



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

“CARACTERIZACION DE BACTERIAS TOLERANTES A  
HIDROCARBUROS AROMÁTICOS MONOCÍCLICOS, BTX  
(BENCENO, TOLUENO Y XILOL) EN LA LAGUNA DE  
MECOACAN, PARAISO TABASCO.”

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA  
OBTENER EL TITULO DE:  
LICENCIADO EN BIOLOGIA

PRESENTA:  
STHEFANY LILIANA WOOLRICH ZAVALA

TUTOR (A):  
DR. ROCIO PEREZ Y TERRÓN

PUEBLA, PUE.  
SEPTIEMBRE, 2016.



## Agradecimientos:

Agradezco a mis padres por el apoyo incondicional, por las largas pláticas en los que trataron de explicarme el sentido de la vida, aunque el sentido siempre fue 3'→ 5', y por guiarme lo mejor posible, por brindarme ese abrazo cuando el miedo me inundaba y no me dejaba continuar. Por proveerme de los medios necesarios para la realización de esta tesis y todas mis aventuras que pase durante este tiempo. Por enseñarme tantas cosas que no puedo terminar de entender, por ser mis ejemplos a seguir y darme cada una de las herramientas necesarias para salir adelante.

Debo agradecer de manera sincera a la Dra. Roció Perez y Terrón, por aceptarme para realizar esta tesis bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas, ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como biólogo. Las ideas propias, siempre enmarcadas en su orientación y rigurosidad, han sido la clave para la elaboración de este trabajo. Le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis.

## **Dedicatoria:**

**A Dios, por sacarme de donde me encontraba,  
Por esta segunda oportunidad  
Por darme todos los días una nueva esperanza.**

**A mis padres por estar conmigo día y noche,  
En cada momento difícil cuando sentía ya no poder más  
Y en esos momentos en que la vida empezó a ser buena.  
Los amo.**

**A mi hermanita, mi principal inspiración  
Mi persona favorita y mi conciencia que siempre me guía  
Te amo.**

**A todas esas personas que he conocido  
Que han cambiado de forma tan profunda mi vida que  
No he vuelto a ser la misma.**

## Índice General:

I	Agradecimientos	I
II	Dedicatoria	II
III	Índice general	III
IV	Índice de figuras	V
V	Índice de gráficos	VI
VI	Índice de cuadros	VI
VII	Índice de anexos	VI
VIII	Índice de abreviaturas	VII
IX	Resumen	VII
1	Introducción	1
1.1	Contaminación del agua por hidrocarburos	2
	Comportamiento físico- químico de los hidrocarburos como	
1.2	contaminantes	3
1.3	La calidad del agua en México	3
	Los hidrocarburos aromáticos monocíclicos, BTX ( benceno , tolueno y	
1.4	xilol)	4
1.4.1	Benceno	5
1.4.2	Tolueno	5
1.4.3	Xilol	6
1.5	Toxicología e impacto ambiental de los compuesto BTX	7
1.6	Tolerancia bacteriana	8
1.6.1	Inactivación del compuesto	9
1.6.2	Alteración del sitio blanco	9
1.6.3	Barreras de permeabilidad	10
1.8	Identificación fenotípica	10
1.9	Galerías API	11
2	Antecedentes	13
3	Justificación	14
4	Hipótesis	15
5	Objetivos	16
5.1	Objetivo general	16
5.2	Objetivo particular	16
6	Metodología	17
6.1	Área de estudio	18
6.2	Muestreo	20
	Procesamiento de las muestras en el laboratorio de Biología Molecular y	
6.3	Genética	21
6.3.1	Aislamiento y preservación de la cepas	21
6.3.2	Análisis de tolerancia a hidrocarburos	23

6.3.3	Identificación fenotípica	27
6.3.3.1	Caracterización microscópica	27
6.3.3.2	Caracterización macroscópica	28
6.3.3.3	Pruebas bioquímicas	29
6.4	Análisis estadístico	30
7	Resultados y discusión	31
7.1	Muestreo	31
	Resultados del procesamiento de las muestras en el laboratorio de	
7.2	Biología Molecular y Genética	32
7.2.1	Aislamiento de cepas	32
7.2.2	Análisis de tolerancia a diversas concentraciones de Hidrocarburos BTX	33
7.2.3	Identificación fenotípica	46
8	Conclusiones	54
9	Perspectivas	55
10	Bibliografía	56
11	Anexos	60

## Índice De Figuras:

1	Estructura química del benceno	5
2	Estructura semidesarrollada del tolueno	6
3	Estructura semidesarrollada de los isómeros del xilol	7
4	Galerías API 20 NE	12
5	Ubicación del municipio de Paraíso en el estado de Tabasco	18
6	Ubicación de la laguna de Mecoacán	19
7	Toma de la muestra de agua	20
8	Aislamiento de las bacterias en medio selectivo Mc Conkey	22
9	Técnica de difusión en agar	24
10	Resultados de la prueba de la técnica de difusión en agar	25
11	Adaptación de la técnica de difusión en agar para la concentración de 975,000ppm.	26
12	Resultados de la prueba para la concentración de 975,000ppm	27
13	Procedimiento de la tinción de Gram	28
14	Elementos morfológicos para la descripción de las colonias	29
15	Forma de inoculación de las Galerías API 20 NE	30
16	Sitios de muestreo	31
17	Cepa 1c2b prueba positiva para xilol	36
18	Cepa 1c3 prueba negativa para el xilol	36
19	Cepa 3c1 resultados positivo para el tolueno	37
20	Cepa 1c4a resultados negativos para el tolueno	37
21	Cepa 1c3 prueba positiva para el benceno	38
22	Cepa 13c4a, mostrando halos de inhibición concentración 241,304ppm	38
23	Tolerancia de la cepa 3c1 ante BTX	40
24	Tolerancia de la cepa 12c4 ante BTX	40
25	Galería Api correspondiente a la cepa 3c1	47
26	Galería API correspondiente a la cepa 12c4	48

## Índice de gráficos:

1	Amplitud del halo de inhibición	34
2	Tolerancia a las diferentes concentraciones de BTX	35
3	Inhibición de las cepas a mayor concentración	39
4	Porcentaje de las cepas aisladas en la Laguna de Mecoacán tolerantes a BTX	50

## Índice de cuadros:

1	Factores que determinan la distribución de los hidrocarburos	2
2	Propiedades físicas de los isómeros del xilol	6
3	Criterios metodológicos aplicados a la identificación bacteriana	11
4	Concentración de las soluciones utilizadas	25
5	Bacterias que toleraron el estímulo de 975,000ppm	39
6	Determinación de las especies con relación a la cepa	47

## Índice de Anexos:

1	Efectos para la salud de los BTX de acuerdo a su concentración	60
2	Calculo de partes por millón (ppm) de las soluciones	62
3	Lista de pruebas bioquímicas que contempla la galería API 20 NE	63
4	Datos de los sitios de muestreo	64
5	Características físicas de las muestras	65
6	Resultados de la morfología colonial	66
7	Resultados de los API 20 NE	67

## Índice de abreviaturas:

µg	Microgramo
AAC	Acetiltransferasa
ADH	Fosfatidiltransferasa
ANRr	Ácido ribonucleico ribosomal.
ANT	Adeniltransferasa
API	Administración portuaria integral
API*	Instituto Americano del Petróleo.
ARN	Ácido ribonucleico.
BTX	Benceno , Tolueno y Xilol
CENAPRED	Centro Nacional de Prevención de Desastres
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CoA	Acetil coenzima A
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno
DBQ	Demanda química de oxígeno.
EPA	Agencia de Protección Ambiental.
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Oxido férrico
IMP	Instituto Mexicano del Petróleo.
INAFED	Instituto Nacional para el Federalismo y El Desarrollo Municipal
Kg	Kilogramo
m <sup>3</sup>	Metro cubico
MBC	Mínima concentración bactericida.
Mg	Miligramo
MIC	Mínima concentración inhibitoria
MnO <sub>2</sub>	Dióxido de manganeso
PEMEX	Petróleos mexicanos
pH	Potencial de Hidrogeno
PROFEPA	Procuraduría Federal de Protección al Ambiente
Redox	Potencial de reducción oxidación.
SCT	Secretaria de Comunicaciones y Transporte
SEDESOL	Secretaria de Desarrollo Social
SEMARNAT	Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales
UJAT	Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

## Resumen:

La actividad industrial dentro del país ha generado derrames de hidrocarburos, siendo la fuente principal de contaminación de las aguas continentales. Las zonas más afectadas se encuentran en el golfo de México, esto se debe a que el estado de Tabasco, se ha consolidado como la zona industrial más importante con la que cuenta PEMEX.

Debido al aumento de la actividad industrial de la Terminal Marítima de Dos Bocas, la liberación de aguas residuales y la combustión incompleta de la gasolina, se han afectado las características organolépticas de la laguna de Mecoacán, por la liberación de diversos compuestos xenobioticos entre los que se encuentran los compuestos BTX.

Nuestro estudio se basa en el análisis de la tolerancia a los compuestos BTX (Benceno, Xilol y Tolueno), esta resistencia fue probada mediante la técnica de difusión en agar donde se probaron las concentraciones de: 80,000ppm, 120,000ppm, 160,000ppm, 260,000ppm, 420,000ppm y 840,000ppm para cada uno de los compuestos.

Se aisló un total de 51 cepas utilizando la técnica de siembra en medio solido selectivo, de las cuales solo 23 mostraron resultados positivos a la prueba de tolerancia. Se identificó que la concentración mínima de inhibición para el xilol es el 160,000ppm; mientras que para el benceno y el tolueno se registró una tolerancia hasta del 260,000ppm de contaminante, por lo que el xilol es el componente más toxico, debido a la conformación química de este.

Tras la prueba de tolerancia a la concentración de 840,000ppm, se identificaron fenotípicamente mediante las galerías API 20 NE de BioMÈrieux; determinando que las cepas resistentes a los tres compuestos BTX, pertenecen a las especies de *Pseudomonas luteola* y *Burkholderia cepacia*.

## Introducción:

A consecuencia de la actividad industrial y petrolera en México, se han producido grandes cantidades de residuos peligrosos (SEMARNAT, 2002), de acuerdo con la Procuraduría Federal de Protección Ambiental (PROFEPA) cada año en promedio se registran 550 contingencias ambientales relacionadas con el manejo de materiales peligrosos (PROFEPA, 2006).

El sureste mexicano ha registrado concentraciones de hidrocarburos hasta de 450,000 ppm, en diversos mantos acuíferos (Gallegos- Martínez *et al.*, 2000). Alterando las características organolépticas del agua, impactando en los ecosistemas debido a que alteran el equilibrio ecológico y pueden ser cancerígenos y mutagénicos para el hombre y la fauna (Atlas y Bartha, 2002).

En el agua, los hidrocarburos inician una serie de procesos físico-químicos simultáneos, según el tipo de hidrocarburo, temperatura y cantidad vertida pueden ser procesos más o menos lentos provocando diferencias en la toxicidad de los compuestos. Los hidrocarburos como el benceno, tolueno y xilol, son degradables a diferentes ritmos y en algunos casos son recalcitrantes a la biodegradación, lo que conlleva a un metabolismo por largos periodos de tiempo (Masheregui *et al.*, 2005).

Bragg *et al.*, en 1992 sugirieron la utilización de elementos biológicos, en especial los microorganismos, como alternativa para la rehabilitación de aguas contaminación. Esto se debe a su capacidad de degradar compuestos recalcitrantes por medio de reacciones metabólicas simples (Milner *et al.*, 2002). Las reacciones metabólicas consisten en la conversión de sustratos habitualmente no degradables a metabolitos fácilmente asimilables o susceptibles para ser catalizados (Mackey y Hodgkinson, 1996).

Para determinar la tolerancia bacteriana a hidrocarburos es necesario ocupar medios enriquecidos y selectivos en condiciones que favorezcan el desarrollo de las cepas de interés (Wick *et al.*, 2003). La identificación de estas

bacterias ha sido mediante técnicas fenotípicas y moleculares; lográndose registrar los siguientes géneros: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus* (Johsen *et al.*, 2002).

### Contaminación del agua por hidrocarburos:

Cuando el agua contiene materias extrañas que alteran sus características naturales se dice que está contaminada, hay que entender que la contaminación es la introducción directa o indirecta de sustancias provenientes de yacimientos humanos al medio acuático; ocasionando cambios en el flujo energético (Hoekstra, 2003). De acuerdo con Botello *et al.*, (2005), los principales rasgos de contaminación son la presencia de breas en la superficie, altas concentraciones de materiales tóxicos, como los hidrocarburos derivados del petróleo.

El petróleo es una mezcla saturada de hidrocarburos entre los que se encuentran los compuestos aromáticos (Leahy & Cowel, 1990; Salleh *et al.*, 2003), los cuales al momento del contacto con la columna de agua comienzan el proceso de dispersión, el cual depende de las características del acuífero (cuadro 1) (Bayona *et al.*, 1993; Malins y McCan, 1979; Uthe, 1979; Anderson, 1991, Huertos, 2003).

Cuadro 1. Factores que determinan la distribución de los hidrocarburos.

Factor	
<b>pH (potencial de hidrogeno)</b>	Determina el grado de absorción de los iones por las partículas del medio.
<b>Intercambio catiónico</b>	Propiedad basada en la cantidad de cationes que pueden ser absorbidos.
<b>Aversión</b>	Migración de los contaminantes en medios porosos, siguiendo el flujo del agua.
<b>Dispersión</b>	Movilidad del contaminante relacionada con la velocidad del flujo en un medio y la conductividad hidráulica.

Fuente: Carrera y Montenegro, 2001, Eweis *et al.*, 1990, La Greca *et al.*, 1998, Riser-Roberts, 1998.

## Comportamiento físico- químico de los hidrocarburos como contaminantes:

Dependiendo de la composición química del hidrocarburo puede desplazarse, volatilizarse o absorberse en los sedimentos, en contacto con el agua se consideran ligeros, es decir que flotan sobre la lámina de agua formando penachos de contaminantes (Fetter, 1993; Ochoa *et al.*, 2002).

La contaminación por hidrocarburos se relaciona con el peso molecular, por lo que los compuestos de bajo peso molecular son poco frecuentes y de baja concentración. En regiones tropicales con temperaturas elevadas y fotoperiodos largos, no presentan sedimentación y por ende su transferencia a organismos con hábitos bentónicos es limitada (Neff, 1979).

Los contaminantes experimentan una serie de fenómenos entre los cuales destacan las interacciones por las fuerza de Van de Waals, puentes de hidrogeno, interacciones dipolo-dipolo, intercambio iónico o reparto hidrófobo; controlando de esta manera la expansión del contaminante dentro del ecosistema (Aguilar *et al.*, 2003).

Los sedimentos de lagunas contaminadas presentan altas concentraciones de óxido de fierro, estas características se forman por procesos de óxido y reducción, mostrando una correlación con la cantidad de materia orgánica disuelta y la cantidad de organismos presentes (Syooop, 1985). Generando la acumulación de los hidrocarburos en la masa basal (Pape y Legger, 1994; Veneman *et al.*, 1976).

### La calidad del agua en México:

El golfo de México posee una superficie de 1, 602,000 km<sup>2</sup> siendo uno de los golfos más grandes, solo México descarga el 62% de los fluviales nacionales hacia esta cuenca (Zarate-Lomelí *et al.*, 2004). Destaca por ser una de las regiones más importantes de explotación y transporte de hidrocarburos del mundo (Intergovernmental Maritime Consultative Organisation, 1979).

En estudios recientes registro niveles considerables de compuestos orgánicos e hidrocarburos (CONAGUA, 2006; Botello, 1980; Carvajal y Chavira, 1985). Diversos estudios relacionados señalan la existencia de 175 compuestos xenobioticos presentes (Parsons y Witt, 1988).

En el Estado de Tabasco el agua se encuentra entre los límites permisibles para poder ser destinada para uso humano; ya que se registró una turbidez de 11.23, lo cual nos indica una correcta fotosíntesis por parte de los microorganismos, por otra parte los índices de acides y alcalinidad se encuentran dentro de los índices permitidos, aunque se registra una tendencia a la alcalinidad, pero no representa ningún peligro para el ecosistema (CONAGUA, 2014).

Hasta el día de hoy, se estima que el 85% de hidrocarburos líquidos derramados en el Litoral del Golfo de México fueron provocados por 403 derrames en instalaciones de PEMEX Exploración y Producción de estos el total de los incidentes ocurridos el 89% han sucedido en instalaciones terrestres (PEMEX, 2001). Afectándose la calidad del agua en la Laguna de Mecoacán.

### **Los hidrocarburos aromáticos monocíclicos, BTX (Benceno, Tolueno y Xilol):**

La gasolina está constituida por el 70% de compuestos alifáticos saturados y 30% son hidrocarburos aromáticos como el benceno, tolueno, xilol y metilbenceno, además contiene aditivos como el metil- t- butil éter (Harley y Englande, 1992). Los compuestos aromáticos son compuestos orgánicos e insaturados que tienen uno o más anillos planos de carbono unidos por enlaces covalentes (ATDRS, 2011).

Poseen las propiedades asociadas al anillo del benceno, por lo que pueden formar productos de adición y de sustitución, en el cual el hidrogeno es remplazado por un elemento univalente o un grupo funcional (Enciclopedia de seguridad, 2005). Son insolubles en agua pero solubles en diversos solventes químicos (ATSDR, 2007).

### Benceno:

Su fórmula química  $C_6H_6$  (figura 1), es un líquido de aroma dulce con un punto de ebullición de  $80.1^\circ C$  y un punto de fusión de  $5,5^\circ C$ ; es sumamente inflamable, volátil y se forma tanto en procesos naturales y por actividades humanas como la destilación del alquitrán de hulla y del petróleo (Weiss, 1986). Considerado como el componente más tóxico proveniente del petróleo. Es uno de los principales productos químicos de uso industrial, pues es intermediario en la producción de numerosos productos como gomas, lubricantes, tinturas, detergentes, medicamentos y plaguicidas (Espinosa, 2008).

