La eliminación de aguas residuales puede producir alteraciones ecológicas de acuerdo a los agentes químicos o las concentraciones de contaminantes que contenga.

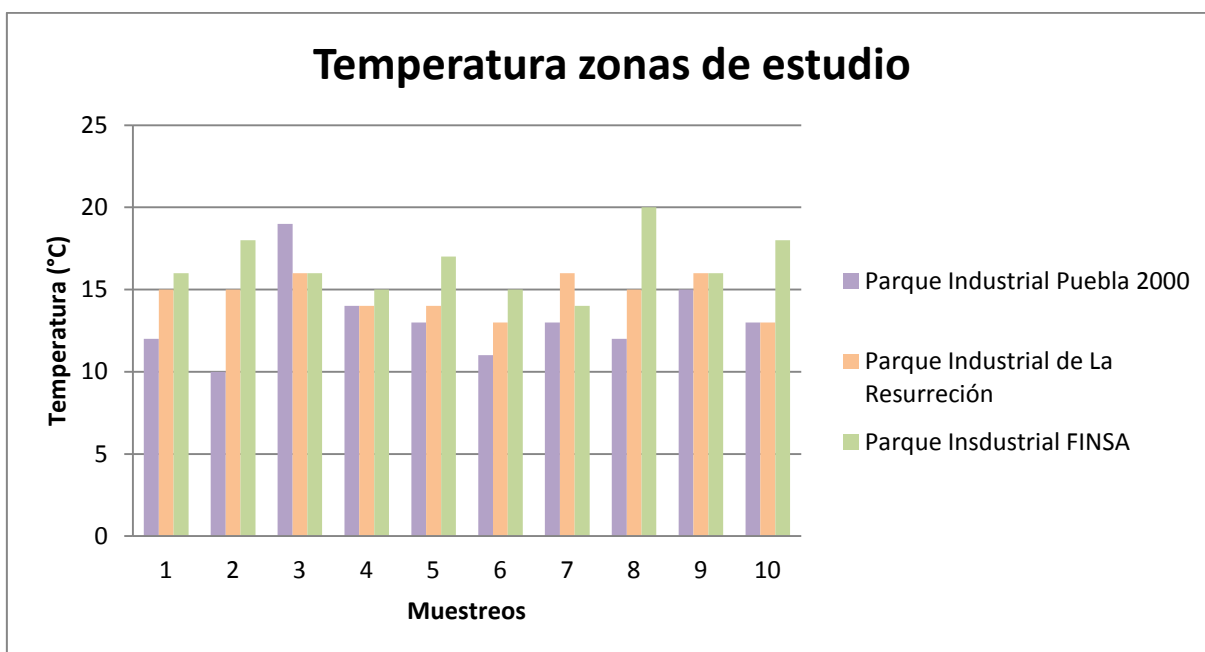


Gráfica 1. Total de cepas aisladas de los diez muestreos por zona de estudio.

Los resultados de este estudio muestran un total de 76 cepas totales de las tres zonas de estudio en aguas residuales; en el parque industrial Puebla 2000 (Z1) se aislaron un total de 27 cepas siendo esta zona la de mayor número en comparación con el parque industrial de la Resurrección (Z2) y FINSA (Z3), con un total de 24 y 23 cepas respectivamente; de acuerdo a las características de un corredor industrial, se sabe que algunas bacterias aisladas de este tipo de ambientes suelen ser patógenas para el humano, además de ser posiblemente de la formación de espuma como un indicador de contaminación, como lo menciona Dos-Santos en el 2007, al determinar la diversidad

bacteriana en aguas industriales en Alemania, aislando un total de 202 cepas durante un mes de muestreo.

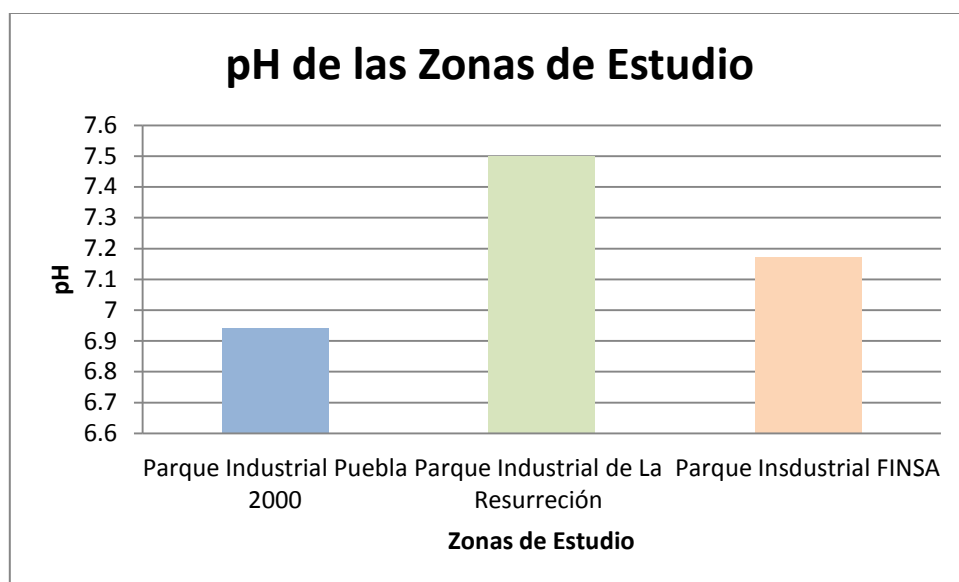
La temperatura presente en las zonas de muestreo estuvo en un rango entre 10°C y 20°C, ambas temperaturas son óptimas para el desarrollo y crecimiento bacteriano de acuerdo a lo mencionado por Hendrickx y col., en el 2012 quienes sitúan un intervalo entre 15°C a 35 °C para la mayor parte de la diversidad microbiana encontrada en aguas residuales; a temperatura alrededor de 15 °C, las bacterias productoras de metano cesan su actividad y no llevan a cabo un crecimiento, cuando la temperatura alcanza valores cercanos a los 5°C hay un crecimiento muy bajo; en el presente estudio no se obtuvo una temperatura de este rango, ya que los ensayos fueron realizados a temperatura mayor a 10 ° C.



Grafica 2. Temperaturas de las tres zonas durante los diez muestreos realizados

Las muestras de agua residual presentaron cambios constantes de pH en los muestreos realizados, presentaron un pH alcalino mayor de 7 con un 67 % total de los muestreos de las tres zonas. Pocos muestreos presentaron una

inclinación por un pH ácido de las tres zonas de estudio (33%). El pH es una magnitud de mucha importancia que permite llevar un control de la contaminación, como lo describe Amaya en 2014 aludiendo esta variable difícil de controlar, debido a la dependencia altamente no lineal entre los reactivos que ingresan al sistema, generando que el pH no se mantenga durante un periodo de tiempo.



Grafica 3. Media de los diez muestreos realizados para medir el pH

8.1 Tolerancia bacteriana a diferentes condiciones de temperatura y pH

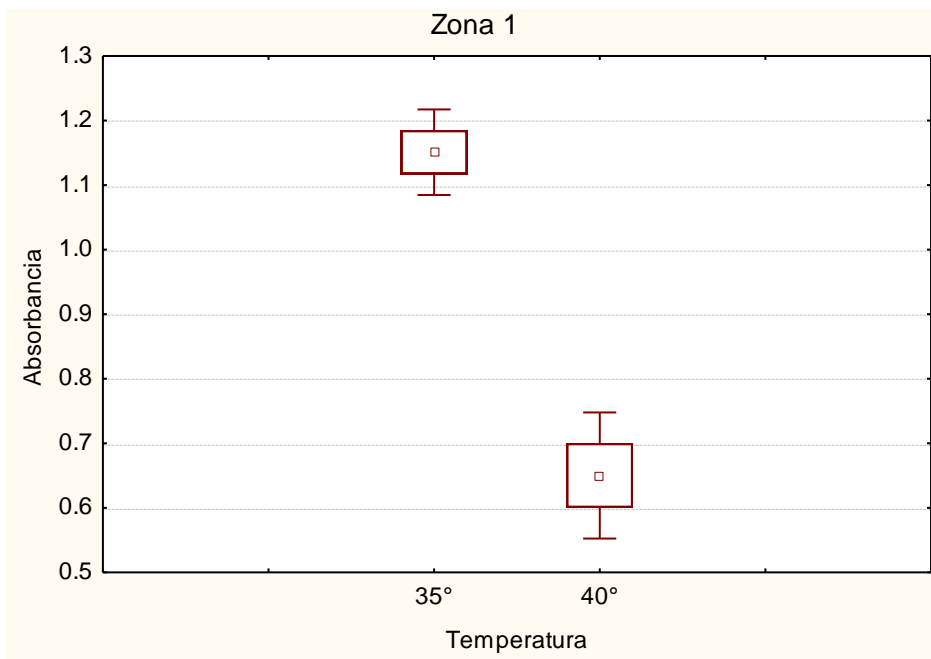
Del total de 76 cepas de las tres zonas de estudio las cuales a cada una fue sometida a los diferentes rangos de Temperatura, pH.