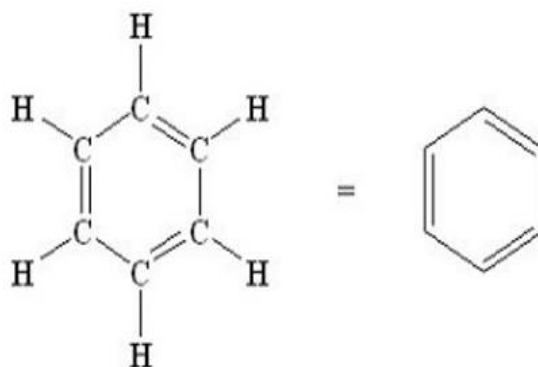


Figura 1. Estructura química, diagrama desarrollado (izquierdo) y diagrama semidesarrollado (derecho) del benceno.

### Tolueno:

También conocido como metilbenceno ( $C_6H_5CH_3$ ) (figura 2), cuyo punto de ebullición es  $110.6^\circ$  y de fusión de  $-95^\circ C$ . Es la modificación del benceno, donde el hidrogeno es cambiado por un radical metilo, por lo que es un líquido incoloro y miscible en disolventes no polares. Existe en forma natural en el petróleo crudo y en el árbol del Tolú. (Weiss, 1986; Harper *et al.*, 1993; Sanambi, 2008).

Se emplea como materia prima para obtener diversos derivados del benceno, como 2, 4,6- trinitrotolueno (TNT), ácido benzoico, cloruro de bencilo y disocianato de tolueno; además es empleado para la producción de cuero artificial y productos de limpieza en distintas industrias y en artesanías (DLEP, 2007).

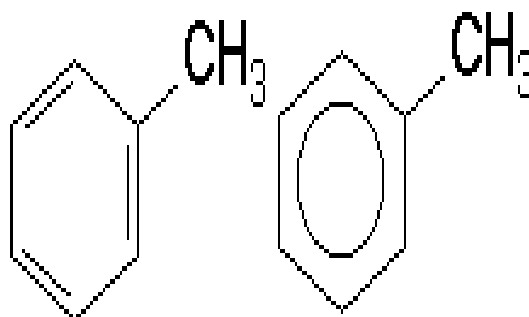


Figura2. Estructura semidesarrollada del tolueno

### Xilol:

El grupo de los di-metilbencenos son líquidos incoloros e inflamables con olor característico parecido al del tolueno; se encuentra en los gases obtenidos de la destilación seca de la madera, Además forman parte de muchas formulaciones de combustibles de gasolina donde destacan por su elevado índice de octano (Espinosa, 2008).

La mezcla del xilol contiene tres isómeros (figura 3), que se determinan de acuerdo a la posición del radical metilo en el anillo del benceno haciendo la diferencia entre -orto, -meta y -para (Sanambi, 2008) (cuadro 2). De acuerdo a esto se tienen las siguientes características físicas.

Cuadro 2. Propiedades físicas de los isómeros del xilol (Sanambi, 2008).

Isómero	Punto de ebullición	Punto de fusión
<b>O-xileno</b>	144°	-25°
<b>M- xileno</b>	139.3°	-47.4°
<b>P-xileno</b>	137-138°	13-14°

Punto de ebullición y de fusión marcando una diferencia de acuerdo a la posición del radical metilo

Se usa en las industrias: química, de plásticos y de fibras sintéticas. Los isómeros del xileno se usan en la manufactura de ciertos polímeros (compuestos químicos), por ejemplo plásticos (Gonzales, 2008).

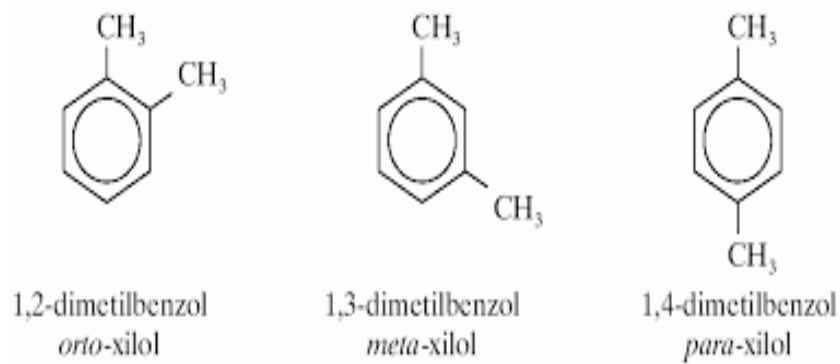


Figura 3. Estructura semidesarrollada de los isómeros del xilol.

### Toxicología e impacto ambiental de los compuestos BTX:

En las zonas urbanas la generación de compuestos BTX, se debe a la combustión incompleta de los combustibles fósiles, los residuos no quemados producen emisiones mayores a  $10^7 \mu\text{g}/\text{m}^3$  de hidrocarburos aromáticos (Glynn y Gary, 1999, Celis-Huaiquilaf, 2009). La liberación de este tipo de hidrocarburo en cuencas de agua se debe principalmente a la existencia de focos emisores ubicados en sitios aledaños (Gonzales *et al.* 2010).

En el caso de los compuestos BTX, la respuesta de la población a la exposición se encuentra en función del estado general de salud, estado nutricional, estado físico y a la edad de la misma y a la concentración del compuesto presente en el medio (Anexo 1) (ATSDR, 2007). Debido a su volatilidad el tiempo de exposición de los organismos puede ser lo suficientemente corto para evitar los efectos (NRC, 2003).

El benceno puede llegar a producir la muerte por paro respiratorio, es un compuesto considerado altamente cancerígeno, pues induce la apoptosis de las células de la médula ósea ocasionando leucemia aguda no linfocítica (Dudavari *et al.*, 1989). Los efectos provocados por el tolueno y xilol se asocian a exposiciones continuas donde se producen daños respiratorios, hematológicos, inmunológicos, neurológicos y reproductivos y de desarrollo (ATSDR, 2007; JRC, 2007).

En cuanto la vegetación, se puede ver afectadas las tasas de fotosíntesis y respiración (Jacobson y Boylan, 1973; Pullich *et al.*, 1974). A muy bajas concentraciones la división celular y el crecimiento planctónico también se ven afectados (Narváez, 2005).

La forma en que los BTX dañan a la fauna es variada y compleja (IMP, 2002). De acuerdo a los estudios realizados por Mazari en el 2007, se producen los siguientes efectos adversos: Muerte de los organismos por asfixia, destrucción de los organismos jóvenes o recién nacidos, disminución de la resistencia o aumento de infecciones en las especies, efectos negativos sobre la reproducción y propagación a la fauna y flora marina, destrucción de las fuentes alimenticias de las especies superiores y la incorporación de carcinógenos en la cadena alimentaria.

### **Tolerancia bacteriana:**

La resistencia bacteriana es un fenómeno caracterizado por la refractariedad parcial o total de los microorganismos ante el efecto de los contaminantes, generado principalmente por el contacto indiscriminado con este tipo de compuestos; por lo general el fenómeno de resistencia tiene un sustento genético adquirido que se expresa fenotípicamente por elementos y mecanismos bioquímicos (Sussman *et al.*, 2006).

Se conoce como resistencia natural a los mecanismos permanentes determinados genéticamente no relacionables con las concentraciones o el incremento de los contaminantes en el medio donde las bacterias se desarrollen. Contemplan las transformaciones metabólicas necesarias de espectro extendido o en el caso de las mutaciones de los genes que codifican a las porinas con el consecuente bloqueo del ingreso de los compuestos (De Jawetz *et al.*, 1997).

Mientras que la resistencia adquirida es aquella que se desarrolla por cambios puntuales en el DNA, generados por una mutación oportuna o por la adquisición de esta mediante plásmidos o transposones (Burke, 2000).

Los microorganismos no degradan por lo general de manera instantánea, es necesaria una fase de adaptación, durante este periodo se desarrolla la resistencia relativa, la cual ocurre al presentarse un incremento gradual de la concentración inhibitoria mínima (MIC) a lo largo de un tiempo determinado. Por lo que la susceptibilidad y la resistencia de las bacterias dependen de la concentración (Sussman *et al.*, 2006).

Considerando lo anterior, la tolerancia bacteriana se entiende como el fenómeno en el cual la diferencia entre la concentración bactericida mínima (MBC) y la MIC es muy grande por lo que ocurre relaciones entre MBC/MIC (Eliopoulus, 1997).

Existen tres mecanismos por medio de los cuales una bacteria se hace resistente a los efectos de los compuestos contaminantes tóxicos. Estos mecanismos suelen funcionar de manera simultánea (Sussman *et al.*, 2006).

#### **Inactivación del compuesto:**

Esta se realiza mediante la producción de enzimas capaces de hidrolizar u oxidar los compuestos contaminantes como los hidrocarburos. Se trata de un sistema enzimático amplio, común y eficiente de resistencia frecuentemente producida por bacterias Gram negativas (Sanders *et al.*, 1996).

#### **Alteración del sitio blanco:**

En este mecanismo de resistencia bacteriana se modifican sitios específicos de la anatomía, celular en especial la sub unidad 50s y 30s ribosomales; de esta manera la modificación de las enzimas catalizadoras en la producción de proteoglicanos celulares confieren la resistencia. Las mutaciones presentadas son a nivel cromosómico y no plásmica (Murray, 2000).

#### **Barreras de permeabilidad:**

Este mecanismo de resistencia es el más primitivo que se puede encontrar en las bacterias; incluye tres componentes básicos: la estructura de membrana externa de la bacteria, las porinas (canales inespecíficos) y características fisicoquímicas de los compuestos contaminantes (Trexler *et al.*, 2000).

La permeabilidad de la membrana externa e interna, es el principal mecanismo de defensa para los microorganismos Gram Negativos (Gaynes, 1997). Ya que la existencia de estas capas lipídicas actúa como un mecanismo de resistencia para compuestos hidrófobos (Sahm y Tenover, 1997).

La presencia de proteínas como el glicógeno altera la producción de energía, teniendo como resultado la disminución del paso de hidrocarburos, reduciendo la concentración de este en el medio (Sahm y Tenover, 1997).

### **Identificación fenotípica:**

La identificación microbiana contempla un conjunto de técnicas y procedimientos que se aplican para determinar la identidad de un microorganismo (Vizcarrondo y Gutiérrez, 2008). Tiene como objetivo la asignación de la especie a los aislamientos microbianos (Bou *et al.*, 2012).

Este tipo de identificación se realiza mediante métodos convencionales basados en determinar las características observables de las bacterias tales como su morfología, desarrollo y propiedades bioquímicas y estudios de sensibilidad. En esta metodología es esencial la elección del medio de crecimiento y las condiciones ambientales pues determinan la calidad del cultivo (Isenberg, 2004).

Son técnicas de fácil realización que tienen como fundamento la comparación de las características físicas y metabólicas de bacterias desconocidas con aquellas de cultivo tipo. La fiabilidad de la identificación esta en proporción directa al número de características similares. El inconveniente de esta técnica es que los resultados erróneos en las pruebas primarias pueden conducir a una identificación equivocada (Olmos *et al.*, 2010). Sin embargo Arbeit (1999) y Janda (2001) señalan que estos sistemas de identificación convencional, constituyen métodos útiles para el diagnóstico microbiológico. La identificación fenotípica contempla tres niveles procesamiento (cuadro 3).

Cuadro 3. Criterios metodológicos aplicados a la identificación bacteriana.

Criterio	Fundamento
<b>Características microscópicas.</b>	El estudio se realiza en fresco y tras la tinción, revela la forma y manera de agruparse, la estructura celular y su tamaño. La tinción más utilizada es la Gram que nos permite separar a las bacterias en dos grupos: Gram negativo y Gram positivos.
<b>Características macroscópicas.</b>	Observación e inspección de las colonias. Consiste en la identificación preliminar de características sencillas sobre medios de cultivos solidos después de las 24-48 horas de incubación. Se deben determinar las siguientes características: tamaño, forma, grado de elevación, borde, color, superficie, densidad, consistencia y olor.
<b>Pruebas Bioquímicas.</b>	Permite determinar las características metabólicas de las bacterias objeto de identificación. Algunas de estas pruebas son técnicas rápidas, la mayoría de las pruebas detectan componentes metabólicos o determinan la sensibilidad de un microorganismo a una sustancia dada tras cultivo en medios de identificación que contienen el sustrato a metabolizar.

La identificación del género bacteriano de acuerdo a los criterios fenotípicos y morfológicos (Salgado- Brito, 1998).

### Galerías API:

Son sistemas miniaturizados que permiten la identificación rápida de los microorganismos a través de la realización de diversas pruebas bioquímicas. Este sistema consiste de varios microtubos que contienen diferentes medios de cultivos deshidratados o sustratos enzimáticos de acuerdo al tipo de prueba que se requiere. Entre estas pruebas se pueden encontrar la fermentación de diverso carbohidratos, la determinación de la producción de H<sub>2</sub>S, determinación de la hidrólisis de gelatina, entre otras (Olmos *et al.*, 2010).

Las pruebas se encuentran clasificadas en ensayos convencionales los cuales son inoculados con una suspensión bacteriana salina que reconstruye los medios. Las reacciones que se producen durante el tiempo de incubación tienen como resultado un cambio en la coloración, que pueden ser espontáneos o por la adición de reactivos. Por otra parte cuenta con ensayos de asimilación donde las bacterias crecen si son capaces de utilizar el sustrato correspondiente (figura 4) (Bou *et al.*, 2011).

Los resultados de estas pruebas se expresan en forma numérica, conformando un código resultado de la sumatoria de un triplete de pruebas bioquímicas. El código obtenido se corresponderá a un determinado género o especie de a la información contenida en las bases de datos suministradas por el fabricante en este caso es el software **apiweb™** (BioMérieux, 2010).



Figura 4. Galerías API 20 NE. En la parte superior se encuentran las pruebas con resultados negativos, en la parte inferior se puede observar los resultados positivos.

## Antecedentes:

En el año de 1989, el vertido de Exxon Valdez afectó la bahía de Prince William, Alaska, cubriéndola con más de 237,000 barriles, fue el primer caso donde la biorremediación se empleó como técnica dominante para la limpieza del contaminante a largo plazo (Bragg *et al.*, 1994). En América latina se han realizado estudios en acuíferos contaminados con gasolina por lo que se ha podido determinar que la degradación *in situ* de los compuestos aromáticos, como los BTX (Anderson *et al.*, 1998).

Desde los años noventa PEMEX ha solicitado propuestas para la utilización de la biorremediación como técnica de saneamiento (King *et al.*, 1992). De acuerdo a este marco, se han realizado diversos estudios en la región: Ferrer en 1997 encontró en las zonas pantanosas de Mecocacán, Tabasco, bacterias nativas capaces de bioprocesar hidrocarburos.

Adams *et al.*, (1995) determinaron la actividad microbiana aerobia en suelos de la zona petrolera del estado de Tabasco y Norte de Chiapas; por otra parte Mayo en 1999 evaluó la actividad microbiana tanto aerobia como anaerobia de diversas zonas pantanosas petroleras del estado de Tabasco.

Se demostró la descomposición de hidrocarburos altamente intemperados mediante la estimulación de bacterias nativas en medios líquidos suplementados con hidrocarburos (Wilson *et al.*, 1993). Mientras que Adams y Rodríguez en 1997 compararon la eficiencia de las bacterias nativas y los consorcios bacterianos comerciales en la remediación de la vegetación en zonas pantanosas del estado contaminadas por hidrocarburos, demostrando que la población bacteriana endémica fue más eficiente (Rodríguez, 1997).

Diversas investigaciones realizadas por la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT), han determinado una mayor actividad microbiana en suelos moderadamente contaminados respecto a no contaminados. Además, realizaron estudios donde aislaron microorganismos oleofílicos de varios suelos y lodos de perforación en Tabasco y el norte de Chiapas. (Adams *et al.*, 1995).

## Justificación:

Dentro de las principales industrias se encuentra el sector petrolero, reconociéndose como una fuente de progreso económico y de deterioro ambiental. Afectando principalmente por las actividades pertenecientes al proceso de producción de hidrocarburos provenientes del petróleo (Head & Swanell, 1999).

De acuerdo a la PROFEPA a nivel nacional, durante el periodo de 1993 a 2009 se presentaron alrededor de 1,315 derrames en la zona industrial del Estado de Tabasco. A partir del año 2004, la contaminación por derrames accidentales alcanzo 1.5 millones de galones de petróleo y derivados liberados al ambiente afectando el 0.7% del territorio de este estado (PROFEPA, 2011).

El aumento de la actividad industrial en la Terminal de Marítima de Dos Bocas, operada por PEMEX (SCT, 2013), ha afectado a la Laguna de Mecoacán debido a la cercanía, liberación accidental de hidrocarburos y descargas de aguas residuales por medio del difusor marino (API Dos Bocas, 2011).

Desde su creación, la Administración Portuaria Integral (API) de Dos Bocas se comprometió firmemente con las políticas de preservación del medio ambiente y el cuidado de los recursos naturales desde su ámbito de competencia en coordinación con la comunidad portuaria (Port Guide Dos Bocas,2011). Tras estas medidas tomadas ha mejorado la condición de la laguna, pero a pesar de esto en el estado de Tabasco, ha presentado contingencias y aunque PEMEX ha implementado medidas de contención de daños no se cuenta con un sistema de biorremediación (Port Guide Dos Bocas, 2011).

Es por esta razón que el presente trabajo pretende aislar e identificar microorganismos capaces de sobrevivir a concentraciones elevadas de hidrocarburos y de este modo realizar las investigaciones pertinentes que contribuyan al proceso de saneamiento y remediación.

## Hipótesis:

Se encontrarán bacterias tolerantes a hidrocarburos aromáticos monocíclicos como el benceno, tolueno y xilol en la Laguna de Mecoacán; debido a las condiciones que presentan los microorganismos en el medio.