8.1.2 Efecto de la temperatura sobre el crecimiento bacteriano

Una vez medida la Absorbancia de cada una de las zonas, se realizó una prueba T-Student, encontrándose para las tres zonas una diferencia significativa ($p < 0.05$) para el crecimiento bacteriano entre las temperaturas de 35 °C y 40 °C (**Gráficas 4, 5 y 6**). Las cepas aisladas mostraron un crecimiento óptimo a una temperatura de 35°C presentando un comportamiento de tipo mesófilo. Al someterlas a una temperatura de 40 °C se determinó una disminución en el crecimiento, Brandi y col., 2000, Pascual y col., 2003 y Ranalli y col., en el 2000

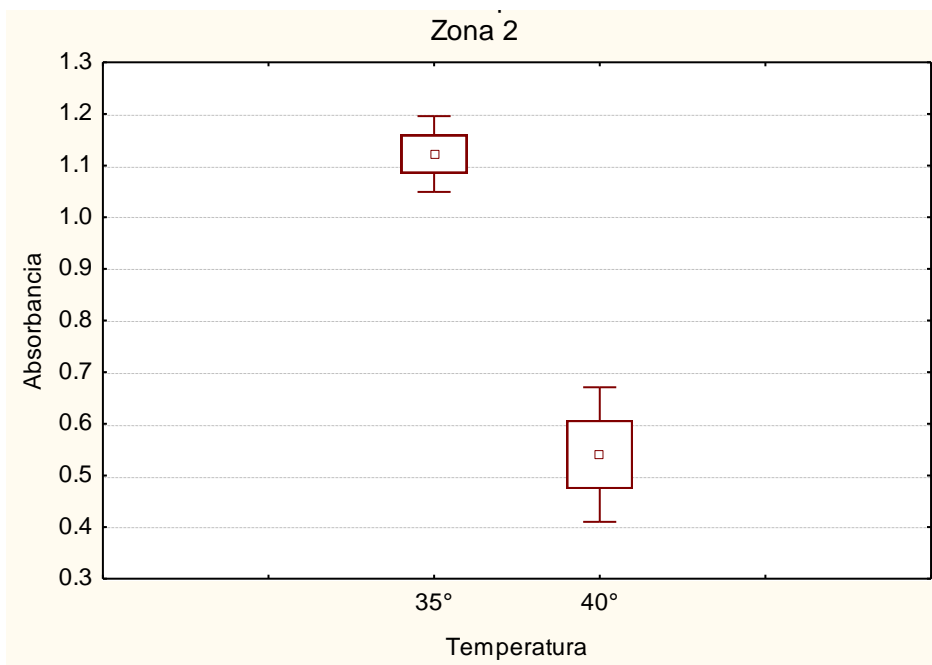
también encontraron que la mayoría de las bacterias mesófilas fueron aisladas de reactores biológicos y de depuración de agua residual mencionando que son muy comunes en estas zonas, ya que hay una afinidad a temperaturas menores de 35°C para llevar a cabo su crecimiento.

Gráfica 4. Prueba T-student comparativa para el crecimiento bacteriano en dos grupos como consecuencia de la temperatura del Parque Industrial Puebla 2000 (Zona 1)



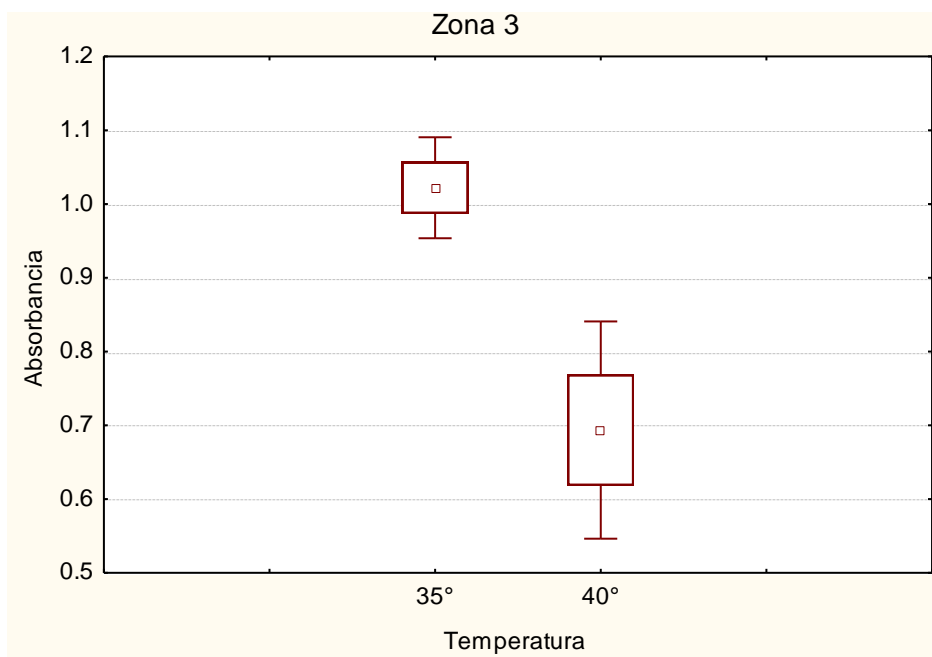
Realizando una prueba T-student para la zona 1 comparando las dos temperaturas a las que fueron sometidas las cepas, se muestra un crecimiento bacteriano con afinidad a la temperatura de 35°C, presentando una diferencia significativa ($t= 8.311845$, $p= 0.000000$, $n=26$) entre ambas temperaturas teniendo una carga bacteriana de 4×10^9 UFC/mL (1.256 \AA) en la temperatura a 35°C siendo esta la más alta de esta zona.

Gráfica 5. Prueba T-student comparativa para el crecimiento bacteriano en dos grupos como consecuencia de la temperatura del Parque Industrial de La Resurrección (Zona 2).



En la Zona 2 perteneciente al Parque Industrial de La Resurrección se observó afinidad a una temperatura 35°C se obtuvo una carga bacteriana de 5×10^9 UFC/mL (1.389 Å) a comparación de la temperatura de 40°C, presentando una diferencia significativa ($t= 7.6242.33$, $p= 0.000000$, $n=24$) entre las temperaturas sometidas.

Gráfica 6. Prueba T-student comparativa para el crecimiento bacteriano en dos grupos como consecuencia de la temperatura del Parque Industrial FINSA (Zona 3).

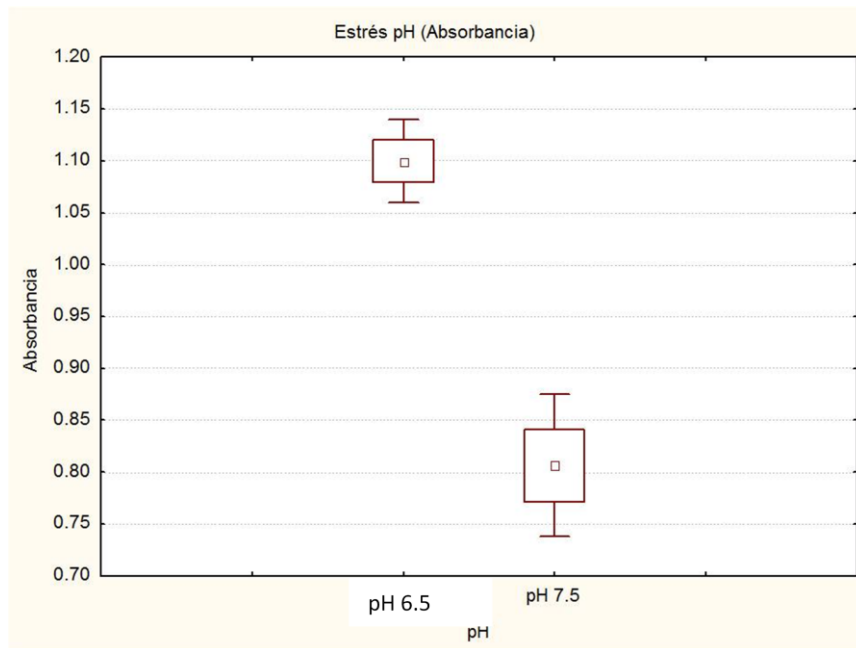


Al igual la zona 3 presentó una afinidad similar a las dos zonas anteriores por una temperatura de 35 °C con una carga bacteriana 2×10^9 UFC/mL (1.098 Å) en comparación de la temperatura de 40°C presentando una diferencia significativa ($t= 3.963383$, $p= 0.000268$, $n=23$) entre las temperaturas.

8.1.3 Efecto del pH sobre el crecimiento bacteriano

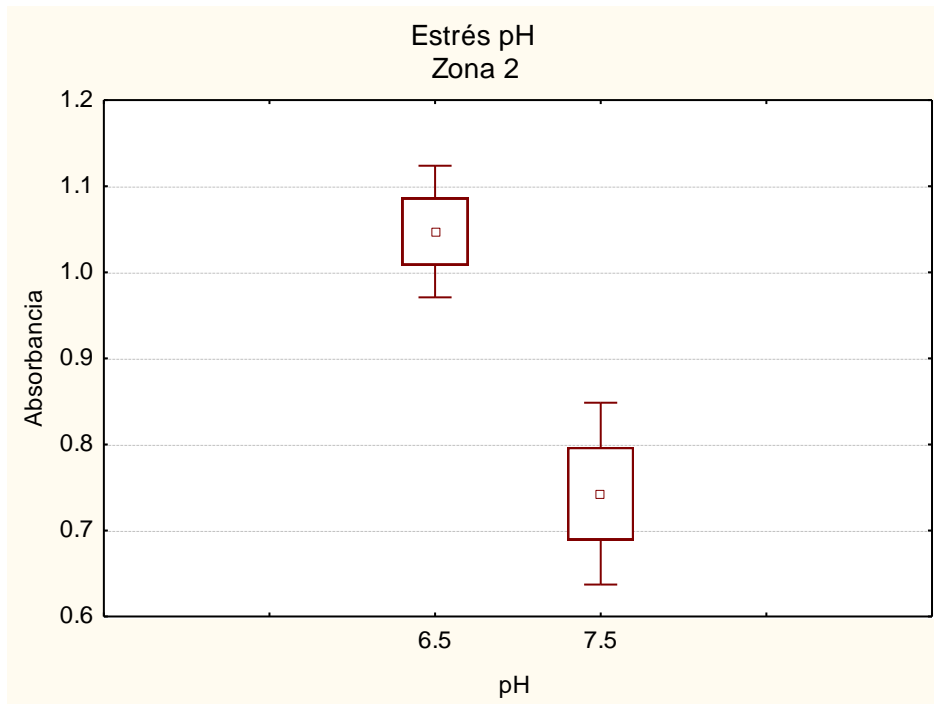
El pH es un parámetro crítico en el cultivo de microorganismos ya que algunas sólo pueden crecer en un rango estrecho, fuera de este mueren rápidamente. Las cepas en estudio fueron en su mayoría acidófilas con un porcentaje total de 75 % en las tres zonas de estudio al existir un mayor crecimiento en un pH de 6.0, a comparación de un pH de 7.5 ya que hubo crecimiento menor de acuerdo a la Absorbancia obtenida. Presentando una diferencia significativa ($p < 0.05$) para el crecimiento bacteriano entre el pH 6.0 y 7.5 de las tres zonas de estudio (**Gráfica 7,8 y 9**). Estos resultados concuerdan con los reportados por Saarela y col., en el 2004, al someter bacterias a diferentes pH 5.0, 7.5 y 8.2 aisladas de aguas residuales encontrando una afinidad por pH menor a 7 con el crecimiento de bacterias acidófilas.