## **Objetivos:**

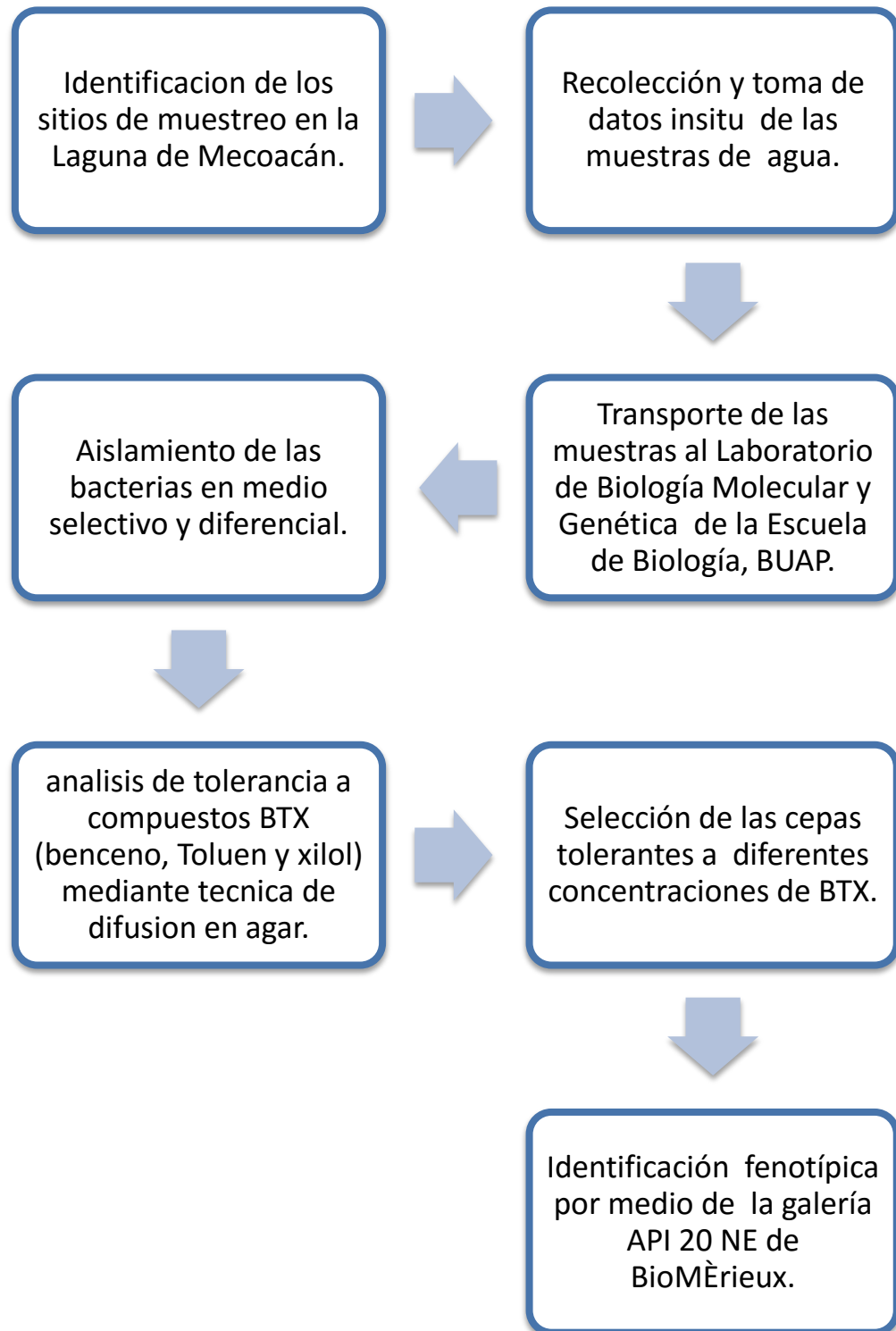
### **General:**

Caracterizar bacterias aisladas de la Laguna de Mecoacán, Paraíso Tabasco con capacidad de resistir concentraciones elevadas de hidrocarburos aromáticos monocíclicos (Benceno, Tolueno y Xilol).

### **Particular:**

1. Aislar las bacterias provenientes de la laguna de Mecoacán mediante medio selectivo y diferencial en placa.
2. Seleccionar las bacterias tolerantes a concentraciones elevadas de BTX mediante la técnica de difusión en agar.
3. Identificar fenotípicamente las bacterias tolerantes a altas concentraciones de hidrocarburos BTX mediante galerías API 20 NE.

## Metodología:



## Área de Estudio:

El estado de Tabasco se ubica en el sureste del país, colinda al norte con el Golfo de México, al sur con Chiapas, al oeste con Veracruz, abarca una extensión territorial de 24,475.24km<sup>2</sup> (Gobierno del estado de Tabasco, 2010). El municipio de Paraíso se ubica dentro de la región de la Chontalpa, al norte del estado de Tabasco (figura 5), entre los paralelos 18°27' de latitud norte y 93°32' de longitud oeste. (INAFED, 1998).

Cuenta con un total de 70,571 habitantes (Censo General de Población y Vivienda, 2000), y sus principales actividades productivas son la agricultura, pesca y la producción industrial; pues cuenta con fábricas de pinole, chocolaterías, hielo, ropa, muebles y la más importante la industria petrolera. (INAFED, 2005).

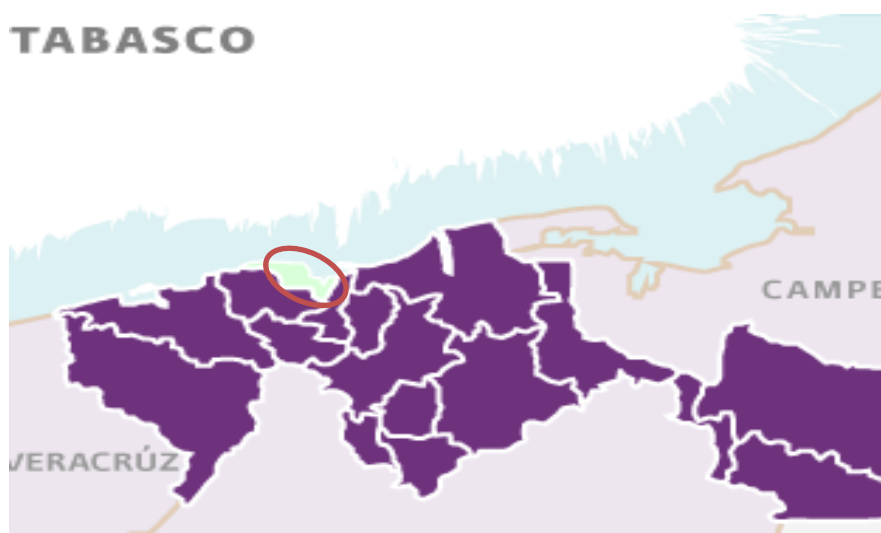


Figura 5. Ubicación del municipio de Paraíso en el estado de Tabasco, se encuentra señalado con un óvalo color rojo y de color verde, INAFED, 2009.

El sistema hidrográfico de este municipio incluye a la Laguna de Mecoacán (Suarez, 1984). Considerada como la región marina prioritaria, pues forma parte de la ecorregión de la planicie costera del Golfo de México (INEGI, 2008). Esta se ubica en el litoral, entre el meridiano 93°04' y 93°14' y los paralelos 18°16' y 18°26' (García, 1973).

Presenta dos lóbulos definidos por la Punta de Tilapa y que desemboca al Golfo de México y el río Seco que termina en la Barra de Dos Bocas (figura 6), se le enlazan las lagunas del Eslabón, la Tinaja, el Carmen o de Ramírez, a través de arroyos del Arrastradero y arroyo Hondo (García- Payro, 1996).



Figura 6. Ubicación de la Laguna de Mecoacán. Descripción de la hidrografía de la laguna, se puede observar la cercanía entre la Terminal Marítima Dos Bocas y la Laguna de Mecoacán. INEGI, 2016.

La Laguna de Mecoacán tiene una extensión de 5,168 ha. Presenta clima cálido húmedo con lluvias todo el año; y una precipitación mayor a 66mm (García, 1973). Se considera como un sistema somero, ya que su profundidad varía desde .30- 2.30 metros, teniendo un promedio de 1 metro de hondura (Castro - Gessner, 1981). La salinidad superficial registrada es de 36 a 4 ppm, aumenta de oeste a este. Este comportamiento es provocado por los aportes continuos de agua dulce de origen continental y al régimen intenso de lluvias (George- Zamora *et al.*, 2003).

Los sedimentos son terrígenos en su mayoría son areno- limosos, presenta una tasa de sedimentación de 1.5 cm por año (Galaviz *et al.*, 1987). El suelo de la costa es de tipo acrisol, solonchak, y, y regosoles (García-Navarro, 2005).

La vegetación característica de la Laguna de Mecoacán es herbácea, donde predominan las plantas halófilas (García - Navarro, 2005). Además se presentan dos tipos de mangle rojos y blancos, de donde proviene la materia orgánica. Con respecto a la fauna, cuenta con una amplia diversidad de aves, tortugas de mar y de río y gran cantidad de pequeños reptiles (Gobierno del Estado de Tabasco, 2005).

### **Muestreo:**

El estudio se desarrolló el mes de junio del 2014, durante la temporada de secas; se colectó agua de las diferentes zonas de la Laguna de Mecoacán, los sitios de muestreo se seleccionaron cada 1.5 km de distancia. Se registraron los siguientes datos: coordenadas, temperatura, pH, salinidad, color, olor y presencia de precipitados.

Para la toma de muestra se utilizaron 2 tipos de frascos: 1) de vidrio con capacidad de almacenar un litro de agua, este fue previamente esterilizado en auto clave a una presión de 15 libras por 20 minutos; 2) recipiente aséptico de tapa de rosca roja. En ambos recipientes las muestras de agua fueron tomadas a un metro de profundidad, abriendo los frascos dentro del agua con el fin de evitar la contaminación (figura 7) (Caripol, 1986).



Figura 7. Toma de muestra de agua a un metro de profundidad. Para la reducción de contaminación ambiental se tuvo que meter en la laguna para la colección de la muestra.

Para el reconocimiento de los frascos fueron etiquetados con la consonante “S” y el número de sitio, acompañado del tipo de zona a la que pertenecía la muestra, indicando si era industrial, urbana o restaurantera y la coordenada del lugar.

Las muestras de agua recolectadas se trasladaron al laboratorio de biología molecular y genética de la Escuela de Biología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (lugar de procesamiento de muestras), por lo que fue necesaria la refrigeración de las mismas a una temperatura menor a los 20°C.

## **Procesamiento de las muestras en el laboratorio de Biología Molecular y Genética:**

Este consistió en tres etapas que comprende a la parte experimental realizada en el laboratorio ubicado en la Escuela de Biología, de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, estas etapas fueron:

1. Aislamiento y preservación de las cepas.
2. Análisis de tolerancia a hidrocarburos BTX.
3. Identificación fenotípica de las bacterias tolerantes.

### **Aislamiento y preservación de las cepas.**

Para la identificación de determinadas bacterias, es necesario utilizar un medio de cultivo, el cual es incubado bajo condiciones apropiadas de atmósfera y temperatura, limitando el desarrollo de poblaciones no deseadas (INE, 2006).

Es por esta razón que se utilizó el medio Mc Conkey, el cual favorece el crecimiento de bacilos Gram negativos, aerobio y anaerobios. En este medio crecen de manera eficiente bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae. Se eligió este medio debido a que las bacterias Gram negativas desempeñan un papel importante en la tolerancia de los hidrocarburos, esto se debe a la presencia de lipopolisacaridos en sus membranas confiriéndoles una ventaja sobre las Gram positivas (Sikkema *et al.*, 1995).

Este medio selectivo se compone de peptonas que aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, y la mezcla de sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos (Mitlab, 2009).

Las bacterias fueron seleccionadas de acuerdo al viraje que obtuvieron tras la fermentación de la lactosa (figura 8), el cual disminuye el pH de la colonia generando colonias de color fucsia a incoloras. Las bacterias se aislaron utilizando un asa en punta. La purificación de las cepas obtenidas consistió en una serie de resiembras en el mismo medio con el fin de obtener colonias de un solo color.

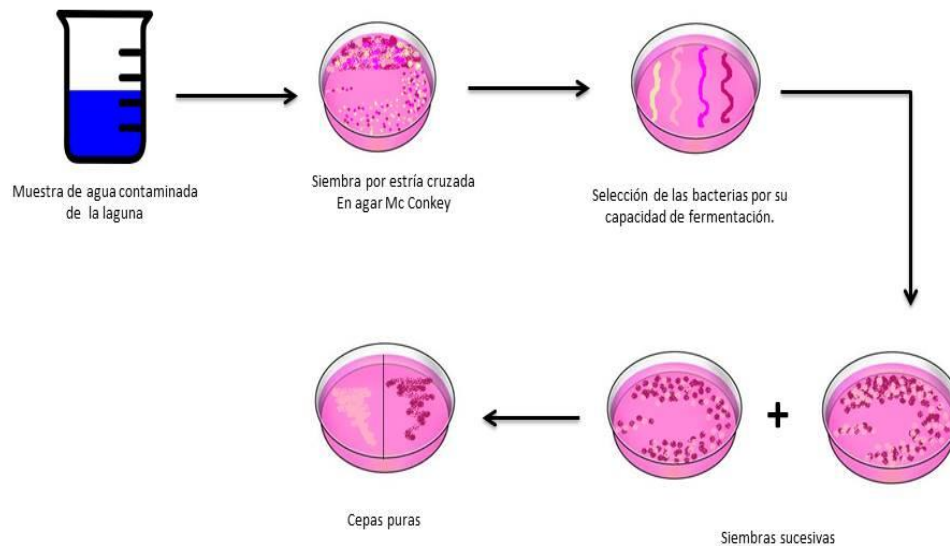


Figura 8. Aislamiento de las bacterias en medio selectivo en placa. Demuestra el cambio de coloración que presentan las bacterias por la fermentación de la lactosa.

Tras el correcto aislamiento de las cepas fue necesario emplear una técnica capaz de mantener la pureza, la viabilidad y el material genético de cada una. Por lo que fue necesario implementar una técnica de preservación mediante la realización de subcultivos en caldo Luria Bertani (LB; 10gr/l de letona, 5 gr/l de extracto de levadura y 10gr/l de NaCl), usando aceite mineral para prolongar la

utilidad de los cultivos de microorganismos, el aceite mineral sirve para prevenir la evaporación del cultivo y para disminuir la tasa metabólica de las bacterias al limitar el suministro de oxígeno y evita la formación de cristales al interior de la célula cuando se llega a tan bajas temperaturas (Hwang,1968; Buell y Weston,1947) .

### **Análisis de tolerancia a hidrocarburos:**

Los ensayos que ayudan a determinar la tolerancia microbiana a cualquier tipo de compuesto orgánico consisten en enfrentar a las bacterias nativas aisladas de las muestras de agua a diversas presiones selectivas (Agudelo y Bernier, 2012), que en este caso consistieron diversos hidrocarburos: benceno, tolueno y xilol.

Este tipo de técnicas son de gran importancia ya que se logran identificar a las bacterias que poseen la capacidad de sobrevivir y usar esos contaminantes como fuentes de energía y carbono (Agudelo y Bernier, 2012).

El método para determinar que las bacterias son resistentes a hidrocarburos, consiste en utilizar un medio mineral que contenga los hidrocarburos específicos de interés como única fuente de carbono y energía (Molina, 2000). En este caso se trabajó con medio Luria Bertani con peptona reducida preparados con agua de la laguna para estandarizar los diversos minerales disueltos en esta (Mejía, 2000).

Debido a la volatilidad de los hidrocarburos probados se empleó la técnica de difusión en agar la cual consiste en poder utilizar a los hidrocarburos como fuente de energía, cuando crecen en un medio con estas características de selección. El petróleo ligero que se impregna en un papel filtro permitiendo que las bacterias hidrocarbonoclastas se alimenten de estos (INE y IMP, 2005).

Se realiza un sembrado masivo en placas con medio LB con peptona reducida (5gr/l de peptona, 5gr/L de extracto de levadura, 10 gr/L de NaCl y 16gr/L de agar). A la cual se le colocaron los sensidiscos, estos fueron impregnados con 5µl de cada disolución ordenados de acuerdo a las manecillas del reloj.

Se dejaron encubar durante 24 horas a una temperatura de 28°C (figura 9), si existía la presencia de un halo que sea mayor a 0.5cm (centímetros) fue considerada como negativo a la resistencia, pero si no había formación de halo era considerada como prueba positiva (figura 10) (Schegel, 1991).

La concentración de inhibición se entiende como la cantidad a la cual la bacteria puede resistir, para identificar este parámetro fue necesario determinar la tolerancia bacteriana a diferentes concentraciones de los hidrocarburos (Anexo 2), (Gómez *et al.*, 2002), en este estudio se probaron las siguientes concentraciones establecidas por Ortega en el 2010: 80,000ppm; 120,000ppm; 160,000 ppm; 260,000 ppm; 420,000ppm y 840,000ppm (cuadro 4). Estas superan los parámetros establecidos por la norma Nom-Em-138Ecol-2002.