Gráfica 7. Prueba T-student comparativa para el crecimiento bacteriano en dos grupos como consecuencia del pH del Parque Industrial Puebla 2000 (Zona 1)



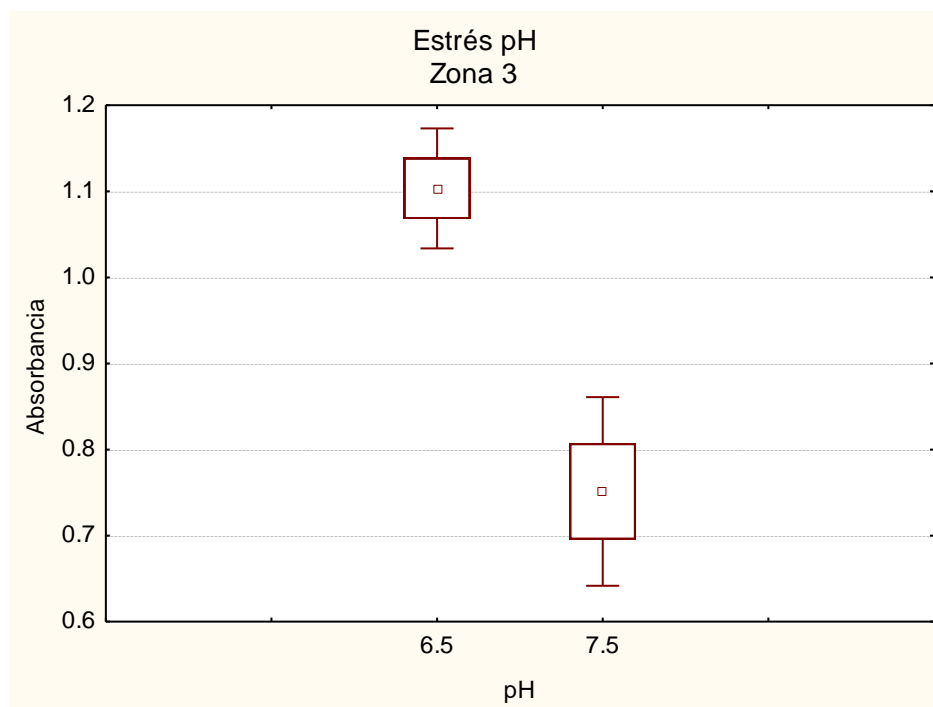
Se muestra el crecimiento bacteriano de las cepas de la Zona 1 a dos pH 6.0 y 7.5 siendo prueba significativa ($t=3.226384$, $p= 0.002213$, $n=26$). Al determinar la afinidad observando un crecimiento mayor a un pH de 6.5 con una carga bacteriana de 6×10^9 UFC/mL de acuerdo a la Absorbancia obtenida de 1.148.

Gráfica 8. Pruebas T-student comparativa para el crecimiento bacteriano en dos grupos como consecuencia del pH del Parque Industrial de La Resurrección (Zona 2).



En la zona 2 presentó una diferencia significativa ($t=4.577794$, $p= 0.000036$, $n=24$) en los rangos de pH al determinar que hay un crecimiento bacteriano mayor a pH 6.5 con una carga bacteria 4×10^9 UFC/mL (1.105Å) en comparación de un pH de 7.5

Gráfica 9. Pruebas T-student comparativa para el crecimiento bacteriano en dos grupos como consecuencia del pH del Parque Industrial FINSA (Zona 3)



El total de cepas totales de la zona 3 presento una afinidad por un pH menor de 6.5 con una Absorbancia de 1.118 teniendo una carga bacteriana de 3×10^{10} UFC/mL en comparación del pH de 7.5. Al realizar la prueba T- student presentaron una diferencia significativa ($t=5.313330$, $p= 0.000003$, $n=23$) en los rangos de pH establecidos.

8.2 Estrés químico

Existió una tolerancia a los tres tipos de estrés químicos que fueron sometidas el total de cepas aisladas de los tres corredores industriales, ya que al existir un aumento de las concentraciones presentaban una carga microbiana no alta, pero si notable de su crecimiento de acuerdo a los controles que se tomaron al inicio.

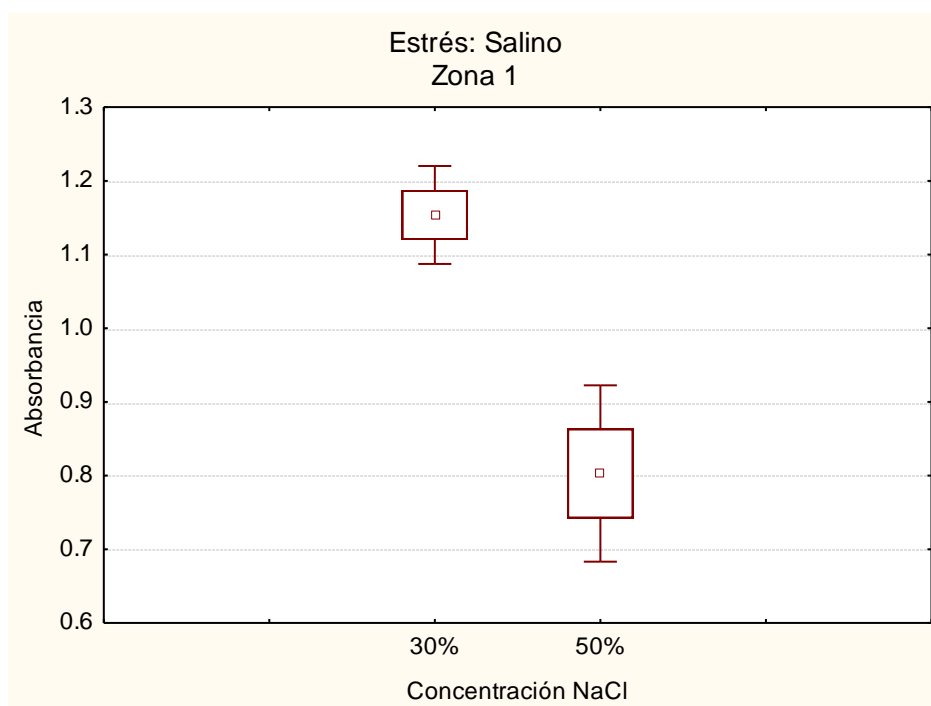
8.2.1 Efecto de la Salinidad sobre el crecimiento bacteriano

Todas las cepas presentaron un crecimiento a una concentración de 30% de NaCl en el medio inoculado, mientras que en la concentración de 50 % de NaCl hubo una disminución con respecto a la absorbancia. Peña y

colaboradores en 2002 realizaron un estudio de ensayos de estrés en aguas salinas, elevando la concentración de NaCl a un rango de 30% equivalente a 5.1 M, teniendo como resultado que las bacterias realizan mecanismos de resistencia para su crecimiento, sin que este se vea alterado probando con estos que son halófilos extremos. Nuestros resultados indican que hay una tolerancias hasta de un 40 % de de las cepas que se usaron para esta prueba, no podemos determinar si las bacterias que presentan esta afinidad son halotolerantes a concentraciones mayores de 50% (8.5 M) de NaCl ya que el 60 % de cepas no presentaron un crecimiento.

Para la respuesta a la tolerancia de estrés salino se encontró que el crecimiento bacteriano resultó significativo ($P < 0.005$) para la concentración de NaCl de 30% en comparación del grupo de NaCl 50% (**Grafica 10,11 y 12**).

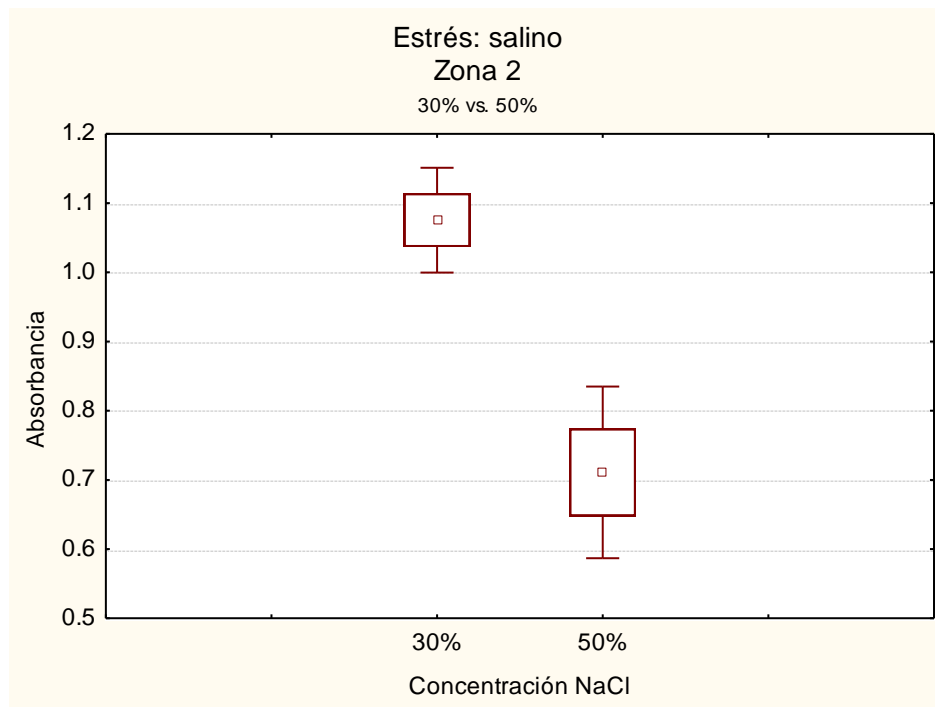
Gráfica 10. Prueba T-student comparativa para el crecimiento bacteriano entre dos concentraciones de NaCl del Parque Industrial Puebla 2000 (Zona 1)



Se muestra el crecimiento bacteriano de las cepas aisladas de la zona 1 a dos concentraciones de NaCl (30% - 50%). Prueba significativa ($t= 5.024029$,

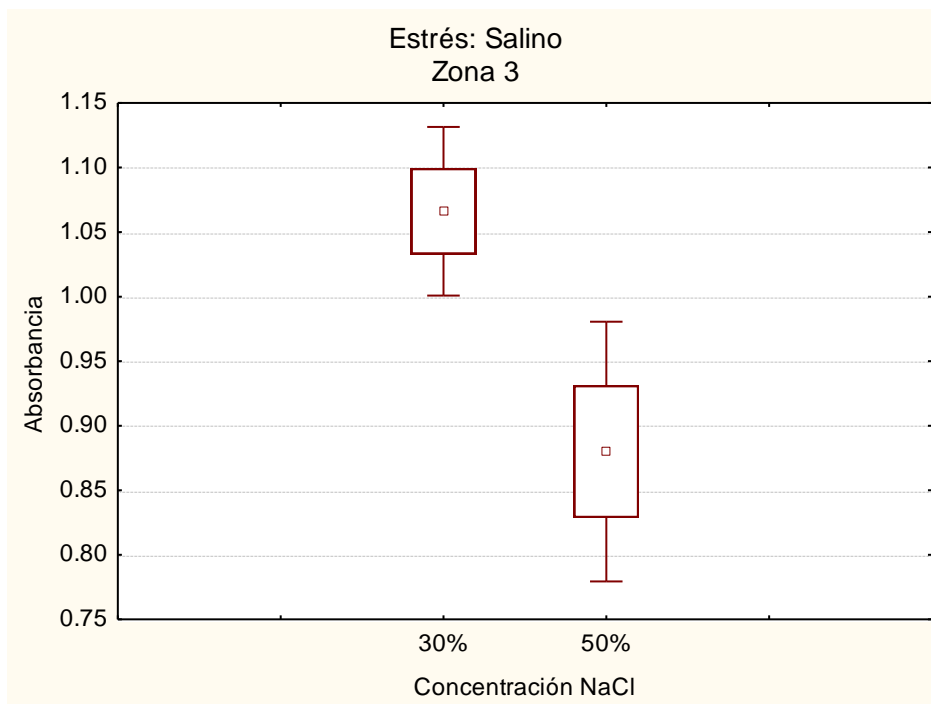
p=0.000006, n=27). Al determinar que existe un crecimiento mayor a una concentración de 30% de NaCl con una carga bacteriana 5×10^{10} UFC/mL (1.276 Å).

Gráfica 11. Prueba T-student comparativa para el crecimiento bacteriano entre dos concentraciones de NaCl del Parque Industrial de la Resurrección (Zona 2).



La zona 2 presentó una afinidad por una concentración de 30% de NaCl con una carga bacteriana de 3×10^{10} UFC/mL (1.102 Å). Siendo prueba significativa de acuerdo a la T- student (t= 4.914815, p=0.000012, n=24). Al determinar un mayor crecimiento en comparación a la concentración de 50% de NaCl.

Gráfica 12 Prueba T-student comparativa para el crecimiento bacteriano entre dos concentraciones de NaCl del Parque Industrial FINSA (Zona 3)



Para la respuesta a la tolerancia de estrés salino de la zona 3, se encontró que el crecimiento bacteriano resultó significativo ($P < 0.005$) para la concentración de NaCl de 30% con una carga bacteriana de 4×10^{10} de acuerdo a la Absorbancia de 1.114 ($t = 3.042723$, $p = 0.003945$, $n = 23$) en comparación de la concentración NaCl 50%.

8.2.3 Tolerancia a Colorantes Industriales de las tres zonas de estudio

Los medios enriquecidos con los colorantes Rojo Congo, Cristal Violeta y Azul de Metileno presentaron un crecimiento a concentraciones al 3%, 5%, 10% y 15% en las tres zonas de estudio.

En el Parque industrial Puebla 2000 (**Z1**) se obtuvieron 27 (100%) cepas presentaron una tolerancia a los colorantes a concentraciones menores del

15% seguían presentando una tolerancia a los colorantes. A concentraciones de 30 % de Rojo Congo se obtuvieron 85.1 % cepas, Azul de Metileno 81.4% de cepas y con el mismo porcentaje Cristal Violeta Posteriormente a concentraciones de 50% hubo un descenso en el número de cepas tolerantes; en Rojo Congo y Cristal Violeta presentaron 18.5 % cepas y Azul de Metileno 22.2%. Solo el 59.2 % de cepas fueron tolerantes para los tres tipos de colorantes de la Zona 1 (**Tabla 3**).

Tabla 3. Número de cepas tolerantes a tres colorantes del Parque Industrial Puebla 2000

Colorantes	[3%,5%,10%,15%]	[30%]	50%
Rojo Congo	27	23	5
Azul de Metileno	27	22	6
Cristal violeta	27	22	5

La zona 2 perteneciente al Parque Industrial de La Resurrección se aislaron un total de 24 cepas a concentracion de 3% a 15%. Se observó una tolerancia en su crecimiento; al aumentar la concentracion a 30% de los tres colorantes solo quedaron 58.3% cepas de Rojo Congo, 54.1% cepas de Azul de Metileno al igual que en el colorantes Cristal Violeta. A una concentración de 50%, el colorante Azul de Metileno fue el que presento un mayor numero de cepas tolerantes con un porcentaje total de 29.1%, en comparación de Rojo Congo que solo toleraron 16.6% y Cristal Violeta solo el 12.5% de cepas.

Solo el 51.8% de cepas totales fueron resistentes a los tres colorantes a una concentracion del 50% en la Zona 2 (**Tabla 4**).

Tabla 4. Número de cepas tolerantes a tres colorantes del Parque Industrial de La Resurrección

Colorantes	[3%,5%,10%,15%]	[30%]	50%
Rojo Congo	24	14	4
Azul de Metileno	24	13	7
Cristal violeta	24	13	3

Por último se utilizaron los mismo colorantes y las mismas concentraciones de la Zona 1 y 2 para el Parque Industrial FINSA. Se aislaron un total de 23 cepas a concentraciones menores del 15% hubo una tolerancia en el crecimiento. Asi como paso en las zonas de estudio anteriores hubo una descenso en el número de cepas a una concentracion de 30%. En el colorante Rojo Congo 78.2%, Azul de Metileno 65.2% y Cristal violeta 56.5% de cepas totales. A 50% de concentracion de los tres colorantes se obtuvo un porcentaje total de cepa : 21.7% de Rojo Congo, 17.3% de Azul de Metileno y 26% de Cristal Violeta. Solo el 65.2 % de cepas totales fueron resistentes a 50% de concentracion de los tres colorantes aplicados **Tabla 5.**

Tabla 5. Número de cepas tolerantes a tres colorantes del Parque Industrial del Parque FINSA

Colorantes	[3%,5%,10%,15%]	[30%]	50%
Rojo Congo	23	18	5
Azul de Metileno	23	15	4
Cristal violeta	23	13	6

Al ir aumentando la concentración de los tres colorantes, varias cepas aisladas presentaron una inhibición total de su crecimiento, quedando un total de 50 cepas

resistentes a los tres tipos de colorantes. Genc N en 2004 utilizaron los colorantes Rojo Congo y Azul Levafix para conocer la resistencia y la degradación de dichos colorantes, aislando un total de 35 cepas de aguas residuales de una industria textil, determinando que bacterias aisladas de un medio donde se encuentran una diversidad de colorantes su nivel de tolerancia es alto al resistir concentraciones de 30 %, debido a su capacidad de adaptación. La degradación fue 75 % y su resistencia se debe a la ausencia del grupo cromóforo, esta ausencia del grupo se debe a la previa ruptura del grupo azo que es característica de estos colorantes. Comprobando que la amplia diversidad de microorganismos que se pueden encontrar en aguas residuales es amplia y su nivel de tolerancia fue similar a nuestro estudio.

8.2.4 Solventes Industriales de las tres zonas de estudio

Las tres zonas de estudio presentaron al igual que los colorantes una tolerancia en su crecimiento en medios de cultivo con concentraciones menores de 15% de los solventes: benceno, tolueno y dicloroetanol.

El Parque Industrial Puebla 2000 se evaluó que a concentraciones de 30% y 50% hubo una disminución en el número de cepas totales. En concentraciones de 30% de Tolueno solo toleraron el 40.7% de las cepas, en benceno el 37% cepas y en dicloroetanol el 22.3%. Sólo 51.85% de las cepas fueron tolerantes a los tres tipos de solventes a una concentración de 50% como se muestra en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Número de cepas tolerantes a tres Solventes del Parque Industrial Puebla 2000

Solventes	[3%,5%,10%,15%]	[30%]	50%
Tolueno	27	11	4
Benceno	27	10	4
Dicloroetanol	27	9	6

Para la zona 2: Parque Industrial de La Resurrección, se encontró que el 37.5 % de las cepas creció en tolueno, el 41.6% en benceno y el 58.3% en dicloroetanol, a una concentración del 30% para cada uno. Por último a una concentración del 50% de cada uno de los solventes se obtuvo un porcentaje de 29.1% con un total de 14 cepas resistente en los tres solventes suministrados (**Tabla 7**).