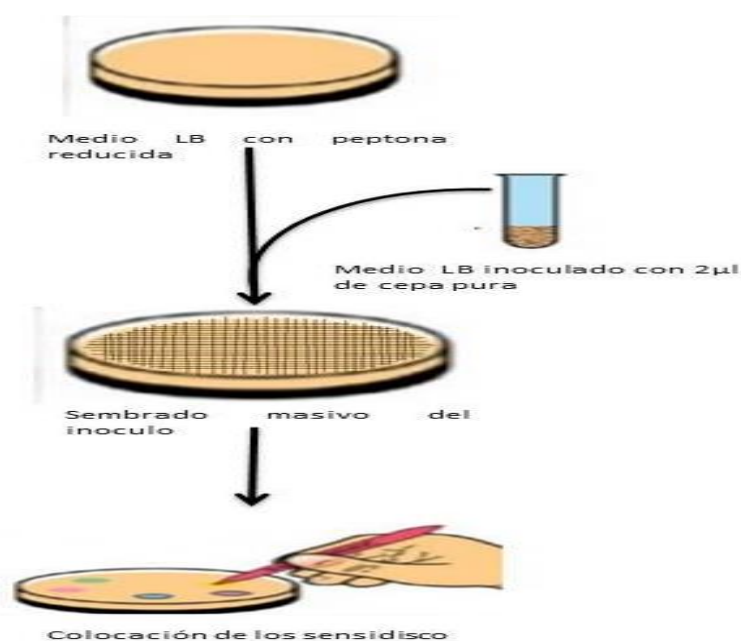


Figura 9. Técnica de difusión en agar para diversas concentraciones, utilización de sensidiscos para la formación de halos de inhibición.

Cuadro 4. Concentración de las soluciones utilizadas.

solución	Cantidad de BTX (mg)	Cantidad de Solvente (mg)	ppm
A	400	4,600	62,500
B	600	4,400	104,166
C	800	4,200	166,666
D	1,300	3,700	241,304
E	2,100	2,900	431,818
F	4,200	800	840,000

Concentraciones mayores a la norma mexicana y similares a las establecidas por Gómez *et al.*, 2002.

Considerando la limitante de esta metodología donde el hidrocarburo no se distribuye de manera uniforme en disco y que los compuestos aromáticos son inmiscibles en agua (Müller, 1985; Schegel, 1991). Fue necesario adicionar 0.02% de tween 20 a las soluciones afectando la polaridad de los compuestos permitiéndoles que se diluyan y se distribuyan de manera homogénea (Ortega, 2010).

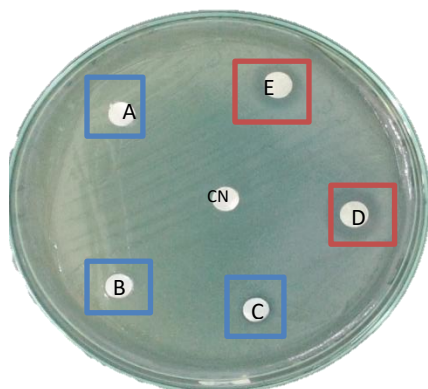


Figura10. Resultados de la prueba de difusión en agar, se considera como prueba negativa la presencia de halos de inhibición (rectángulos rojos), pruebas positivas crecimiento (rectángulos azules); a= 80,000pm, b=120,000ppm, c=160,000 ppm, d=260,000ppm, e=420,000ppm y CN= control.

Para analizar la tolerancia de las bacterias ante el hidrocarburo a 99.95% de pureza, es decir a una concentración 840,000 ppm, se modificó la técnica de difusión en agar; dividiendo la caja en cuatro. Evaluando la reacción de manera independiente de cada especie bacteriana (figura 11) (Quintana *et al.*, 2012). Considerando como resultados positivos la ausencia de halos de inhibición y como prueba negativa la presencia de halos (figura 12).

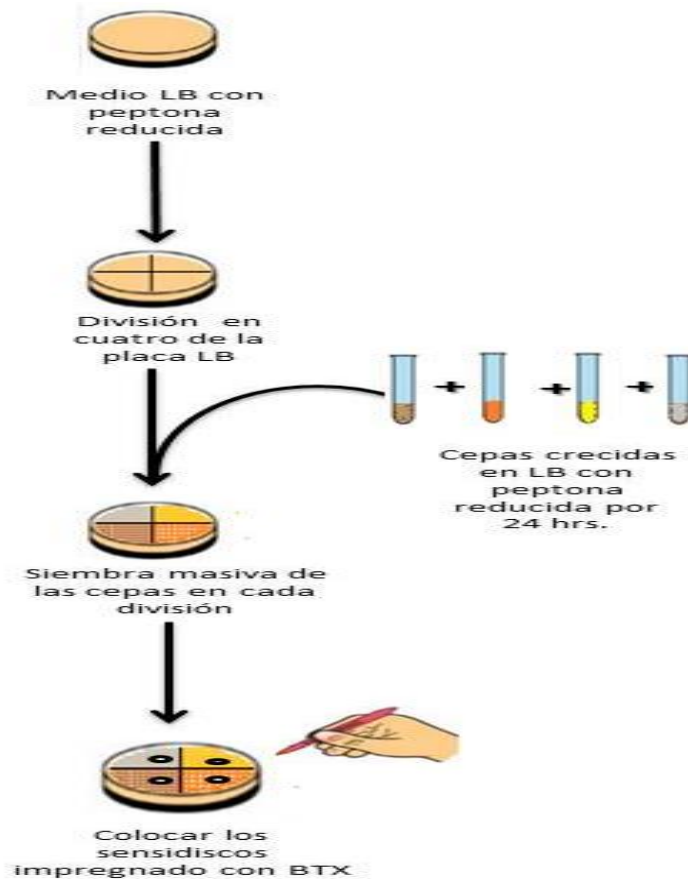


Figura 11. Adaptación de la técnica de difusión en agar para probar la respuesta ante el estímulo de BTX al 99.95% de pureza.

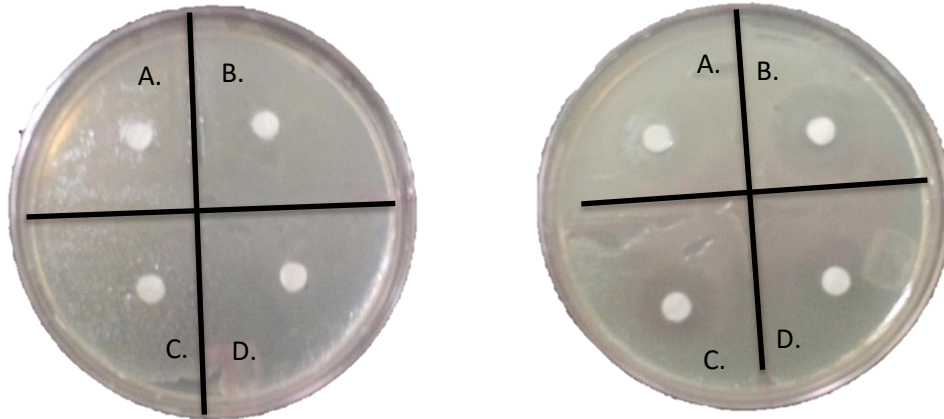


Figura 12. Resultados de las pruebas para la concentración de 840,000ppm. Positivo (lado izquierdo) y resultado negativo (lado derecho) de la prueba de concentración máxima. A, B, C y D =cepas distintas

### Identificación fenotípica:

#### *Caracterización microscópica:*

Se utilizó la tinción de Gram, esta técnica nos permite distinguir a las bacterias de acuerdo al tipo de pared celular que presentan en dos grandes grupos: Gram positivas y Gram negativas, basados en si retienen o no, el colorante primario (cristal violeta). Los organismos que retienen el cristal violeta luego de la adición del agente decolorante, el alcohol, aparecen como azul oscuro o violeta, y se designan como Gram positivos; aquellos que pierden el cristal violeta y se tiñen con el colorante secundario, la safranina, aparecen como rojos y se designan como Gram negativos. Otra ventaja del uso de esta técnica es diferenciar la morfología de la bacteria y por consiguiente clasificarlas como cocos y bacilos (figura 13).

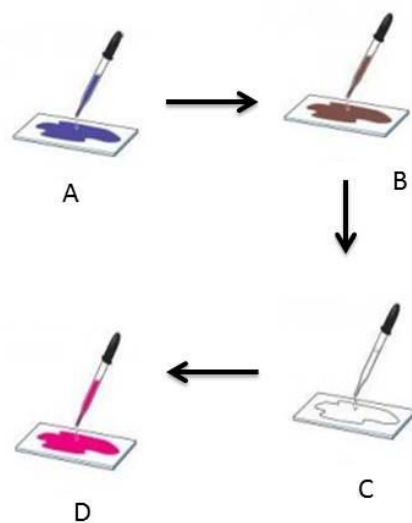


Figura 13. Procedimiento de la tinción de Gram. después de haber fijado la muestra al porta, colocar el cristal violeta (A) durante un minuto y enjuagar, colocar el Lugol (B) durante un minuto y retirar con agua, colocar el alcohol (C) de 30- 60 segundos y enjuagar con abundante agua; por ultimo colocar la safranina (D) de 30-60 segundos, enjuagar y dejar secar.

### Caracterización macroscópica:

Tras la purificación y selección de la cepas tolerantes a altas concentraciones de BTX, las bacterias fueron sembradas en medio solido selectivo Mc Conkey, dejándose encubar durante un periodo de 24- 48 horas a una temperatura de 28 °C., cuando se presentó un crecimiento apropiado de las colonias se determinó la forma, elevación, tipo de bordes, textura y color (figura14) (Bou *et al.*, 2010).



Figura14. Elementos morfológicos utilizados para la descripción de colonias. Principales formas, tipos de elevación y márgenes que presentan las colonias.

### Pruebas bioquímicas:

Para determinar el género y la especie se utilizaron las galerías API 20NE de bioMérieux, es un sistema estandarizado que nos permite la identificación de los bacilos Gram negativos no enterobacterias y no fastidiosos que incluyen los géneros de: *Pseudomonas*, *Acinetobacter sp*, *Stenotrophomonas maltophilia* y otros bacilos Gram negativos no fermentadores. Esta galería combina 8 ensayos convencionales y 12 ensayos de asimilación (Anexo3).

Consta de 20 micros tubos que contienen sustratos deshidratados que son inoculados con una solución salina y con un mínimo de medio en donde las bacterias crecen si son capaces de utilizar el sustrato correspondiente generando un cambio de coloración en la casilla. Por requerimiento del test se realizó la prueba de oxidasa usando reactivo de Kovac (Figura 15).

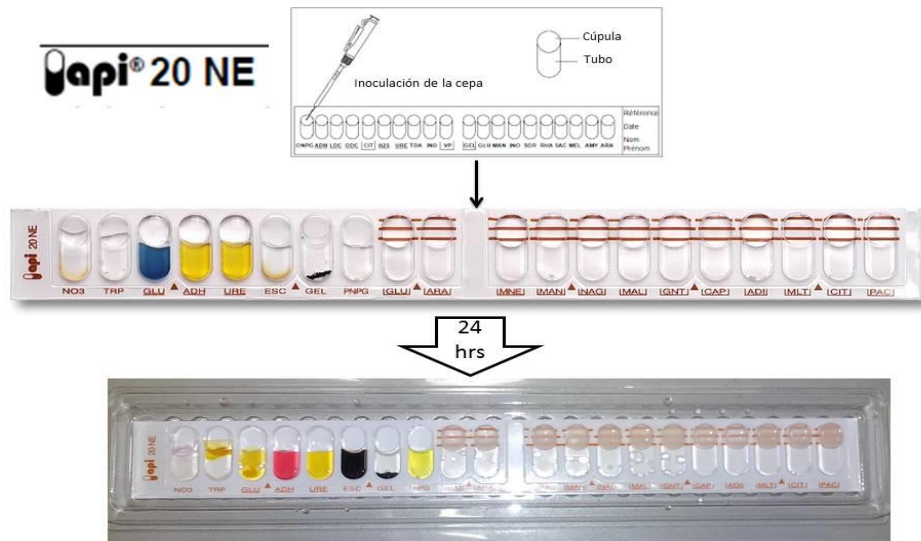


Figura 15. Forma de inoculación de las galerías de pruebas bioquímicas estándar API 20NE de bioMÉriex. Se observa que para rellenar los tubos es necesario utilizar una pipeta, con el fin de evitar burbujas es necesario inclinar la punta de la botella.

## Análisis Estadísticos:

Debido a que nuestros datos no son paramétricos; fue necesario emplear la prueba de Kruskal- Wallis, nos permite comparar dos o más grupos independientes con una variable dependiente de carácter ordinal o continuo.

Se determinó nuestro juego de hipótesis para las pruebas de concentración; donde la hipótesis nula ( $H_0$ ) es que las concentraciones por mínimas que sean no afectan el crecimiento, mientras que nuestra hipótesis alterna ( $H_1$ ) determina que si hay inhibición del crecimiento a bajas concentraciones.

Para la prueba de resistencia ante el estímulo del compuesto puro se maneja el mismo juego de hipótesis nula y alterna que en el caso de la identificación de bacterias tolerantes de diversas concentraciones.

## Resultados y Discusión:

Se muestreo un total de 15 estaciones (Anexo4, Figura 16), en promedio se obtuvo una temperatura de 29°C y un pH de 9 (Anexo 5); estos parámetros son fundamentales para el crecimiento bacteriano (Bracho *et al.*, 2004).



Figura 16. Sitios de muestreo. Se observa que el área muestreada contempla desde la vertiente del Rio Seco hasta la Punta Tilapa. INEGI, 2016.

Las bacterias son microorganismos unicelulares poiquilotermos, sensibles al cambio de temperatura ya que altera el crecimiento, la estabilidad de las proteínas que conforman la membrana y la actividad enzimática interna (Prescott, Harley, Klein 1995), Delimita la velocidad de degradación del petróleo alterando la naturaleza química y física del mismo (Atlas y Bartha, 2002).

La temperatura registrada, se encuentra dentro del intervalo de 20° a 35°C establecida por Van Hamme *et al.*, en 2003, sin embargo en estudios realizados por Bracho y Díaz en 2004; demostraron que a temperaturas altas entre 30° a 40°C, se incrementa al máximo la velocidad del metabolismo de los degradadores de hidrocarburos (Bossert y Bartha, 1984).

Esto se debe a que la temperatura determina la velocidad de las actividades metabólicas de los organismos alterando la biotransformación de los sustratos (Ballena, Gatellier, Voggel, 1998).

El pH registrado, nos permite considerar una mineralización apropiada; los diversos estudios realizados con bacterias tolerantes o degradadoras de hidrocarburos señalan que en el rango de pH de 5,2 a 7,0 se produce la mineralización del hidrocarburo, siendo el pH óptimo 7,0 (Kastner *et al.*, 1998; Bracho *et al.*, 2004); esto se debe a que el pH del medio es modificado por los microorganismos presentes en este, ya que de acuerdo a las fuentes de energía disponibles y su metabolismo, el medio puede acidificarse o alcalinizarse (Balleni *et al.*, 1998).

### **Resultados del procesamiento de las muestras:**

#### **Aislamiento de cepas:**

Se recuperó un total de 51 cepas bacterianas; el número de cepas aisladas, se debe al método empleado, permitiendo solo el crecimiento de un porcentaje limitado de la población bacteriana total. Las especies aisladas son de crecimiento rápido, aerobio estricto o facultativo (Valderrama y Téllez- Sosa, 2000).

Sin embargo en un proceso de biorremediación se desea utilizar bacterias capaces de degradar de manera fácil y rápida los hidrocarburos para lograr el mejor y mayor efecto sobre el área afectada en el menor tiempo posible (Levin, 1997).

### **Análisis de tolerancia a diversas concentraciones de hidrocarburos BTX:**

Tras realizar nuestros análisis estadísticos podemos determinar que solo 23 cepas resultaron tolerantes a los compuestos BTX; siendo el compuesto más tóxico fue el xilol en comparación con el tolueno y el benceno ( $p=0.001$ ) (grafico1).

Esto se debe a la discrepancia que existe entre el tamaño del halo de inhibición ya que para las concentraciones de 80,000ppm y 120,000ppm se registró un tamaño promedio de 0.91y 0.92 cm respectivamente ; mientras que para las concentraciones de 160,000ppm, 260,000ppm y 420,000ppm se registraron tamaños de halo que varían desde 0.97- 1.52 cm.

En comparación con el benceno que registró tamaños de halos para las concentraciones de 80,000ppm y 120,000ppm de 0.007 y 0.121 cm solo mostrando valores de 1.5cm para la concentración de 420,000 ppm; determinándose como el compuesto menos tóxico. Sin embargo el tolueno presento halos de inhibición de 0.30 -0.49 cm para las concentraciones de 80,000ppm, 120,000ppm y 160,000ppm; mientras que para las concentraciones de 260,000ppm y 420,000ppm alcanzo a presentar tamaños promedio de 0.868 – 0.947 cm.

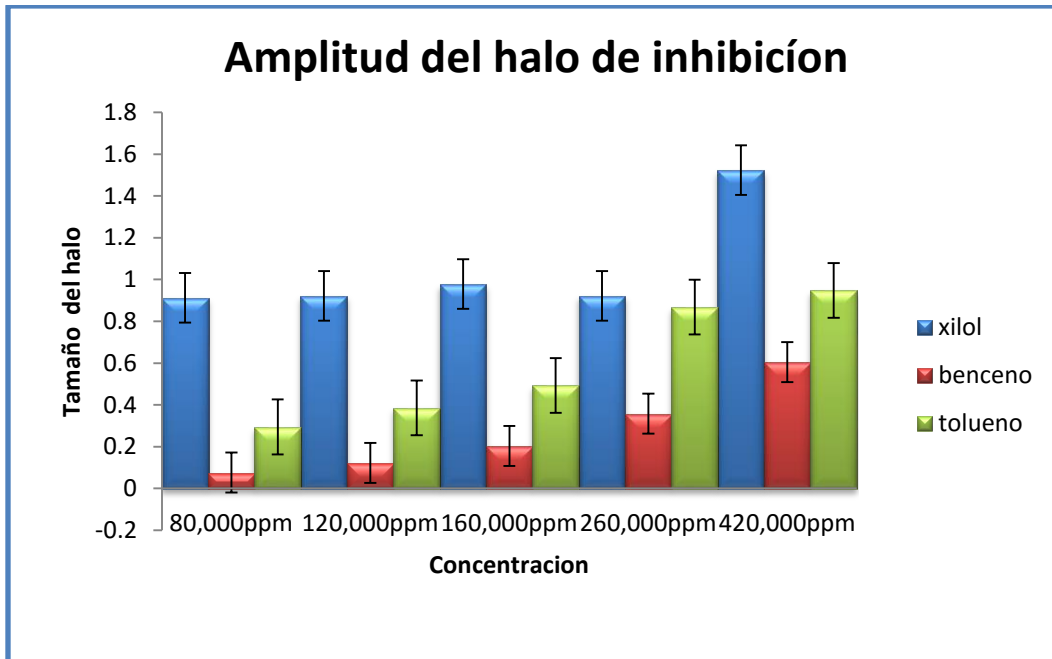


Grafico 1. Comparación del tamaño promedio del halo de inhibición de las 51 cepas respecto a los compuestos BTX. El xilol (azul) presenta halos más grandes en comparación del benceno (rojo) y tolueno (verde).

Se aceptó la hipótesis alterna obteniéndose diferencias significativas para el benceno ( $p=0.001$ ), tolueno ( $p=0.001$ ) y xilol ( $p=0.001$ ), determinándose las concentraciones necesarias para la inhibición del crecimiento, es decir la cantidad del hidrocarburo que pueden tolerar las bacterias (grafico 2).

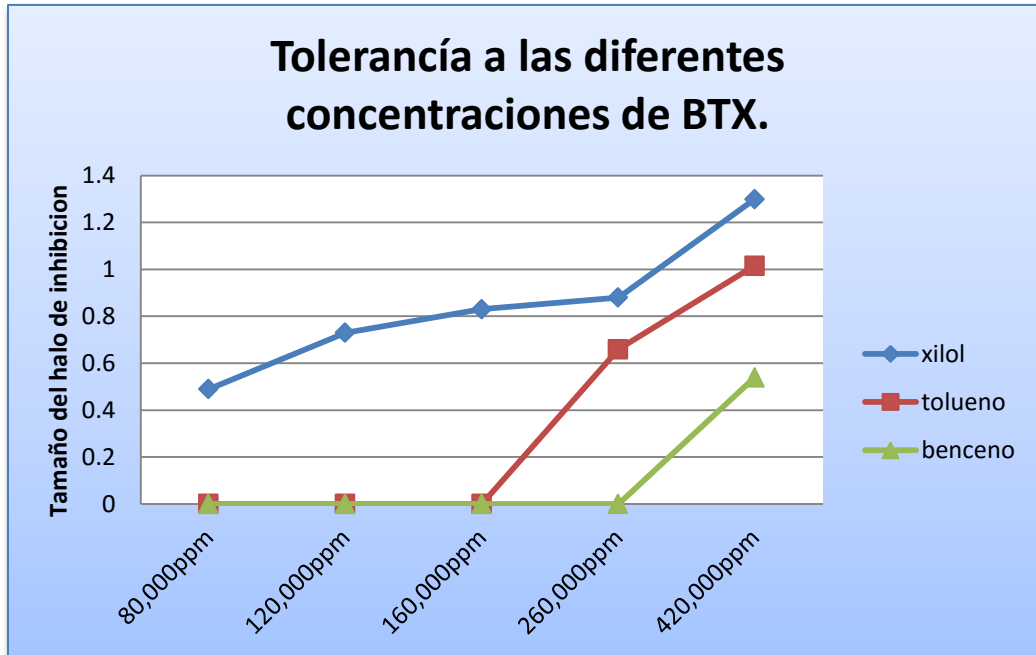


Grafico 2. Medianas de los halos de inhibición de las 51 cepas aisladas en relación a la tolerancia a cada una de las concentraciones. Identificando que para el xilol (azul) la concentración inhibitoria se encuentra en 120,000ppm ( $P=0.001$ ), mientras que para el tolueno (rojo) es 160,000ppm y para el benceno (verde) tolera una concentración de 260,000ppm.

Lográndose identificar las bacterias tolerantes a concentraciones menores de 120,000ppm de xilol ( $p=0.007$ ,  $0.002$ ). Siendo las cepas 1c2b, 8c1b, 13c4 y 13c6b la únicas en crecer a concentraciones de 431,181ppm (figura 17); mientras que las cepas 12c1,12c2a,12c3,12c4,12c5, 13c4b, 13c5,13c6a,14c2,14c5, 15c5 resisten los estímulos de 160,000ppm y 241,304 ppm. Y las cepas 1c3, 1c6a, 1c6b, 2c1, 12c6b, 14c1 solo toleran la concentración de 80,000ppm (figura 18).

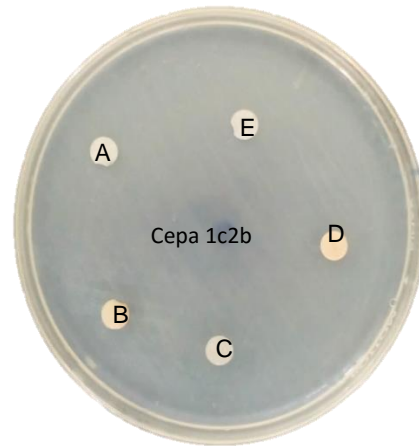


Figura 17. Ceba 1c2b prueba positiva, Muestra crecimiento en todas la concentraciones de xilol, considerándose como bacteria tolerante. A: 80,000ppm, B: 120,000ppm, C: 160,000ppm, D: 260,000ppm, E: 420,000ppm.

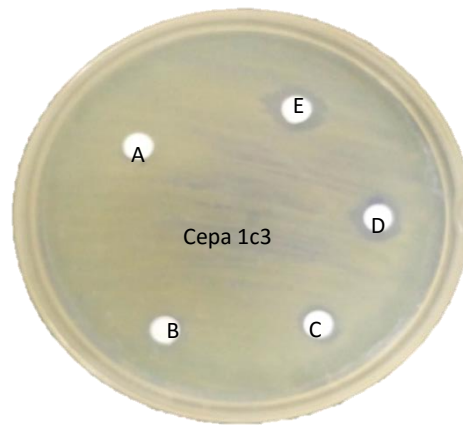


Figura 18. Ceba 1c3 prueba negativa. Mostrando la formación de halos de inhibición a partir de la concentración de 104,166ppm de xilol, corroborando que muestra solo tolerancia a la menor concentración. A: 80,000ppm, B: 120,000ppm, C: 160,000ppm, D: 260,000ppm, E: 420,000ppm.

En cuanto al tolueno se determinó que la concentración necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano es de 160,000ppm ( $p=0.0002$ ), encontrándose que las cepas 1c4a, 13c4b, 13c5, 14c1, 15c1 son las únicas bacterias que no toleraron la presencia del tolueno (figura 20), por otra parte determinamos que las colonias pertenecientes a las cepas 3c1, 4c1b, 7c1, 14c3a, 14c3b, 14c4, 15c2 resistieron el estímulo de 420,000 ppm (figura 19).

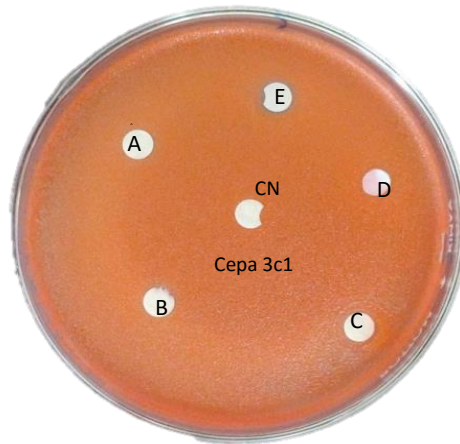


Figura 19. Ceba 3c1 resultados positivos, muestra tolerancia ante todas la concentraciones de tolueno. A: 80,000ppm, B: 120,000ppm, C: 160,000ppm, D: 260,000ppm, E: 420,000ppm y CN: control.

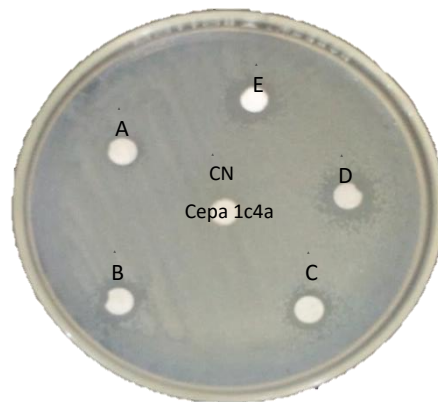


Figura 20. Ceba 1c4a muestra resultados negativos por la presencia de halos de inhibición en todas la concentraciones probadas. A: 80,000ppm, B: 120,000ppm, C: 160,000ppm, D: 260,000ppm, E: 420,000ppm y CN: control.

Sin embargo el benceno mostro mayor cantidad de bacterias tolerantes identificándose a las cepas 1c3, 1c4b, 1c6a, 1c7, 1c8, 2c1, 4c1a, 4c1b, 7c1, 8c1a, 9c1, 12c4, 13c1, 13c3, 13c6a pues se obtuvo una tolerancia a 420,000ppm de benceno ( $p=0.0007$ ) (figura 21) ; marcando solamente a 13c4a y 14c4 como no tolerantes. Logrando identificar que toleran concentraciones menores de 260,000ppm (figura 22).

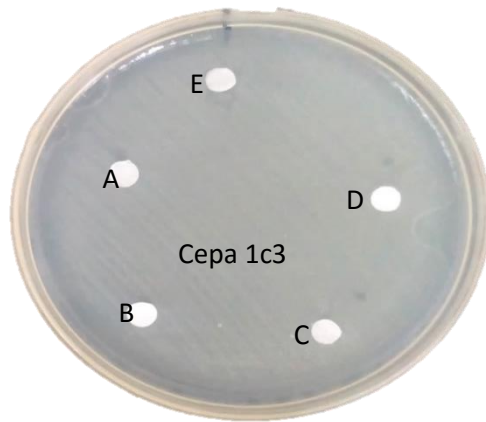


Figura 21. Ceba 1c3 prueba positiva, sin presencia de halos de inhibición mostrando una tolerancia a 431,181ppm. A: 80,000ppm, B: 120,000ppm, C: 160,000ppm, D: 260,000ppm, E: 420,000ppm.

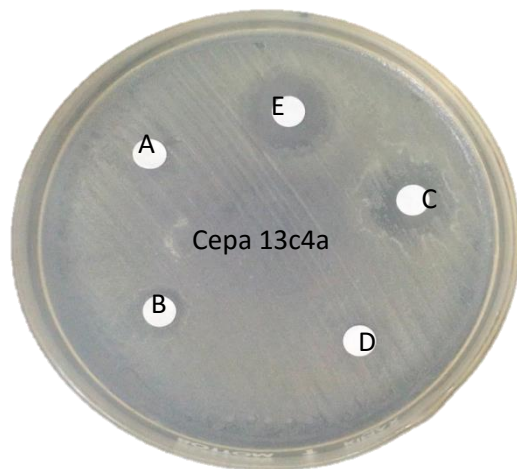


Figura 22. Ceba 13c4a, mostrando la formación de halos de inhibición mayores a 0.5 cm en las concentraciones de 260,000ppm y 460,000ppm. A: 80,000ppm, B: 120,000ppm, C: 160,000ppm, D: 260,000ppm, E: 420,000ppm.

En cuanto a la tolerancia de la concentración de 840,000ppm, se aceptó la hipótesis nula en todos los compuestos BTX ( $p=.4476$ ), ya que no hay diferencias significativas en el grado de tolerancia de las bacterias. Sin embargo se encontraron bacterias que no presentaron halos de inhibición por lo que se aceptaron como tolerantes (cuadro 5).

Cuadro 5. Bacterias que toleraron el estímulo de 840,000ppm.

Compuesto	Cepa Tolerante
Benceno	1c2a, 1c4a, 1c6a, 2c1, 3c1, 4c1a, 4c1b, 9c1, 9c2, 12c3, 12c4, 14c3a, 15c1.
Tolueno	1c1, 1c2a, 1c3, 1c7, 1c8, 3c1, 8c1b, 12c1, 12c2b, 12c3, 12c4, 13c3, 13c4a, 14c4.
Xilol	2c1, 3c1, 4c1a, 4c1b, 9c3, 12c4, y 13c4a.

Fueron seleccionadas debido a su baja rango estadístico con valores de 8 para el tolueno y benceno, siete para el xilol.

Se determinó que el tamaño de halo promedio de las cepas tolerantes para el tolueno fue de  $0.810 \pm 0.60$  cm; de  $0.865 \pm 0.60$ cm para el benceno y en cuanto al xilol una inhibición de  $1.4 \pm 0.82$  cm. Se confirma que el xilol es el compuesto más tóxico en comparación que del benceno y tolueno ( $p=0.02$ ) (grafico 3)

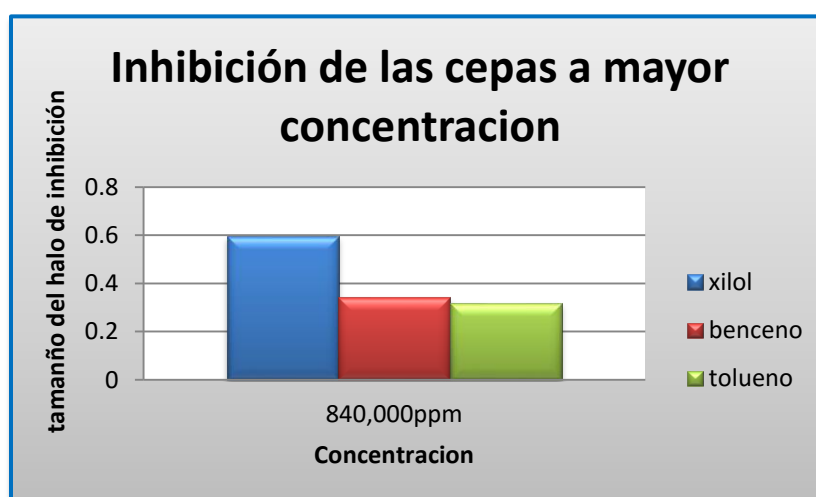


Grafico 3. Tamaño promedio del halo de inhibición de las 23 cepas tolerantes ante el estímulo de 975,000ppm, compuesto con 99.5% de pureza. Demostrando que el xilol (azul) presenta mayor tamaño que el benceno (rojo) y el tolueno (verde).

Las cepas fueron seleccionadas de acuerdo a los resultados de los análisis de varianza, por lo que se encontraron bacterias que toleraron dos compuestos; las cepas 1c2a, 1c4a y 12c3 resisten tolueno y benceno. Mientras que el benceno y el xilol lo toleraron las cepas 2c1, 4c1a y 4c1b (grafico 4). Sin embargo las bacterias más eficientes, pues toleraron la concentración de 840,000ppm de todos los BTX probados fueron las cepas 3c1 (figura 23) y 12c4 (figura 24).

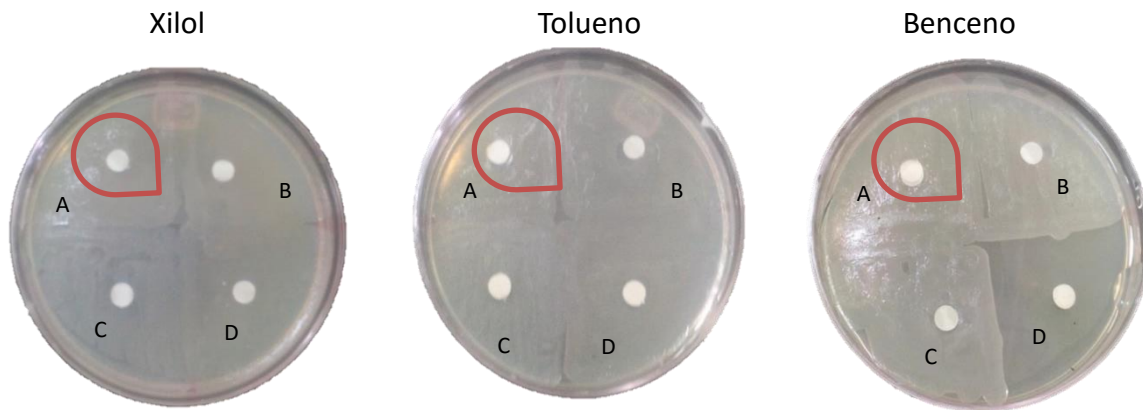


Figura 23. Tolerancia de la cepa 3c1 al xilol (izquierda), tolueno (central) y a benceno (derecho), las figuras rojas nos señalan la ausencia de halo de inhibición. A= 3c1, B=2c1, C=4c1a, D=4c1b

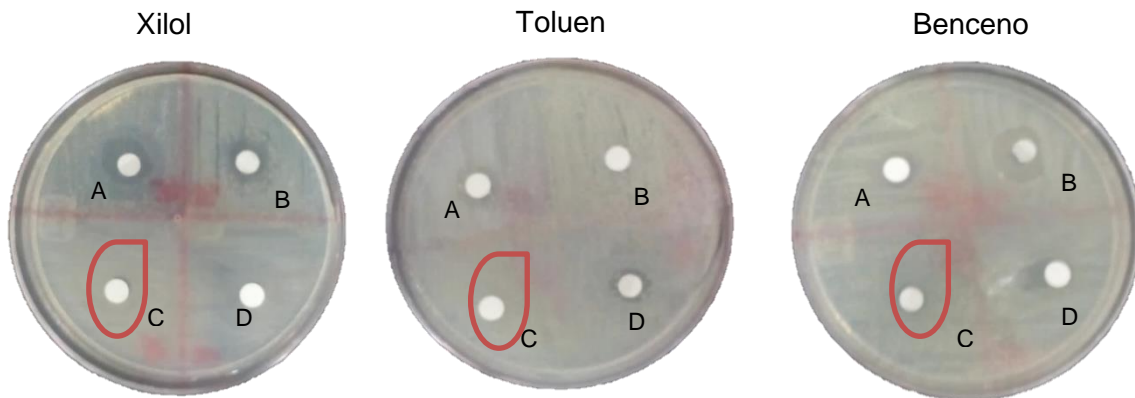


Figura 24. Tolerancia de la cepa 12c4 al xilol (izquierda) benceno (derecha) y a tolueno (central). La figura roja nos señala la falta de halo de inhibición. A= 12c3, B=12c2b, C=12c4, D=12c5.