Tabla 7. Número de cepas tolerantes a tres Solventes del Parque de La Resurrección.

Solventes	[3%,5%,10%,15%]	[30%]	50%
Tolueno	24	9	4
Benceno	24	8	7
Dicloroetanol	24	6	3

El parque industrial FINSA presento a un numero de cepas tolerantes a una concentración de 30 % de Tolueno con 43.4 % de cepas, Benceno 52.1% de cepas y 43.4% de cepas tolerantes a dicha concentración. A la concentración de 50% se obtuvo un total de 15 cepas siendo esta zona la que presento un alto número de cepas tolerantes con un porcentaje total 65.2 % a los tres solventes **Tabla 8.**

Tabla 8. Número de cepas tolerantes a tres Solventes del Parque FINSA

Solventes	[3%,5%,10%,15%]	[30%]	50%
Tolueno	23	10	5
Benceno	23	12	4
Dicloroetanol	23	10	6

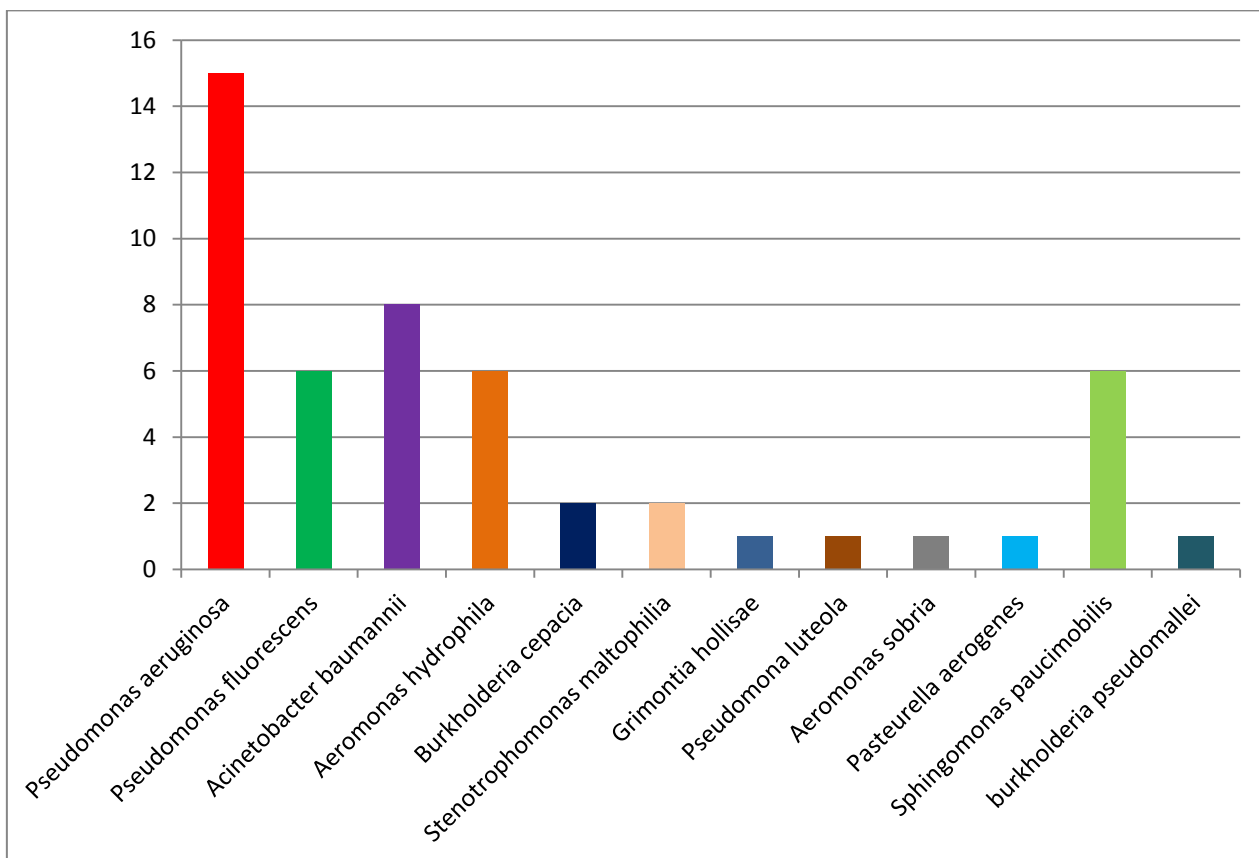
Echeverri y colaboradores en el 2011 menciona que existen bacterias degradadoras y tolerantes a diferentes medios ambientes con altas concentración de hidrocarburos, aislando un total de 45 cepas resistentes siendo las más representativas *Pseudomonas* y *Sphingomonas*, tomando en cuenta que estas bacterias aisladas de aguas residuales pueden servir de biocontrol para la degradación de estos compuestos. En este estudio, las bacterias que fueron tolerantes a los tres tipos de solventes y colorantes a concentraciones de 50% fueron identificadas con la prueba API20 NE

8.3 Identificación bacteriana

Para la identificación se llevaron a cabo pruebas bioquímicas estandarizadas y galería de sistema API20 NE realizando estas pruebas de identificación en este estudio para conocer las especies aisladas en aguas residuales de las tres zonas de estudio. El 67 % de cepas fueron seleccionadas para su identificación por su alta tolerancia que presentaron a los colorantes y solventes industriales.

8.3.1 Especies identificadas de las tres zonas estudio

De las 50 cepas que fueron seleccionadas por su nivel de tolerancia a solventes y colorantes a una concentración de 50% se obtuvo un total de 12 especies identificadas: *Pseudomonas aeruginosa* (30%), *Pseudomonas fluorescens* (12%), *Acinetobacter baumannii* (16%), *Sphingomonas paucimobilis* (12%), *Aeromonas hydrophila* (12%), *Burkholderia cepacia* (4%), *Burkholderia pseudomallei* (2%), *Stenotrophomonas maltophilia* (4%), *Grimontia hollisae* (2%), *Pseudomona luteola* (2%), *Aeromonas sobria* (2%), *Pasteurella aerogenes* (2%) **Anexo 2.**



Gráfica 13. Total de especies identificadas de las tres zonas de estudio

Siendo *Pseudomonas aeruginosa* como la especie más representativa de las tres zonas de estudio teniendo un 30% de identificación total de los tres parques industriales; Guevara en 2012 indica que *Pseudomonas aeruginosa*

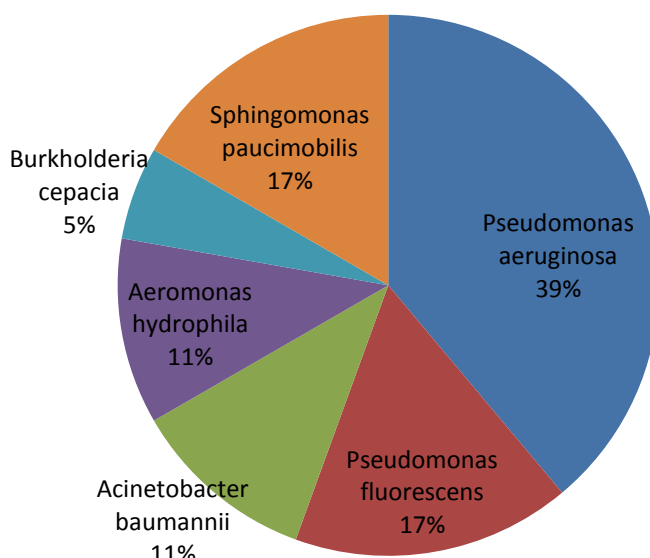
es capaz de sobrevivir y multiplicarse en aguas tratadas, siendo resistente a diferentes condiciones estableciendo que, a 35°C y a un pH de 7.0 llevó a cabo un crecimiento óptimo.

Acinetobacter baumannii fue la siguiente especie más representativa de las zonas de estudio con un porcentaje total de 16%. Gutiérrez E. en 2006, aisló de reactores biológicos bacterias que favorecen la biodegradación de materia orgánica entre los que destacan de *Aeromonas*, *Acinetobacter* y *Bacteroides*, lo que puede resultar en una alternativa para tratamientos fisicoquímicos y de biocontrol en el tratamiento de aguas residuales.

8.3.2 Especies identificadas del Parque industrial Puebla 2000

Cada zona industrial presentó un número diverso de especies; en la Zona 1 (Z1) correspondiente al Parque Industrial Puebla 2000, se identificaron un total de 6 especies: *Pseudomonas aeruginosa* (39%), *Pseudomonas fluorescens* (17%), *Acinetobacter baumannii* (11%), *Sphingomonas paucimobilis* (17%), *Aeromonas hydrophila* (11%) y *Burkholderia cepacia* (5%).