La industrialización ha generado el aumento de compuestos recalcitrantes cuya resistencia en el ambiente se debe a su composición , que incluye sustituyentes , enlaces saturados e insaturados , anillos aromáticos condensados y elevado peso molecular (Abramowics, 1990). Es por esta razón que los compuestos BTX son difíciles de degradar y utilizar como fuente de carbono (Fritsche, 2002).

La tolerancia de los microorganismos depende del tiempo de exposición y la toxicidad de los compuestos a su vez implica la producción de emulsificante. (Singleton, 1993).La resistencia bacteriana depende de la presencia emulsificante que modifican la hidrofobia de las superficies celulares mediante la liberación de lipopolisacáridos de la membrana al exterior aumentando la adhesión al sustrato hidrófobos, evitando la formación de agregados al entrar en contacto con el medio acuoso (Lomelí y Tamayo, 2000).

En estudios realizados por Coorson (1995), logra identificar que la tolerancia de las bacterias se debe a la formación de gotas de hidrocarburo, haciendo posible la dispersión de la capa de aceite, permitiendo un ataque más efectivo por parte de las bacterias. Lo anterior se debe a la formación de surfactantes, que permiten la transformación del hidrocarburo facilitando de esta manera su exposición a la acción de las bacterias (Rosenberg y Ron, 1997).

La interacción contaminante – microorganismo, toma en cuenta la exposición de las moléculas del contaminante, lo que las vuelve más tóxicas para los microorganismos, por otra parte si se encuentran adsorbidos por algún tipo de sustrato decrece la eficiencia de bacteria para tolerar el estímulo. Por lo que en nuestro estudio la liberación por medio del sensidisco propicia la toxicidad de los compuestos.

En nuestro estudio la fuente de energía tiene disponibilidad limitado debido al carácter hidrófobo de los hidrocarburos, dificultando la reacción ante el estímulo. La escasa formación de micelas debido a la técnica en medio sólido no modifica la solubilidad del medio por la que la viabilidad de las cepas que resultaron tolerantes (Wilderrerr, 1998).

Los hidrocarburos se agrupan de acuerdo a la solubilidad, volatilidad y toxicidad, por lo que se ordenan de mayor a menor en: alcanos lineales> alcanos ramificado> aromáticos ligeros> alcanos cíclicos> aromáticos pesados> compuestos polares (Olson *et al.*, 1999; Harris, 1997).

Debido a su naturaleza la toxicidad de los compuesto BTX (Pothuluri y Cemiglia, 1998) se relaciona con la adición del grupo metilo y los enlaces estable presentes en el anillo aromático, haciendo que en nuestro caso el xilol junto con sus isómeros se el compuesto más tóxico (Baldi *et al.*,2003).

Lo que concuerda con lo descrito con Kanaly y Harayama (2000), donde los hidrocarburos aromáticos sustituidos son más recalcitrantes que sus contrapartes no sustituidas. Por lo que la estructura del xilol, es más compleja pues afectando la acción de las enzimática de las dioxigenasas, encargadas de oxidar los enlaces carbono- carbono de los compuestos aromáticos (Atlas y Bartha, 2002).

En investigaciones realizadas por el Instituto Mexicano del Petróleo (IMP) en el 2002, al igual que en nuestro estudio donde se observó que los compuestos con características químicas poco comunes tienen menor probabilidad de ser toleradas, debido a que los microorganismos no desarrollan vías metabólicas necesarias para degradar dichos compuestos. En el caso de los hidrocarburos aromáticos, el principal problema para degradarlos es romper este anillo aromático que pueden encontrarse en diversas formas.

Walton *et al.*, (1994), determinaron que el crecimiento confiere a las bacterias la capacidad de ser degradadores de contaminantes tóxicos como el petróleo. Siendo la principal característica que difiere a las cepas encontradas.

El control de la temperatura y la humedad fue el mismo que el usado en estudios de Schneider y Billingsley (1990) y Eweis *et al.*, (1998) siendo las adecuadas para establecer la tolerancia a los hidrocarburos aromáticos monocíclicos, siendo compuestos de fácil degradación.

Se determinó que los microorganismos encontrados soportan los hidrocarburos aromáticos de manera aeróbica (Martínez – Nieto, 2012). Esto puede deberse a que de acuerdo a pruebas de oxidasa se encontraron enzimas capaces de realizar la degradación de hidrocarburos aromáticos monocíclicos con 1 y 2 grupos metilos (Carmona *et al.*, 2009).

La oxidación aeróbica consiste en la transformación química de estos compuestos es la eliminación de los grupos funcionales, en este caso la escisión del radical metilo, y la ruptura del anillo aromático; con el propósito de formar compuestos intermediarios centrales más sencillos y por tanto más fáciles de asimilar (Carmona *et al.*, 2009; Fogh, 2008; Harwood y Gibson, 1997; Rittmann, 2001).

Nuestros resultados concuerdan con estudios realizados por Acuña *et al.* En el 2010, donde los hidrocarburos ensayados fueron utilizados por las tres especies de microorganismos estudiados, en este caso los hidrocarburos cíclicos monocromáticos, fueron utilizados como fuente de carbono principal. Las bacterias ensayadas pertenecías a los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* mostraron buenas aptitudes para soportar las diferentes concentraciones a las que fueron sometidas, como es el caso de nuestro estudio.

Por otra parte en el estudio realizado por Christopher W. Kaplan y Christopher L. Kitts (2004), relaciona el dinamismo de la comunidades bacterianas en relación con la concentración de petróleo en el medio ambiente, especifican que la importancia de las comunidades microbianas radica en la maquinaria celular como responsable de la bioconversión de estos contaminantes; en el caso de las comunidades microbianas utilizadas para degradar hidrocarburos

aromáticos son menos eficientes debido a que producen sustancias tóxicas que pueden inhibir los microorganismos degradadores.

El hecho de que las bacterias toleraran de manera más eficiente al benceno se debe a su conformación más simple lo que guarda relación con estudios donde se probaron compuestos hidrocarburos como única fuente en un medio de cultivo similar (Sun *et al.*, 2005; Moneke *et al.*, 2010). Donde la eficiencia se encuentra dada por la relación que existe entre el tipo de ambiente, la dosis aplicada, el tipo de bacteria y las condiciones ambientales o experimentales (Dos Santos *et al.*, 2006; Krzysko –Lupicka y Sudol, 2008; Santos *et al.*, 2009).

Por otra parte en estudios realizados por Bracho *et al.*, 2010, en la prueba de toxicidad las bacterias arrojaron diversos patrones de resistencia a compuestos con crecimiento en los medios que contenían concentraciones menores, por lo que la resistencia o tolerancia estaba dada por la expresión enzimática.

En los ecosistemas las bacterias juegan un papel importante (Horner – Devine *et al.*, 2003), por lo que las poblaciones encontradas en este estudio, se han desarrollado debido a la existencia de hidrocarburo. Esto guarda relación con los estudios de Harayama *et al.*, (1999), en que se encontraron microorganismos con capacidades de atacar hidrocarburos de cadena larga, lo que coincide con lo señalado con Bouchez (1999). Confirmando con los resultados que se han obtenido utilizando cultivos de microorganismos nativos que al estar en contacto con gasolina y diésel han demostrado tener la capacidad degradativa de los BTX (Solano- Serena, 2002).

Guardando relación con los resultados de Ko y Lebeault (1999) donde se aislaron cepas de los géneros *Pseudomonas* y *Rhodococcus*, que al estar en contacto con los hidrocarburos adquirieron la capacidad de tolerarlos. La presencia de bacterias con capacidad de tolerar y degradar hidrocarburos en

yacimientos acuíferos es resultado de un proceso de evolución de las poblaciones microbianas autóctonas, ya que se han adaptado a la presencia de estos contaminantes y proveen la posibilidad de ser utilizadas *in situ* en la descontaminación (Ortiz- Hernández *et al.*, 2001).

La capacidad de metabolizar hidrocarburos, se debe a que las bacterias intercambian información genética, mediante transferencia horizontal dada por mecanismos celulares de transferencia, mejorando su repertorio metabólico que le permitan degradar compuestos xenobioticos (Davison, 1999). Varios estudios indican que los plásmidos pueden persistir y ser transformado entre los integrantes de una comunidad nativa, obteniendo así altas eficiencias de remoción (Newby *et al.*, 2000).

Se comprobó que las bacterias aisladas poseen la capacidad de resistir hidrocarburos monoaromaticos, esto confirma que los microorganismos autóctonos de áreas siniestradas, tienen la capacidad de biodegradar hidrocarburos mono y poli –aromáticos (Solano- Serrana *et al.*, 1999).

La presencia de estas se debe a que las comunidades bacterianas que se encuentran en ambientes contaminados son dominados por organismos capaces de utilizar y tolerar los compuestos tóxicos (Mac Naughton *et al.*, 1999, Rivera-Cruz, 2002), lo que concuerda con estudios de Whiteley y Bailey en el 2001, donde las poblaciones bacteriana resultaron menos diversas en este tipo de ambiente.

El número reducido de bacterias que lograron tolerar los compuestos BTX y sus diversas concentraciones se debe a que la diversidad; se encuentra influenciada por la complejidad de compuestos presentes y por el tiempo que estas poblaciones han estado expuestas (Hubert *et al.*, 1999; Whiteley y Bailey, 2000).

Haciendo que cualquier condición ambiental o nutricional reduzca la probabilidad de crecimiento o duplicación celular y tiene como consecuencia una reacción inmediata en el metabolismo (Ara, 2004; Bracho *et al.*, 2010).

Por otra parte cabe considerar que las bacterias recuperadas de zonas cercanas a campos petroleros; pueden acumular y tolerar los hidrocarburos mediante una serie de adaptaciones (Pellizare *et al.*, 2015). Todas las bacterias seleccionadas son resistentes a los BTX, poseen rutas metabólicas, compuestos intermedios, genes y enzimas claves que intervienen la degradación de los hidrocarburos aromáticos (Carmona *et al.*, 2009).

### Identificación Fenotípica:

Mediante la identificación microscópica se reafirma el hecho de la pureza identificando solo bacilos Gram negativos. En cuanto los rasgos macroscópicos se encontró que las cepas tuvieron una coloración de crema hasta rosa fuerte en medio Mc Conkey, con formas puntiformes, circulares y filamentosa, mientras que se identificó bacterias planas y convexas con bordes enteros y lobulados (Anexo 6),

Tras la identificación de la especie mediante las galerías API 20 NE (Anexo 7), se determinó las especies con una precisión de 98.9% (cuadro 6); las especies más eficientes fueron *Pseudomonas luteola* (figura 25) y *Burkholderia cepacia* (figura 26).

Cuadro 6. Determinación de la especie con relación a la cepa.

Especie bacteriana	Cepa correspondiente
<i>Burkholderia cepacia</i>	1c1, 1c3, 1c4a, 2c1, 4c1a, 4c1b, 9c1, 9c2, 9c3, 12c4, 13c4a, 14c3b.
<i>Burkholderia gladioli</i>	1c2a.
<i>Pseudomonas luteola</i>	3c1, 14c4,
<i>Aeromonas hydrophila</i>	12c1, 12c3.
<i>Rhizobium radiobacter</i>	1c6a, 1c8, 15c1.
<i>Vibrio fluvialis</i>	13c3.
<i>Vibrio alginolyticus</i>	1c7.
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	8c1b.

Especificamos las cepas aisladas por especie.



Figura 25. Galería Api correspondiente a la cepa 3c1, indicando que es la especie *Pseudomonas luteola*.



Figura 26. Galería Api correspondiente de la cepa 12c4a, la cual nos indicó pertenecer a la especie *Burkholderia cepacia*.

De la especies encontradas el 52% corresponde a la especie de *Burkholderia cepacia*, la cual fue la especie con mayor número de cepas, seguida por el 13% el cual corresponde a la especie de *Rhizobium radiobacter*. Mientras que las especies de *Pseudomonas luteola* y *Aeromonas hydrophila /caviae* representan cada una 9% (grafico 5).

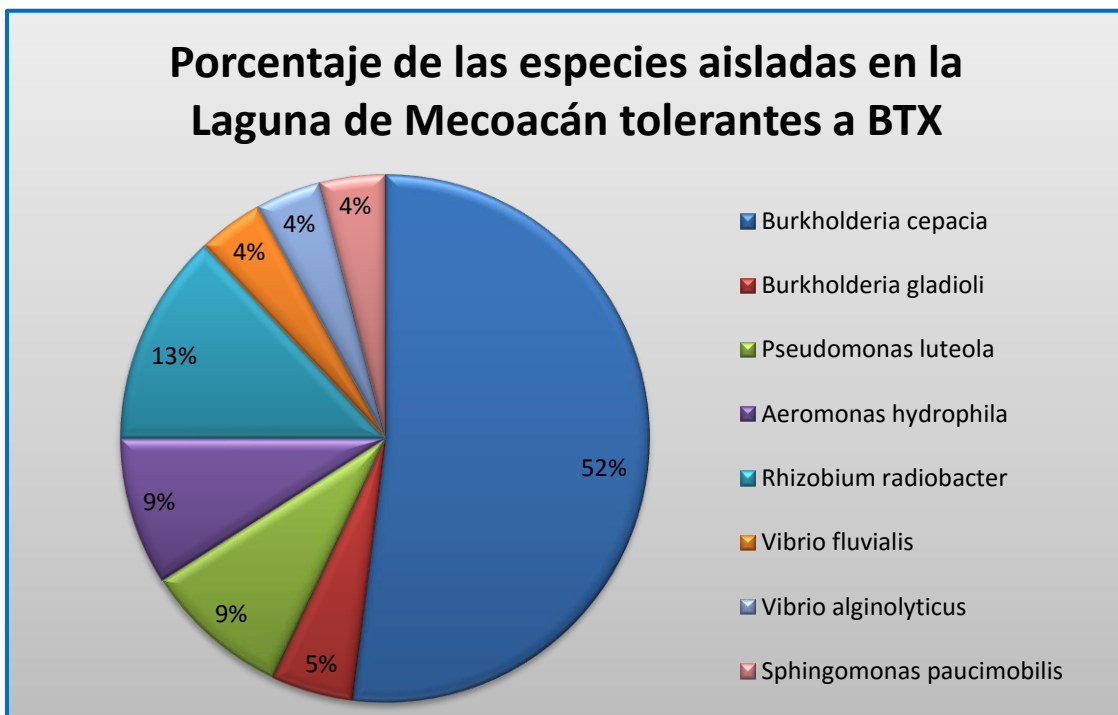


Grafico 4. Porcentaje de las especies encontradas que toleraron los compuestos BTX.

Se ha investigado durante varios años la capacidad degradativas de los microorganismos, los cuales disminuyen la concentración de hidrocarburos en el ambiente; estas bacterias suelen tener diversos mecanismos de acción entre los que destaca la liberación de bioemulsificantes y biosurfactantes, facilitando el acceso microbiano a la fuente de carbono insoluble, los géneros identificados *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium* (Johansen, 2002).

Las pruebas de biodegradabilidad permitieron determinar la capacidad de crecimiento de los diferentes aislados después de la adición de los BTX, durante el estudio se trabajó con la fase estacionaria por lo que se comprobó la capacidad hidrocarbonoclásticas de las cepas seleccionadas, aunque el 52% fue *Burkholderia cepacia*, no todas demostraron tener la misma eficiencia y la misma resistencia ante los estímulos (Harayama *et al.*, 1999; Alamri, 2009; Mulet *et al.* 2011; Perez y Hernández, 2013).

De acuerdo a los géneros reportados por Hernández y Martínez (2002), Pucci y colaboradores (2010), los géneros que identificamos pertenecen a las bacterias tolerantes a hidrocarburos, demostrando mayor eficiencia los géneros *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Sphingomonas* y *Rhizobium*.

Estos han descrito como abundantes en la naturaleza con capacidad de soportar altas concentraciones de hidrocarburos aromáticos sin requerir controles estrictos de pH y temperatura, pudiendo emplearlas en condiciones ambientales adversas (Pellizare, 2005; Finnerty *et al.*, 1983; Fuente- Mayor y Rodríguez 1992; Williams *et al.*, 1995; Kastner *et al.*, 1998; Kanaly y Harayama 2000; Díaz, 2001; Johsen *et al.*, 2002).

Se debe de considerar que la presencia de estos géneros en nuestras muestras está influenciada por la contaminación proveniente de las descargas de aguas residuales de las comunidades aledañas a la Laguna de Mecoacán. Similar a lo reportado por, Bonert y colaboradores en el 2006 (Hernández y Martínez, 2001; Vázquez y Páez, 1987).

Se corrobora lo descrito por Pérez- Ortigosa (2013), donde los géneros *Aeromonas* sp., *Comamonas*, *Pseudomonas* sp., *Shewanella* sp. Y *Vibrio* sp., fueron eficientes en la degradación de hidrocarburos simples. Además se identificó al género *Pseudomonas* el más eficaz en la utilización de los BTX como fuente de carbono (Chueca, 2011). Su eficiencia se debe a la capacidad que tiene para eliminar por acción enzimática las cadenas compleja, donde la modificación química del hidrocarburo (Arutchelvi *et al.*, 2007).

El aceptar la hipótesis nula, nos hace sugerir las cepas identificadas pueden ser eficaces en los tratamientos tras un periodo de acostumbramiento, concordando con Martínez y colaboradores (2012) estipulo que la sensibilidad y tolerancia está dada por la expresión enzimática y esta es transmisible.

Se realizó la prueba de oxidasa catalasa, permitiéndonos identificar la actividad de peroxidasas y oxigenasas, lo que le permite a nuestras bacterias la oxidación de las diferentes fracciones del hidrocarburo, siendo en nuestro caso el radical metilo, alterando las propiedades de los compuestos haciéndoles susceptibles a la transformación (Valderrama , Téllez – Sosa, 2000). Muchos estudios han revelado que debido a la baja solubilidad de estos tienen mayor nivel de tolerancia y degradación ( Burland y Edwards, 1998 ; Cervantes *et al.*, 2001 ; Franzmann *et al.*, 2002).

El tolueno es un hidrocarburo fácil de degradar, se han reportado la existencia de cepas puras capaces de degradar este compuesto, entre las cuales encontramos *Thauera aromatic*, algunas cepas de la familia de *Pseudomas* sp. , *Azoarcus tolulyticus* y *Mycobacterium* sp.; la cuales transforman al tolueno en compuestos menos recalcitrantes mediante la oxidación (Leuther y Heider, 1998; Hubert *et al.*, 1999; Tay *et al.*, 1998) y la reducción en condiciones metanogénicas (Dolfing *et al.*, 1990, Lovley y Lonergan, 1990, Beller *et al.*, 1996). La tolerancia del tolueno consiste en fragmentar la unión del grupo metilo y la utilización del benzoato como producto intermedia en su ruta metabólica (Villatoro *et al.*, 2002;

Beller y Spormann, 1999). Siendo similar a nuestro estudio solo en los géneros de *Pseudomonas*.

En cuanto al xilol hay que tener presente que no se han reportado cepas de tolerar o degradar los tres isómeros a la vez, identificándose a la o-xileno como el más recalcitrante (Haner *et al.*, 1995). El fundamento de su tolerancia es similar al del tolueno (Sufrid *et al.*, 1994). Este compuesto y sus tres isómeros son procesados por un cometabolismo asociado al tolueno, siendo transformado por las bacterias nitrificantes como *Burkholderia cepacia*, pero no se ha podido identificar las rutas metabólicas exactas para degradar los metilbenzoatos (Harwood y Gibson, 1997).

La degradación del benceno es similar a la de los otros aromáticos. El benceno es digerido por las dioxigenasas que provocan la ruptura del núcleo por hidroxilación de manera que la molécula sea químicamente más accesible (Rittman, 1994).

Por otra parte la diferencia entre el total de bacterias tolerantes se debe a la diferencia entre la tolerancia y las tasas de crecimiento y degradación de los contaminantes en estado puro (Green *et al.*, 2000). La similitud que existe entre las cepas que resultaron tolerantes tanto al benceno como al tolueno se debe a que estos compuestos en la naturaleza se encuentran mezclados, por lo que el tolueno es degradado antes que el benceno, en un proceso denominado biodegradación preferencial (Franzmann *et al.*, 2002).

La identificación de *Pseudomonas luteola*, nos permitió inferir que existe una metabolización rápida de los hidrocarburos aromáticos evitando la formación del smog en la zona pues presentan las dioxigenasas necesarias para la descomposición de compuestos aromáticos (Samanta; Singh; Jain, 2002). Reduciendo la tasa de evaporación (Li *et al.*, 2001).

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Acuña; Pucci; Pucci en 2010 donde se probaron tres cepas de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Gordonia*, los cuales mostraron buenas aptitudes para soportar los diferentes tipos de estrés, es decir las concentraciones de mono aromáticos. Donde la familia

*Pseudomonas* tiene mayor índice de tolerancia y degradación, el cual en nuestro estudio nos contempla las especies *Pseudomonas luteola* y *Burkholderia cepacia* (Ghalazi *et al.*, 2004).

Para el género de *Burkholderia*, que en nuestro estudio se contemplan las especies de *Burkholderia cepacia* y *Burkholderia gladioli*, han sido reportadas para la biorecuperación de suelos contaminados con residuos tóxicos (Hillyard, 2005). Siendo un microorganismo con una gran variabilidad fenotípica y genotípica (Caldera *et al.*, 2005); son muy numerosas las publicaciones en las que se hace referencia a la capacidad para sobrevivir e incluso degradar diversos derivados del petróleo y otros halogenados (Fuente- Mayor y Rodríguez, 1997; Lee y Kim, 1997; Ashok *et al.*, 1995; Lebkowska *et al.*, 1995; Whyte *et al.*, 1997; Kallastu *et al.*, 1998; Moller *et al.*, 1998; Bieszkiewics *et al.*, 1998; Hubert *et al.*, 1999; Isken *et al.*, 1999).

La tolerancia de hidrocarburos por parte de *Pseudomonas luteola* no solo se debe a la presencia de enzimas sino también a la liberación de biosurfactantes (García-Junco *et al.*, 2003). En la literatura científica se encuentra que el género *Pseudomonas* puede utilizar como fuente de carbono los hidrocarburos tolueno y xileno (Ghalazi *et al.*, 2004), como así también fenantreno, antraceno, naftaleno y pireno (Marcon *et al.*, 2007).

Nuestros resultados también coinciden con los resultados de Balkwill *et al.*, 1997; donde se lograron aislar y comprobar la tolerancia de microorganismos del género *Sphingomonas*, los cuales se encontraban en contacto con hidrocarburos y que utilizan como fuente principal de energía. Del mismo modo, coincidimos con Bitton (1984) donde el 20% de las poblaciones de microorganismos que se encuentran en ecosistemas contaminados por BTX son capaces de tolerarlos. Entre los géneros documentados se encuentran: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Benekea*, *Pseudomonas*, *Vibrio*.

Los trabajos realizados por E. Parales y colaboradores (2000), en el que estudiaron el comportamiento de las bacterias en contacto con los contaminantes mostraron que la respuesta de crecimiento se debe a la inducción del tolueno; al igual que en nuestro estudio la diferencia en el nivel de tolerancia entre las cepas de la misma especie se debe al contacto directo con la superficie de la célula microbiana, se tiene como resultados altos niveles de tolerancia, por lo que las bacterias suelen atacar al hidrocarburo, propiciando la dispersión y haciéndolo más susceptible, no obstante, el aumento de la disponibilidad puede aumentar el grado de toxicidad (Coorson, 1995).

Por otra parte hay que contemplar que uno de los géneros más eficientes en nuestro estudio fue el género *Vibrio*, el cual fue identificado como bacterias capaces de degradar hidrocarburos aromáticos (Geiselbrecht, 1996); esto concuerda con estudios realizados por Hernández y Martínez (2001), donde encontraron cepas pertenecientes a este género en sedimentos contaminados con hidrocarburos, donde se reafirmó la capacidad para transformarlos cuando se les proporciona como única fuente de energía.

En general los resultados obtenidos en nuestro estudio nos permite determina la presencia de bacterias que toleran los compuestos BTX, comprobándose una dinámica de tolerancia en la cual la actividad microbiana reacciona ante el hidrocarburo. Determinando que a periodos prolongados las cepas siguen creciendo convirtiendo los hidrocarburos complejos. Alterando la concentración inicial de estos (Harayama *et al.*, 1999).

Los resultados anteriores son coincidentes en cuanto la presencia bacterias tolerantes con los encontrados por diversos autores (Vereca *et al.*, 2000; Britton, 1984; Andrade *et al.*, 1994) para microorganismos aislados en medio acuíferos contaminados por hidrocarburos.

## Conclusiones:

- Se aisló un total de 51 bacterias y solo 23 demostraron algún tipo de tolerancia a los compuestos BTX.
- Las cepas tolerantes a los 3 BTX pertenecen a la familia ***Pseudomonadaceae***, y corresponden a las especies de *Pseudomonas luteola* y *Burkholderia cepacia*.
- El xilol es el más tóxico por lo que las bacterias solo toleraron una concentración de 120,000ppm mientras que para el benceno se registró una tolerancia al 260,000ppm y el tolueno se registró una tolerancia de 160,000ppm.

## Perspectivas:

- Determinar la tolerancia a hidrocarburos complejos alifáticos y compuestos como gasolina, diésel y crudo.
- Evidenciar la presencia de enzimas oxidasas y peroxidasas en crecimiento con medios suplementando con indol.
- Corroborar que se metabolicen los hidrocarburos y sean transformados en compuestos inocuos, mediante la cuantificación por las técnicas de respirometría y cromatografía de gases.

## Bibliografía:

1. Anderson R.T, Rooney- Varga J.N., Graw C.V. y Lovley D.R. 1998. Anaerobic benzene oxidation in reduction zone of petroleum – contaminated aquifers. *Environmental Scientific and technology*. 32: 1222-1229.
2. ATDRS. 2011. División of Toxicología and Environmental Medicine ToxFAQs: Facts Set. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. En [www.atsdr.cdc.gov](http://www.atsdr.cdc.gov).
3. Yáñez-Arancibia.1982. Usos, recursos y ecología de la zona costera. *Ciencia y desarrollo*. Marzo - Abril , 43: 58- 63
4. Acuña, A., Pucci, G.N., Pucci, O.H. 2010. Caracterización de tres cepas bacterianas capaces de fijar nitrógeno y biodegradar hidrocarburos aisladas de un suelo de la Patagonia. *Ecosistemas* 19(2):000-000.
5. Acuña, A., Pucci, O., Pucci, G. 2008. Caracterización de un proceso de biorremediación de hidrocarburos en deficiencia de nitrógeno en un suelo de la Patagonia Argentina. *Ecosistemas* 17:85-93.
6. Adams SRH, Domínguez RVI, García HL .1999. Potencial de la biorremediación de suelo y agua impactados por petróleo en el trópico mexicano. *Terra* 17: 159-174.
7. Aguirre, E. A., Chacón - Rodríguez ,K., Ferrer- Caballero ,N., Campos- Herrera, S., Iparraguirre - Tandaypan, W., Guevara- González, J.2013. Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* MBL-03 y degradación de tres concentraciones de dodecibenceno sulfonato de sodio. REBIOLEST. *Revista científica de estudiantes . Facultad de ciencias biológicas -Universidad Nacional de Trujillo*. 1(1):4-10.
8. Alcántara M.C.. (1992). *Química de Hoy . México : Mc Graw- Hill Latinoamericana de México ,S.A.*
9. Alexander M. 1994 *biodegradation and biorremediation Academic press . sandiego .302.*
10. Alvarez- Manilla A., Martínez G.E., Flores M.A., .2002. metodología para saneamiento de acuíferos profundos por derrame de hidrocarburos. Sanfandila, Qro.: Publicación técnica.
11. Alvarez-Lagareta, T. G. Gold-Bouchot Y O. Zapata-Perez. 1994. Hydrocarbon Concentrations in Sediments and Clams (*Rangia cuneata*) in Laguna de Pom, Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 52: 39-45.
12. Anderson M.P. y Wossner W.W. 1991: *Applied Grounwater Modeling . Simulation of flow and advective transport .Academic Press (Inc) Usa.*
13. Anderson TA, Guthrie EA, Walton BT .1993. Bioremediation in the Rhizosphere. Plant roots and associated microbes clean contaminated soil. *Environ. Sci. Technol.* 27: 2630 -2636.
14. Annweiler E., Michaelis W., y Meckenstock R.U. 2001. Anaerobic cometabolic conversion of benzothiophene by a sulfate-reducing enrichment culture and in a tar-oil contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5077–5083.
15. Annweiler, E., Michaelis, W. y Meckenstock, R. U. 2002. Identical ring cleavage products during anaerobic degradation of naphthalene, 2-methylnaphthalene, and tetralin indicate a new metabolic pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 852 - 858.
16. API. 2004. *API Interactive LNAPL Guide: Versión 2.0. The American Petroleum Instituto.*
17. API. 1996. *A guide to the assessment and remediation of underground petroleum releases. API Publication 1628, Third edition.*
18. [Apiweb@2010](mailto:Apiweb@2010). [CD-ROM] *BioMérieux.*
19. Appelo, C.A.J y Postema D.1993. *Geochemistry , Grounwater and pollution. A.A Balkema Rotterdam Netherlands.*
20. Aranda - Cierol N. 2001.*Alimentando al mundo, envenado al planeta; eutrofización y calidad de agua .Avance y Perspectiva. 20:293-303.*
21. ARPEL. 1992. *guía para el control de la contaminación de los tanques de almacenamiento subterráneo del petróleo. Documento preparado por ALCONSULT International. Como parte del proyecto ambiental ARPEL. Canadá 101.Associates Inc. En: <http://www.appliedhydrology.com/soil.htm>. (Consulta: septiembre 7 de 2005).*
22. ASTM E1219-98. 1998. *Standard guide for accelerated site characterization for confirmed or suspected petroleum release.*
23. ATDRS. 2011. *Division of Toxicology and Environmental Medicine ToxFAQs: Facts Sheet. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. En [www.atsdr.cdc.gov/](http://www.atsdr.cdc.gov/).*
24. Atlas R, Bartha R.2002. *Ecología microbiana y microbiología ambiental. Ed. Addison Wesley. Madrid. 561p.*
25. Atlas RM .1997. Bioestimulación para mejorar la biorecuperación microbiana. In: Levin M, Gealt MA (eds). *Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos. Selección, estimación, modificación de microorganismos y aplicaciones. Tejero IM, Amieva VJ (trads) McGraw-Hill/Interamericana de España. Madrid, España. 338.*
26. Atlas, R., Saylor, G., Buralage, R., Bej, A.,.1992. Molecular approaches for enviromental monitoring of microorganisms. *Bio Techniques.* 12:706-717.
27. ATSDR- PUBLIC HEALT STATEMENT (1989). *Agency for toxic substances and diseases registry. ATSDR Atlanta Georgia.*
28. Baciocchi, R., Chiavola, A. & Gavasci, R. 2005. Ion exchange equilibria of arsenic in the presence of high sulphate and nitrate concentrations, *Water Sci. Technol.: Water Supply*, 5 (5), 67-74.
29. Bakker, G.R., Frampton, C.M.,Jaspers, M.V., Stewart, A., Walter,M., 2002. Assessment of microbial diversity and activity during bioremediation of crude oil-contaminated soll with different treatments .*J Microbiol Biotechnol.* 17:67-73.
30. Balch W. E., Schoberth S., Tanner R. S., Wolfe R. S. 1977. *Acetobacterium*, a new genus of hydrogen-oxidizing, carbon dioxide-reducing, anaerobic bacteria. *Int J Syst Bacteriol.* 27:355-361.
31. Banerjee, S., Datta, S., Chattopadhyay, D. & Sarkar, P. 2011. Arsenic accumulating and transforming bacteria isolated from contaminated soil for potential use in bioremediation. *Journal of Environmental Science and Health part A., 46, 1736-1747.*
32. Barra R, Castillo C, Machado JP. 2007.*Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the South American Environmental. Rev Environ Contam Toxicol.*191:1–22
33. Bates R. G. 1983. *Determination of pH, Wiley, New York.*
34. Batterman S, Jia C, Hatzivasilis G 2007. Migration of volatile organic compounds from attached garages to residences: A major exposure source. *Environ. Res.* 104:224-240.
35. Bayona J.M., Fernández P. y Alboigas J.1993. Oxy -substituted PAH's in urban atmospheric particules an coastal marine sediments. *Polycyclic Aromatic Compunds.* 3:371-378.