Parque industrial Puebla 2000

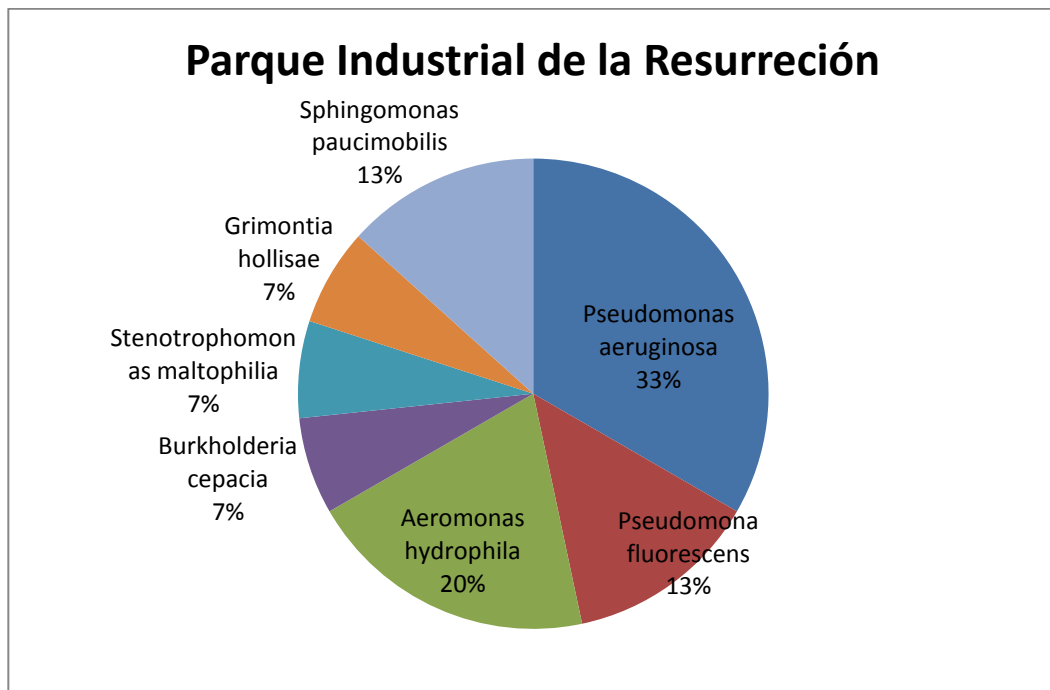


Gráfica 14. Especies bacterianas identificadas de la Zona 1

De acuerdo a Salamanca y col. en 2012, dan a conocer que no todas las bacterias provocan un daño al medio ambiente, si no que hay algunas que pueden dar un beneficio a largo plazo con ayuda de bacterias que participan en la remoción de hidrocarburos, realizaron un estudio sobre la degradación de contaminantes del agua residual proveniente de una industria papelera manteniendo condiciones *in vitro* del medio, inoculando *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas luteola* y *Sphingomonas paucimobilis*, midiendo la degradación de hidrocarburos, aplicando luz UV lograron una remoción del 96% de diferentes solventes como Tolueno y Benceno en un periodo de 15 días. Lo que demuestra que algunas de las bacterias aisladas de los parques industriales en Puebla podrían servir de biocontrol para la remoción de contaminantes ya que de igual manera las mismas bacterias fueron identificadas en las tres zonas de estudio.

8.3.3 Especies identificadas del Parque industrial Puebla 2000

El parque industrial de la Resurrección (Z2) se obtuvo un total de 8 especies: *Pseudomonas aeruginosa* (33%), *Pseudomonas fluorescens* (13%), *Sphingomonas paucimobilis* (13%), *Aeromonas hydrophila* (20%), *Burkholderia cepacia* (7%) *Stenotrophomonas maltophilia* (7%), *Grimontia hollisae* (7%).



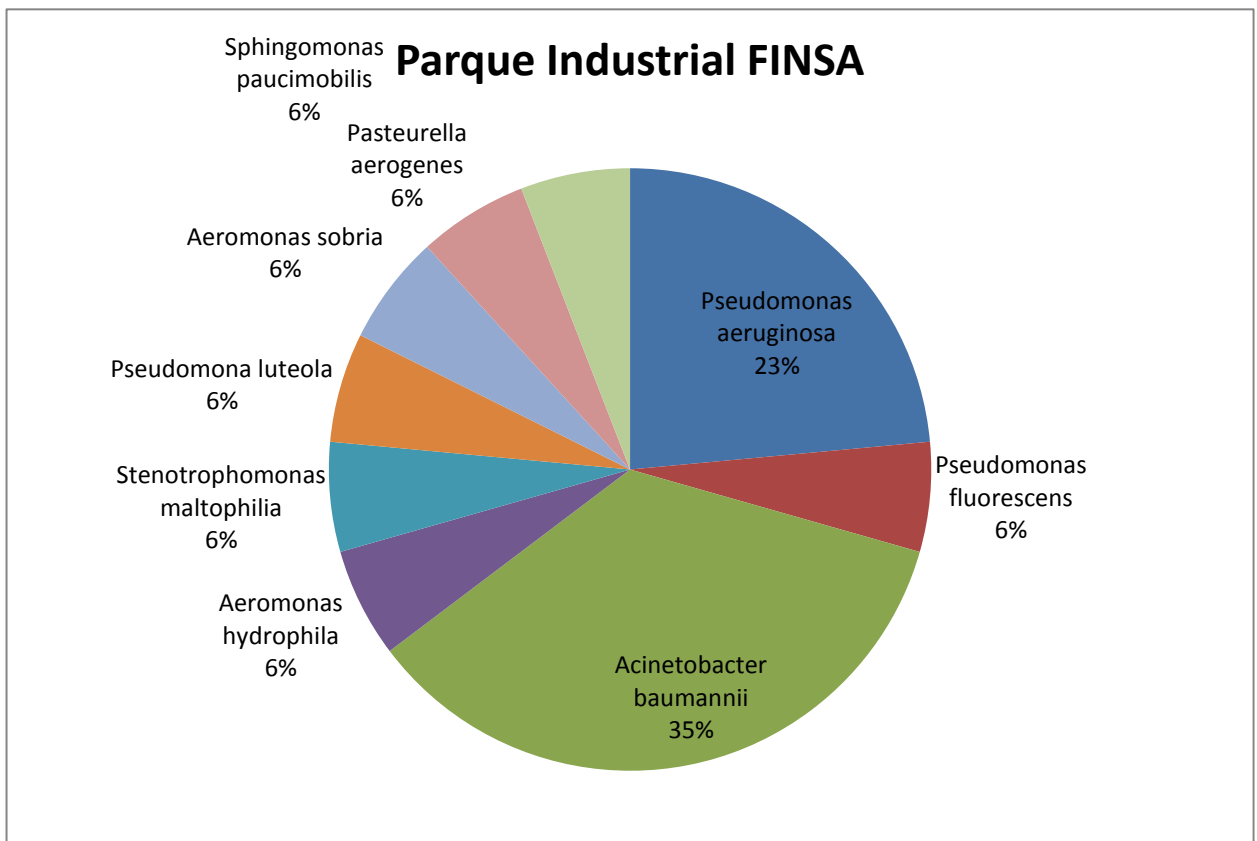
Gráfica 10. Especies bacterianas identificadas de la Zona 2

Zuleima en 2012 reporta que en aguas industriales aisló un alto número (cuánto) de especies *Acinetobacter baumannii* y *Grimontia hollisae*; particularmente esta última es un patógeno humano oportunista que representa un riesgo potencial para causar infecciones severas en pacientes que sufren de infecciones polimicrobianas o enfermedades intestinales en el presentó trabajo solo se encontró una cepa de *Grimontia hollisae* y nueve especies de *Acinetobacter baumannii* de acuerdo con el sistema de identificación API20 NE.

El género *Burkholderia* estuvo presente en este estudio con un total de 2 cepas identificadas como *Burkholderia cepacia* y *Burkholderia pseudomollaei*, la primera se puede aislar en agua y suelo mientras que *B. pseudomallei* se aisló de la zona 3, se encuentra frecuentemente en el suelo y en aguas turbias; ambas cepas tienen un alto grado de patogenicidad causante de enfermedades respiratorias, producción de úlceras cutáneas y enfermedades neurológicas atípicas en el ser humano como lo describe Currie y colaboradores en el 2012.

8.3.3 Especies identificadas del Parque industrial FINSA

Por último se realizó la identificación de la zona 3 correspondiente al Parque industrial FINSA en la cual se identificaron un total de 9 especies encontrando los siguientes géneros: *Pseudomonas aeruginosa* (23%), *Pseudomonas fluorescens* (6%), *Acinetobacter baumannii* (35%), *Aeromonas hydrophila* (6%), *Pseudomonas luteola* (6%), *Stenotrophomonas maltophilia* (6%), *Aeromonas sobria* (6%), *Pasteurella aerogenes* (6%) y *Sphingomonas paucimobilis* (6%).



Gráfica 11. Especies bacterianas identificadas de la Zona 3

La especie más representativa de esta zona fue *Acinetobacter baumannii* con un porcentaje total de 35% seguido de *Pseudomonas aeruginosa* con 23%. Siendo esta zona la que presentó el mayor número de especies identificadas a comparación de la Z1 que solo tuvo 6 especies y la Z2 8 especies.

En el presente estudio no hubo presencia de heces, pero las tuberías están conectadas a un mismo ducto afirmando lo que menciona Arcos y col. en el 2005, que encontraron un alto número de bacterias del género *Aeromonas* aisladas en aguas contaminadas de origen doméstico encontrando especies que presentan movilidad como: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas cavie* y *Aeromonas sobria*; estos microorganismos son habitantes normales de fuentes de agua y pueden estar presentes en un presencia o ausencia de contaminación fecal. Estos resultados concuerdan con Zuleima y colaboradores en 2012 ya que hubo presencia de dos géneros de *Aeromonas* identificando dos especies: *Aeromonas sobria* y *Aeromonas hydrophila* en aguas residuales.

En este estudio no se midió la resistencia o inhibición de antibióticos de *Stenotrophomonas maltophilia* debido a que presentó tolerancia a solventes y colorantes industriales a la concentración a los que fueron sometidos, esta bacteria estuvo presente en las tres zonas de estudio, como cita Nuñez en 2012, dicha bacteria mantiene un nivel de patogenicidad baja y su hábita natural es en medios acuáticos, además de que es multirresistente a antibióticos.

Pasteurella aeurogenes estuvo presente en la zona 3 y fue en la única donde estuvo presente dicha especie, en ningún momento se observó animales en descomposición o materia orgánica en la zona de estudio. Heltberg y colaboradores en 1996 mencionan que esta especie es un patógeno oportunista y es aislada de los intestinos de los cerdos provocando enfermedades gastrointestinales y cutáneas si es consumida su carne.

9.- CONCLUSIONES

- Se obtuvieron un total de 76 cepas aisladas de las tres zonas de estudio.
- El mayor crecimiento fue a una temperatura de 35°C con una carga bacteriana de 10^9 UFC/mL presente en las tres zonas.
- Las tres zonas de estudio presentaron una diferencia significativa por un pH de 6.5 con una carga bacteriana similar de 10^9 UFC/mL
- La carga bacteriana fue de 10^{10} UFC/mL a un 30% de salinidad presente en las tres zonas de estudio.
- Se obtuvieron 50 cepas tolerantes a colorantes y solventes a una concentración de 50%.
- Se identificó un total de 12 especies; siendo las más representativas: *Pseudomonas aeruginosa* (30%), *Pseudomonas fluorescens* (12%), *Acinetobacter baumannii* (16%),
- *Pseudomonas aeruginosa* fue la especie más con el mayor porcentaje (30%) en las tres zonas de estudio.

10.-PERSPECTIVAS

- Realización de pruebas moleculares para la identificación genotípica
- Aumentar los rangos de estrés físico y químico
- Pruebas de resistencia a antibióticos para cada especie
- Medir el nivel de degradación de hidrocarburos

11. - BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Abbott, S. J. (1994). Severe gastroenteritis associated with *Vibrio hollisae*: report of two cases and review. *Clinic Infec* , 18, 310-312.
- ❖ Amaya W, O. A. (2004). Control de pH para planta de tratamiento de aguas residuales. *Ciencia e Ingenieria Neogranadina* , 14, 1-6.
- ❖ Arcos, M. A. (2005). Evaluation of several selective media for recovery of *Aeromonas hydrophila* from polluted waters. *Environ Microbial* , 54, 2786-2792.
- ❖ Bae S.J., F. S. (2006). Influences of new azo dyes to the aquatic ecosystem. *Fiber Polymer* , 7, 30-35.
- ❖ Bracho M, D. L. (2004). Biodegradacion de hidrocarburos aromaticos policiclicos y heterociclicos por *Pseudomonas* spp. *Ciencia* , 12, 269-275.
- ❖ Brandi G., S. M. (2000). Evaluation of the environmental impact of microbial aerosols generated by wastewater treatment plants utilizing different aeration systems. *J Appl Microbiol* , 88, 845-852.
- ❖ Buchanan, R. L. (1990). Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride conten, sodium nitrite concentration and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J.Food Prot* , 53, 370 376.
- ❖ Christie R. (2001). *Colour Chemistry*. The Royal Society of Chemistry .
- ❖ Colwell, R. R. (1970). Polyphasic taxonomy of genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio species*. *J. Bacteriol* , 104, 410-433.
- ❖ Cowan, S. T. (1968). *A dictionary of microbial taxonomic usage*. (O. Boyd, Ed.)
- ❖ Currie. Bart J. Apìchai Tuanyok, D. M. (2012). Characterization of Ceftazidime resistance mechanisms in clinical isolates of *Burkholderia pseudomallei* from Austalia. *Environ Microbial* , 45, 2732-2743.

- ❖ C-W lee, A. Y.-F.-H. (2009). Isolation and characterization of culturable bacteria from tropical coastal waters. Department of Genetics and Genomic Sciences, 35, 153-167.
- ❖ Díaz R., G. C.-G. (1999). Manual de Microbiología. (Masson, Ed.)
- ❖ Dos- Santos A., C. F.-L. (2007). Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: Perspectives for anaerobic biotechnology. Bioresour , 98, 2369-2385.
- ❖ Echeverri Jaramillo, G. R. (2011). Adaptación de bacterias a diferentes concentraciones de fenol en el laboratorio: aspectos esenciales para un proceso de biodegradación. NOVA, 9, 15-26.
- ❖ Gonzales Pastor, J. E. (2010). La invisible diversidad microbiana. Protección de ambientes acuáticos por su interés microbiológico. Documento de divulgación de la fundación Agbar , 2, 298-398.
- ❖ Guevara A, W. J. (2012). Detección del gen blaVIM-2 de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalo-beta-lactamasa asialdas en una unidad de cuidado intensivos en Ciudad Bolivar. Chilena Infectol , 26, 336-341.
- ❖ Guo, Z. M. (2006). Degradation of phenol by nanomaterial TiO₂ in the water. Chemical Engineering Journal , 101, 3397-3414.
- ❖ Jackelyn E Borja, A. I. (2012). Bacterias halotolerantes productoras de hidrolasas aisladas de aguas termales de Tarapoto-Peru. Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica , 15, 66-87.
- ❖ Kramer, F. B. (2012). Role of microorganisms in biogeochemical cycles. Wasterwater Microbiology, 9, 268-289.
- ❖ Kuhad R. C., S. N. (2004). Developments in microbial methods for the treatment of dye effluents. Appl. Microbiol , 56, 185-213.
- ❖ Lebert, C. B. (1998). Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas fragil* in meat medium as affected by pH (5.8- 7.0), water activity and temperature (7-59 °C). International Journal of Food Microbiology, 39, 54-68.
- ❖ Lenski, R. E. (1998). Bacterial evolution and the cost of antibiotic resistance. Internatl Microbiol , 1, 264-271.

- ❖ LV, G. G. (2006). Estudio de la degradación de un colorante azo rojo reactivo en un biorreactor anaerobio de flujo ascendente. Tesis Doctoral, Instituto Tecnológico de Celaya , 30-98.
- ❖ Marchand Pajares, E. O. (2002). Microorganismos indicadores de la calidad del agua del consumo humano en Lima- Peru. Tesis en Microbiología y Parasitología , 6, 22-42.
- ❖ Margesin R, S. F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. ANOVA , 2, 73-83.
- ❖ Marquez MC, G. M. (1998). Halotolerant Bacillus diversity in hypersaline environments. Microbiol , 44, 95-102.
- ❖ N., Gen. (2004). Photocatalytic oxidation of a reactive azo dye and evaluation of the biodegradability of photocatalytically treated and untreated dye. Water SA , 8, 399-405.
- ❖ Murrall G., Gonzales, M. (2005). Characterization of bacteria degrading petroleum derivatives isolated from contaminated soil and water. Journal of Sciences, 16, 317-320.
- ❖ Martinez A, G. N. (2005). El papel de los tapetes microbianos en la biorecuperación de zonas litorales sometidas a la contaminación por vertidos de petróleo. Revista Ecosistemas, 15, 245-269.
- ❖ Moore J, H. N. (2002). Incidence of *Pseudomonas aeruginosa* in recreational and hydrotherapy pools. Commun Dis Public Health, 5, 23-26.
- ❖ Mukamolva, G. K. (2003). Adoption of the transiently non- culturable state- a bacterial survival strategy? Microbiol Physiol , 47, 65-129.
- ❖ Murray, R. G. (1990). Report of the ad hoc committee on approaches to taxonomy within the *Proteobacteria*. Journal System Bacterial , 40, 213-215.
- ❖ NORMA OFICIAL MEXICANA NOM 003 SEMARNAT. (1997). www.semarnat.gob.mx.
- ❖ Nuñez H, R. E.-F.-L. (2002). Identificación de géneros bacilos de bacilos Gram negativos no fermentadores de la glucosa. Revista Soc Ven Microbial , 2, 90-94.

- ❖ Nuñez, L. T. (2012). Bacterias resistentes a antibioticos en aguas grises como agentes de riesgos sanitarios. *Revista Ecosistemas*, 7, 235-243.
- ❖ Osorio, J. R. (2011). Caracterización y propuestas de tratamiento de aguas residuales. *Academia de Ciencias Biológicas Revista de Divulgación*, 17, 61-70.
- ❖ Pascual L., P.-L. S. (2003). Bioaerosol emission from wastewater treatment plants. *Aerobiologia*, 19, 261-270.
- ❖ Pedraza Chan María S, G. G. (2002). Biodegradación de colorantes azo bajo condiciones reductoras por bacterias Gram- negativas mesofilicas aisladas de diversos ambientes. *Posgrados en Ciencias Ambientales*, 1, 156-162.
- ❖ Peña, A. G.-H. (2002). Estrategias de adaptacion de microorganismos halofilos y *Debaryomyces hanseii*. *Revista Latin. Microbiol*, 4, 137-156.
- ❖ Ranalli G, P. P. (2000). Bacterial aerosol emmission from wasterwater tratment plants: Culture. *Revista Ecositemas*, 1, 156-169.
- ❖ Romaniuk, P. J. (1987). *Campylobacter pylori*, the spiral bacterium associated with human gastritis, is not a true *Campylobacter spp*. *Journal Bacteriol.*, 169, 2137-2141.
- ❖ Romero, A. M. (2007). Manejo integrado de enfermedades bacterianas en cultivos extensivos. *Universidad Nacional de Buenos Aires Facultad de Ciencias Agrarias (FAUBA)*, 1, 1-9.
- ❖ Salamanca Bell, J. G. (2004). Influence of sewage treatment and urbanization on selection of multiple resistance in fecal coliform populations. *App. Environ. Microbiol*, 1, 227-232.
- ❖ Salamanca, D. F. (2012). Treatment of wastewater with concentrated Mixed. *Journal of Environmental Engineering*, 2, 153-160.
- ❖ Saldaña, P. L. (2002). La importancia de incluir análisis de toxicidad en descargas industriales y municipales que afectan los cuerpos receptores. *Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales*.
- ❖ Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Norma Oficial Mexicana NOM-021-. (2000). SEMARNART-2000 .

- ❖ Suarez, C. B. (2000). Enfermedades emergentes y reemergentes causada por bacterias nosocomiales. *Revista Cubana Med Gen Integr* , 16, 593-597.
- ❖ Sunberg C., S. S. (2004). Low pH as an inhibiting factor in the transition from mesophilic to thermophilic phase in composting. *Bioresour* , 95, 145-150.
- ❖ Tortora, G. J. (2007). *Microbiology an introduction*. Pearson Education Inc; Ninth Edition San Francisco, CA .
- ❖ Tsuboy, M. S. (2007). Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI disperse Blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. *Toxicology in vitro*, 8, 1650-1655.
- ❖ Wagner M, A. L. (2002). Bacterial community composition and function sewage treatment systems. *Microbial Ecology*, 13, 218-227.
- ❖ Wagner M, A. R.-H. (1993). Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl Environ Microbiol* , 8, 168-175.
- ❖ Yeon S, J. W. (2005). The diversity of culturable organotrophic bacteria from local solar salterns. *Journal Microbial* , 13, 1-10.
- ❖ Zahran, H. (1997). Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline. *Journal Microbial*, 25, 211-223.
- ❖ Zuleima P. Pinzon J. Mantilla J, V. E. (2012). Caracterización molecular aislamiento de *Acinetobacter baumannii* proveniente de la unidad de quemados de un hospital de tercer nivel de Bogotá. *Journal Microbial* , 10, 71-78.

12.- ANEXOS

12.2 FUNDAMENTO DE PRUEBAS BIOQUIMICA

12.1.1 Tinción de Gram

La membrana de las bacterias contiene péptidoglicano. Cuando se adiciona el cristal violeta y lugol forman un complejo cristal violeta-yodo. La diferencia que se observa en la resistencia a la decoloración, se debe a que la membrana externa de las Gram negativas es soluble en solventes orgánicos, como por ejemplo la mezcla de alcohol/acetona. La capa de péptidoglicano que posee es demasiado delgada como para poder retener el complejo de cristal violeta-yodo que se formó previamente, y por lo tanto este complejo se escapa, perdiéndose la coloración azul-violácea por lo que se tiñen por el colorante de safranina. Pero por el contrario, las Gram positivas, al poseer una pared celular más resistente y con mayor proporción de péptidoglicano, no son susceptibles a la acción del solvente orgánico, sino que este actúa deshidratando los poros cerrándolos, lo que impide que pueda escaparse el complejo cristal violeta, y manteniendo la coloración azul-violácea

12.1.2 Oxidasa

Se basa en la producción bacteriana de una enzima oxidasa intracelular, esta reacción de oxidasa se debe a un sistema de citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, que a su vez, actúa como un receptor de electrones en la parte terminal del sistema de transferencia de electrones.

12.1.3 Catalasa

La catalasa actúa como una enzima esencial de defensa biológica contra la toxicidad del oxígeno; la catalasa es una enzima que descompone al peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua

12.1.4 Oxidación/Fermentación (O/F)

Se basa en la determinación del metabolismo oxidativo o fermentativo de un hidrato de carbono. Son necesarios dos tubos del medio para la prueba. El medio de un tipo se expone al aire y el otro se cubre con aceite mineral o parafina líquido para mantener anaerobiosis. Las bacterias oxidativas producen ácido solo en el tubo abierto expuesto al oxígeno atmosférico; los microorganismos fermentadores producen ácidos en ambos tubos.

12.1.5 TSI (Hierro Triple Azúcar)

Medio empleado para la diferenciación de la fermentación de glucosa, lactosa, sacarosa y la producción de ácido sulfhídrico. El tiosulfato de sodio es el sustrato necesario para la producción de ácido sulfhídrico, el sulfato de hierro y amonio, es la fuente de iones Fe^{3+} , los cuales se combinan con el ácido sulfhídrico y producen sulfuro de hierro, de color negro, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. Por fermentación de azúcares, se producen ácidos, que se detectan por medio del indicador rojo de fenol, el cual vira al color amarillo en medio ácido. El tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrógeno, el que reacciona luego con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro.

12.1.6 Citrato de Simmons

Se usa para determinar si el organismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono y compuestos amoniacales como única fuente de nitrógeno.

12.1.7 MIO (Movilidad, Indol, Ornitina)

Cultivo semisólido, altamente nutritivo debido a la presencia de extracto de levadura, peptona y tripteína. Además, la tripteína aporta grandes cantidades de triptofano, sustrato de la enzima triptofanasa, para la realización de la prueba del indol. La dextrosa es el hidrato de carbono fermentable, la ornitina es el sustrato para la detección de la enzima ornitina decarboxilasa, el púrpura

de bromocresol es el indicador de pH, que en medio alcalino es de color púrpura y en medio ácido es amarillo.

La movilidad se demuestra por un enturbiamiento del medio o por crecimiento que difunde mas allá de la línea de inoculación. La reacción positiva a la ornitina está dada por un color púrpura del medio. Debido a la fermentación de la glucosa se reduce el pH produciendo una condición ácida y originando que el indicador de pH púrpura de bromocresol vire al amarillo.

La presencia de acidez, otorga condiciones óptimas para la actividad de la enzima ornitina decarboxilasa, la cual descarboxila la ornitina presente alcanza el medio, con el consecuente viraje del indicador hacia el color púrpura. El indol, es producido a partir del triptófano por los microorganismos que contienen la enzima triptofanasa. El desarrollo de un color rojo luego de agregar unas gotas de reactivo de Kovacs, indica un resultado positivo.

En el medio de cultivo, la peptona y el extracto de levadura aportan los nutrientes para el desarrollo bacteriano. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable, y la lisina es el sustrato utilizado para detectar la presencia de las enzimas decarboxilasa y deaminasa. El citrato de hierro, amonio, y el tiosulfato de sodio, son los indicadores de la producción de ácido sulfhídrico. El púrpura de bromocresol, es el indicador de pH, el cual es de color amarillo a pH igual o menor a 5.2 y de color violeta a pH igual o mayor a 6.8. Por descarboxilación de la lisina, se produce la amina cadaverina, que alcaliniza el medio y esto produce el viraje del indicador al color violeta. La descarboxilación de la lisina, tiene lugar en medio ácido, por lo que es necesario, que la glucosa sea previamente fermentada.

12.2 Anexo Total de Cepas de las zonas de estudio con su carga bacteriana

Num. Ceba	Absorbancia	UFC/mL
1	0,556	2×10^{10}
2	0,746	2×10^{10}
3	1,285	2×10^9
4	1.389	2×10^{10}
5	1.195	5×10^9
6	1.281	7×10^9
7	1.048	5×10^9
8	0.842	3×10^{10}
9	1.191	6×10^{10}
10	0.835	7×10^9
11	1,258	3×10^9
12	0,998	6×10^9
13	1,365	2×10^{10}
14	0,636	3×10^9
15	0,478	2×10^9
16	1.214	6×10^{10}
17	0,991	5×10^{10}
18	0.992	3×10^{10}
19	1.245	6×10^{10}
20	0,898	6×10^{10}
21	0.966	5×10^9
22	1.041	4×10^9
23	1.106	4×10^{10}
24	0,896	3×10^9
25	1,256	5×10^9
26	1,485	5×10^{10}
27	1,285	6×10^9
28	0,813	6×10^9
29	0,769	6×10^9
30	0,725	2×10^9
31	0,591	3×10^{10}
32	0,584	2×10^{10}
33	0,566	3×10^9
34	0,787	2×10^9
35	0,885	3×10^9

36	0,546	4×10^{10}
37	0,459	4×10^9
38	0,486	2×10^9
39	1,425	2×10^9
40	0,837	4×10^{10}
41	0,405	3×10^9
42	0,345	2×10^9
43	0,898	3×10^9
44	0,789	3×10^9
45	1,256	3×10^9
46	1,098	3×10^9
47	0,898	2×10^{10}
48	0,389	2×10^{10}
49	0,489	3×10^9
50	0,784	3×10^9
51	0,698	5×10^9
52	0,785	3×10^{10}
53	0,655	3×10^9
54	0,985	2×10^9
55	0,965	2×10^9
56	0,985	2×10^{10}
57	0,874	2×10^9
58	0,589	1×10^{10}
59	0,897	2×10^9
60	0,698	4×10^{10}
61	0,589	3×10^{10}
62	0,451	3×10^{10}
63	0,986	3×10^9
64	0,784	4×10^9
65	0,845	3×10^{10}
66	0,985	3×10^9
67	0,359	4×10^9
68	0,223	2×10^{10}
69	0,612	2×10^9
70	0,136	2×10^9
71	0,369	3×10^9
72	0,269	2×10^9
73	0,876	2×10^9
74	0,478	2×10^9
75	0,969	1×10^9
76	0,185	1×10^9

12.2.1 Anexo Lectura API20 NE

Especie	API 20 NE	Tinción de Gram	Movilidad	Catalasa/Oxidasa
<i>Pseudomonas auriginosa</i>	1 1 5 4 7 7 5	Bacilo Gram -	Positiva	(+)/(+)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1 3 4 3 5 7 7	Bacilo Gram -	Positiva	(+)/(+)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0 4 5 1 4 7 5	Bacilo Gram -	Negativo	(+)/(-)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0 0 4 1 0 7 3	Bacilo Gram -	Positiva	(+)/(+)
<i>Burkholderia cepacia</i>	0 7 3 6 6 7 7	Bacilo Gram -	Positiva	(+)/(+)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1 0 6 2 3 0 0	Bacilo Gram -	Positiva	(+)/(-)
<i>Grimontia hollisae</i>	1 7 3 6 3 4 5	Bacilo Gram -	Positiva	(+)/(+)

Especie	API20 NE	Tinción de Gram	Movilidad	Catalasa/Oxidasa
<i>Pseudomona luteola</i>	1 7 3 6 3 4 5	Bacilo Gram -	Positiva	(+)/(+)
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	1 5 5 6 7 7 5	Bacilo Gram -	Positiva	(+)/(+)
<i>Aeromonas sobria</i>	3 5 7 7 7 5 4	Bacilo Gram -	Positiva	(+)/(+)
<i>Pasteurella aerogenes</i>	1 2 6 3 3 0 0	Bacilo Gram -	Positiva	(+)/(+)
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	1 0 6 2 3 0 0	Bacilo Gram -	Positiva	(+)/(+)