36. Bazot, S. and Lebeau, T. 2008. "Simultaneous mineralization of glyphosate and diuron by a consortium of anoxygenic mineralization of glyphosate and diuron by a consortium of three bacteria as free- and/or immobilized-cells formulations". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77 (6): 1351-1358.
37. Beneduzi, A., Peres, D., Vargas, L., Bodanese-Zanettini, M., Passaglia, P. 2008. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. *Applied Soil Ecology* 39:311-320.
38. Bergmann, F.D., Selesi, D., y Meckenstock, R.U. 2011. Identification of new enzymes potentially involved in anaerobic naphthalene degradation by the sulfate reducing enrichment culture N47. *Arch. Microb. iol.* 193:241-250.
40. Betancourt, D., Loveless, T., Brown, J., Bishop, P. 2008. Characterization of diazotrophs containing Mo independent nitrogenases isolated from diverse natural environments. *Applied and Environmental Microbiology* 74:3471-3480.
41. Bongkeun S, Norberto J, Palleroni M, et al. 2000 Isolation and characterization of diverse halobenzoate-degrading denitrifying bacteria from soils and sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(8): 3446-3453.
42. Borges - Walmsley M.I., McKeegan K.S, and Walmsley A.R. 2003. Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *Biochem. J.*, 376:313-338
43. Borho, M. & Wilderer, P. 1996. Optimized removal of arsenate(III) by adaptation of oxidation and precipitation processes to the filtration step. *Water Sci. Technol.*, 34 (9), 25-31.
44. Bossert I. and Bartha R. 1984. The fate of petroleum in soil ecosystems. In: *Petroleum microbiology*. Edited by R. M. Atlas, New York.
45. Bossert I. D. and Kosson D. S. 1997. Measurement of hydrocarbon degradation in soils. In: *Manual of environmental microbiology*. C. J. Hurst, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, L. D. Stetzenbach, M.V. Walter (Eds). American Society for Microbiology Press, pp.738-752.
46. Botello A., G. Ponce, A. Toledo, G. Díaz y S. Villanueva. 1996. Ecología, recursos costeros y contaminación en el Golfo de México. En *Golfo de México, contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias*. Universidad Autónoma de Campeche. EPOMEX, Serie Científica, México, 2da Edición. Pp. 25-44.
47. Botello A.V, G.G. Diaz, F.S. Villanueva y S.L. Salazar, 1993. Presence of PAH's in coastal environments of the south-east Gulf of Mexico. *Polycyclic Aromatic Compounds*, Vol. 3, Suppl. 397-404.
48. Botello, A, Rendón-von Osten, J, Gold-Bouchot, G y Agraz-Hernández (Eds.). 2005. *Golfo de México. Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*, 2da. Edición. Univ. Autón. De Campeche, Univ. Nal. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología. 696 pp.
49. Botello, A., Díaz, G. y Rueda-Quintana, L., 1998. Persistent organochlorine pollutants in coastal environments of Southeast Gulf of Mexico, Mexico. *Proc of International Sym, on Marine Pollution*, Monaco. Pp. 116-117.
50. Bracho M., Diaz L. & Soto L.M., 2001. Degradación de hidrocarburos aromáticos por bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo en el estado de Zulia, Venezuela. *Laboratorio de Microbiología Acuática. Departamento de Biología. Facultad Experimental de Ciencias Universidad del Zulia. Venezuela*. 9p.
51. Brehm- Stecher B.F. and Johnson E.A., 2003. Sensitization of staphylococcus aureus and escherichia coli to antibiotics by sesquiterpenoids nerolidol, farnesol bisabolol and apritone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 3357-3360.
52. Brenner, D.J., Krieg, N.R., Garrity G.M. and Staley, J.T. 2005. *The Proteobacteria*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume II. Michigan.
53. Butler, C., Mason, J., 1997. Structure-function analysis of the bacterial aromatic ring-hydroxylating dioxygenases. *Adv Microb Physiol.* 38:47-84.
54. Caballero - Aquino. T. 2007. Captación de agua de lluvia y almacenamiento en tanques de ferrocemento. *Manual Técnico. Instituto Politécnico Nacional*.
55. Carbajal, J. L., & Chavira, D., 1985. La contaminación en los sistemas lagunares- estuarios de las costas mexicanas. *Elementos* 10(3): 58-64.
56. CARIPOL, 1986. Programa para el análisis de hidrocarburos del petróleo en sedimento y organismos marinos. Talleres de entrenamiento para el análisis de hidrocarburos del petróleo en organismos y sedimentos marinos. Puerto Morelos, México, 25.
57. Carmona, M., Zamarro, M.T., Velázquez, B., Durante-Rodríguez, G., Juárez, J.F., Valderrama, J.A., Barragán, M.J., García, J.L., y Díaz, E. 2009. Anaerobic catabolism of aromatic compounds: a genetic and genomic view. *Microbiol Mol Biol R.* 73(1): 71-133.
58. Carrillo, A., Puente, M.A., Castellanos, T. and Bashan Y. 1998. *Manual de laboratorio Aplicaciones biotecnológicas de Ecología Microbiana*. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
59. Castro -Gessner, S.A., 1981. Determinación de hidrocarburos en sedimentos recientes en el ostión (*Crassostrea virginica*) de la Laguna de Mecoaacán, Tab. Tesis profesional, Facultad de Ciencias UNAM, México. 34p.
60. Centro Nacional de Prevención de Desastres (CENAPRED) 2001. Diagnóstico de peligros e identificación de riesgos de desastres en México: Atlas Nacional de Riesgos de la República Mexicana. Secretaría de Gobernación, México.
61. Cepeda-González, M.F., G. Gold-Bouchot, J.L. Montero-Muñoz y O. Zapata-Pérez. 2011. Integración de un libro sobre los estudios realizados sobre contaminantes orgánicos persistentes. Instituto Nacional de Ecología. México.
62. CNA. El agua en México: retos y avances. CNA. México. 2000.
63. CNA. Estadísticas del agua en México. Síntesis México. 2005.
64. Contreras E.,F., 1993. *ecosistemas costeros mexicanos*. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. UAM. 415p Cookson, J., 1995. *Bioremediation Engineering: Design and Application*. McGraw-Hill Inc., New York, USA
65. . Coordinación de turismo y Zonas Costeras- INE. La calidad del agua en los ecosistemas costeros de México. SEMARNAP /INE. Córdoba BG.2005. Estudio de adaptación y selección de bacterias en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo crudo. Tesis de licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias Zona Orizaba - Córdoba. Universidad Veracruzana, Córdoba Veracruz 90pp.
66. Cossa, D., M. Picard-Berube y J.P. Gouygou, 1983. Polinuclear aromatic hydrocarbons in mussels from the estuary and northwestern gulf of St. Lawrence. Canadá.

67. Bulletin of Environmental , Contamination and Toxicology 31:41-47 Countway RE, Dickhut RM, Canuel EA .2003. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) distributions and associations with organic matter insurface waters of the York River, VA Estuary. Estuary Org Geochem;34:209-24.
68. Cuervo, J. 2007. "Interacción del glifosato (Roundup®) con la biota microbiana del suelo y comportamiento de este herbicida en tres suelos del Tolima-Colombia, bajo condiciones controladas" (Maestría en Agronomía), Bogotá, Universidad Nacional de Colombia.
69. Deole S, Phadke KM, Kumar A .2004. Benceno, tolueno and xileno (BTX) pollution in ambient air: a case study. J. Environ. Sci. Eng. 46:15-20.
70. Diaz I. 2001. Caracterización del perfil plasmídico, susceptibilidad a antibióticos y a Metales pesados en bacterias hidrocarbonoclasticas aisladas de sedimento marino. Trabajo de grado para optar al grado de magister scientiarum en microbiología. Facultad Experimental de ciencias. Universidad del zulia. 262 .
71. DOF.2002. NOM-021-RECNAT-2000 Especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios de muestreo y análisis. Diario Oficial de la Federación. Martes 31 diciembre del 2002. 75 pp.
72. DOF .2005. NOM-138-SEMARNAT/SS-2003. Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación. Diario Oficial de la Federación. Miércoles 29 de marzo del 2005. 43 pp.
73. Dos Santos, J., Siqueira, J. O. and De Souza, F. M. 2006. "Effects of glyphosate on soybean symbiotic microorganisms, in culture media and in greenhouse". Pesquisa Agropecuária Brasileira, 41: 285-291.
74. Ebru C. 2004. Isolation and characterization of aerobic denitrifiers from agricultural soil. 29: 9 -14.
75. EFSA .2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain (Question No. EFSA-Q-2007-136). EFSA Journal. 724: 1-114. en: <http://www.efsa.europa.eu/inf/informacionambiental/Pages/index-sniarn.aspx>.
76. Environmental protection agency (epa) usa. 1998. Test methods for Evaluating solid waste-physical / chemical methods. Us -epa sw-846, 3 rd edition. 322 p.
77. EPA .1986. Method 418.1 mod. Petroleum Hydrocarbon, Total Recoverable. Environmental Protection Agency. Spectrophotometric Infrared. 8 pp.
78. Eriksson M, Sodersten E, Zhongtang Y, Dalhammar G, Mohn W. 2003. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons at low temperature under aerobic and nitrate-reducing. Appl Environ Microbiol. 69(1): 275.284 .
79. Eweis, J.B., S.J. Ergas, D.P. Chang y E.D. Schroeder. 1998. Bioremediation Principles. McGraw-Hill International Editions. 296 pp. Finnerty w.r., k. Shocley y h. Ataway. 1983. Microbial desulfurization of fossil Fuels: a review. Biotechnol. Bioeng. Symp. 16: 205-221.
80. Flavio B, Leonardo F, Zachia M 1999. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading Rhodococcus ruber and Rhodococcus erythropolis. Rev Microbiol 30: 231-236.
81. Foght, J. 2008. Review anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons: pathways and prospects. J Mol Microbiol Biotechnol.15: 93-120. Fortunato MS, Rossi S, Korol S, Aquino MD. Eficiencia de la degradación Microbiana de Tensioactivos: Algunos Factores Condicionales. Acta Farm. Bonaerense. 1998; 17 (2): 105-111.
82. Fuchs, G. 2008. Anaerobic metabolism of aromatic compounds. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1125: 82-99.
83. Funke, T., Han, H., Healy-Fried, M.L., Fischer, M. and Sconbrum, E. 2006. "Molecular basis for the herbicide resistance
84. Furukawa K, Hirose J, Suyama A, Zaiki T, Hayashida S.1993. Gene components responsible for discrete substrate specificity in the metabolism of biphenyl (bph operon) and toluene (tod operon). J Bacteriol 175:5224-5232of Roundup Ready crops". Proceedings of the National Academy of Sciences, 103:13010-13015.
85. Galaviz et al. . 1987. Morfología , sedimentos e hidrodinámica de las lagunas Dos bocas y Mecoacan Tabasco , Mexico. Anales de Instituto de Ciencias del Mary Limnologia,UNAM. 14(2): 109-123.
86. Galaviz, S.A., E.M. Gutiérrez y A.R. Castro, 1987. Morfología, sedimentos e hidrodinámica de la laguna de Dos bocas y Mecoacán Tabasco, Mexico. Anales del Instituto de Ciencias y Limnologia , UNAM, 14(2): 109-123 Garcia F.1973. Modificaciones al sistema de clasificación de Köppen (adaptacion para las condiciones de Republica Mexicana). Instituto de Geografía, UNAM. Mexico. 246p.
87. García-Navarro, E. 2005. Edafología. Área de edafología y Química Agrícola, facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura. España. 157 pp
88. Ghazali, F., Rahman, R., Salleh, A., Basri, M. 2004. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. International Biodeterioration and Biodegradation 54:61-67
89. Gibson D, Parales R .2000. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. Curr Opin Biotechnol 11: 236-243.
90. Gobierno del Estado de Tabasco.2005. Municipios de Tabasco: Paraíso , La laguna de Mecoacán . En [www.tabasco.gob.mx](http://www.tabasco.gob.mx)
91. Gómez- Ullate, E., Bayón, J.R., Castro, D., and Ocupe S. J..2008. Eficiencia of MPN Method to indicate hydrocarbon biodegradation processes within permeable pavements.. Edinburgh, Scotland, UK: 11th International Conference on Urban Drainage
92. Gonzales Alonso S,m Esteban- Hernández J, Valcárcel Rivera Y, Hernández - Barrera V, Gil de Miguel A. Contaminación del agua en fuentes cercanas a campos petrolíferos de Bolivia. Rev. Panamá Salud pública . 2010; 28(4):235- 43.
93. González Alonso S, Esteban-Hernández J, Valcárcel Rivera Y, Hernández-Barrera V, Gil de Miguel A.2010. Contaminación del agua en fuentes cercanas a campos petrolíferos de Bolivia. Rev. Panam Salud Publica, 28(4), 235-243
94. Guevara, S. 2004. La invención del Golfo de México. En Diagnóstico Ambiental del Golfo de México, SEMARNAT , INE , Instituto de Ecología, A.C., Harte Research Institute for Gulf of Mexico Studies, México. Pp. 1083-1108.
95. GUIA. 2007. hidrocarburos aromaticos . España : Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo
96. Hamamura, N., Olson, S.H., Ward, D.M.,and Isken, W.P. 2006., Microbial population dynamics associated whit crude-oil biodegradation in diverse soils .Appl. Environ. Micobiol., 72:6316-6324.

97. Harayama S, Reik M, Wubbolts K, Rose R, Leppik R, Timmis K .1989. Characterization of five genes in the upper-pathway operon of TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* and identification of the gene products. *J Bacteriol* 171: 5048–5055.
98. Harwood C.S. y Gibson J. 1997. Shedding light on anaerobic benzene ring degradation: a process unique to prokaryotes?. *J. Bacteriol.* 179: 301-309
99. Hawley G..2001. *The Condensed Chemical Dictionary*. New York: Jhon Witley & Sons. Heider, J., y Fuchs, G. 1997. Microbial anaerobic aromatic metabolism. *Anaerobe*. 3: 1-22.
100. Hernández NLC .2005. Estudio de adaptación y selección de hongos en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo crudo. Tesis Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias Zona Orizaba-Córdoba. Universidad Veracruzana. Córdoba, Veracruz. 112 pp.
101. Hernández, J., Bashan, L., Rodríguez, D., Rodríguez, Y., Bashan, Y. 2009. Growth promotion of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by the nitrogen-fixing, plant growth-promoting bacterium *Bacillus pumilus* from arid zone soils. *European Journal of Soil Biology* 45:88-93.
102. Hinsinger P (1998) How do plant root acquire mineral nutrient? Chemical processes involved in the rhizosphere. *Adv. Agron.* 64: 225-265.
103. Hoekstra, A.Y. y P.Q. Hung .2002. Virtual water trade: A quantification of virtual water flows between nations in relation to international crop trade. *Value of Water. Research Report Series No.11*, IHE Delft, The Netherlands.
104. Hoekstra, A.Y. 2003. Virtual water trade between nations: a global mechanism affecting regional water systems. In *Global Change Newsletter. International Geosphere – Biosphere Programme*. Disponible en: <http://www.wateryear2003.org/>.
105. Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. & Williams, S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Group 4, pp. 93-94, table 4.39, pp. 151-157. 9a ed. USA: William & Wilkins.

## Anexos:

### 1) Efectos para la salud de los btx de acuerdo a su concentración:

Concentración de benceno	Efecto
4,8-15 mg/m <sup>3</sup> (1,5-4,7 ppm)	Detección de olor (La alerta por el olor es insuficiente).
160-479 mg/m <sup>3</sup> (50-150 ppm)	Exposiciones de 5 horas a esta concentración pueden causar dolor de cabeza, desfallecimiento y debilidad.
1597 mg/m <sup>3</sup> (500 ppm)	Exposiciones de 60 minutos a esta concentración pueden conducir a síntomas de enfermedad
2236-9583 mg/m <sup>3</sup> (700-3000 ppm)	Puede causar somnolencia, mareos, taquicardia, dolor de cabeza, temblores, confusión e inconsciencia.
A partir de 9583 mg/m <sup>3</sup> (a partir de 3000 ppm)	Puede provocar envenenamiento agudo, caracterizado por la acción narcótica del benceno en el SNC.
23957 mg/m <sup>3</sup> (7500 ppm)	Exposiciones de 30 minutos a esta concentración pueden ser fatales.
31943-63886 mg/m <sup>3</sup> (10000-20000 ppm)	Exposiciones de 5 a 10 minutos a esta concentración puede provocar la muerte.

Concentración de tolueno	Efecto
8 mg/m <sup>3</sup> (2,14 ppm)	Detección de olor.
188-377 mg/m <sup>3</sup> (50-100 ppm)	Fatiga o dolor de cabeza. Probablemente no se produzca deterioro observable del tiempo de reacción o de la coordinación.
753 mg/m <sup>3</sup> (200 ppm)	Irritación suave de los ojos y de la garganta.
377-1130 mg/m <sup>3</sup> (100-300 ppm)	Se pueden producir indicios perceptibles de incoordinación en periodos de exposición de hasta 8 horas.
1130-3014 mg/m <sup>3</sup> (300-800 ppm)	Se pueden esperar grandes indicios de incoordinación en periodos de exposición de hasta 8 horas
2260-3014 mg/m <sup>3</sup> (600-800 ppm)	Causa fatiga, náuseas, confusión y ataxia en exposiciones de 3 horas.
5650 mg/m <sup>3</sup> (1500 ppm)	Probablemente no es mortal durante periodos de exposición de hasta 8 horas.
15067 mg/m <sup>3</sup> (4000 ppm)	Probablemente perjudicaría rápidamente al tiempo de reacción y a la coordinación. Exposiciones de una hora o más pueden conducir a depresión del SNC y posiblemente a la muerte.
26368 mg/m <sup>3</sup> (7000 ppm)	Se ha observado amnesia y estupefacción
37669 mg/m <sup>3</sup> (10000 ppm)	Causa anestesia general
37669-113006 mg/m <sup>3</sup> (10000-30000 ppm)	En pocos minutos aparece la depresión del SNC, exposiciones prolongadas son mortales

Concentración de xileno	Efecto
130-1520 mg/m3 (30-350 ppm)	Se ha asociado con anorexia, gusto dulce en la boca, náuseas y vómitos.
434-2997 mg/m3(100-690 ppm)	Pueden producir efectos leves en la memoria a corto plazo y en el tiempo de reacción, leves mareos, somnolencia, dolor de cabeza y vértigo.
3909 mg/m3 (900 ppm)	IDLH (Inmediatamente peligroso para la vida y la salud; 30 minutos)
Mayor de 13031 mg/m3 (mayor de 3000 ppm)	Pueden causar depresión del SNC con confusión y coma.
Mayor de 26061 mg/m3 (mayor de 6000 ppm)	Dos muertes se produjeron por la exposición a vapor concentrado durante una exposición de más de 12 horas
43436 mg/m3 (10000 ppm)	Concentración mínima letal en aire durante una exposición de 18 horas.

## 2) Calculo de partes por millón (ppm) de las soluciones:

Debido a que las soluciones se prepararon inicialmente en porcentaje fue necesaria la transformación a ppm. Por lo que se tuvo que calcular la masa en función del volumen y de la densidad. Donde se entendió que la densidad es igual a la masa entre el volumen. Obteniéndose la masa es igual a la densidad por volumen.

$$d = \frac{\text{masa}}{\text{volumen}} = \frac{m}{V}$$

Tras calcular la masa se procedió a calcular las partes por millón mediante las dos siguientes formula:

$$ppm = \frac{m_{\text{soluto}}(\text{mg})}{V_{\text{solucion}}(\text{L})} = \frac{m_{\text{soluto}}(\text{mg})}{m_{\text{soluto}}(\text{Kg})}$$

Resultado los siguientes cálculos:

Calculo de ppm de los BTX.				
%	solución (kg)	solvente (mg)	soluto (mg)	ppm
99.95	0.005	800	4200	840000
50	0.005	2900	2100	420000
30	0.005	3700	1300	260000
20	0.005	4200	800	160000
15	0.005	4400	600	120000
10	0.005	4600	400	80000

3) Lista de pruebas bioquímicas que contempla la prueba API 20  
NE:

Test	Componente activo	Reacción / enzimas
<b>No<sub>3</sub></b>	Nitrato potásico	Reducción de nitratos a nitritos
		Reducción de nitratos a nitrógeno
<b>Trp</b>	L- triptófano	Formación de indol
<b>Glu</b>	D-glucosa	Fermentación de glucosa
<b>Adh</b>	L-arginina	Arginina di hidrolasa
<b>Ure</b>	Urea	Ureasa
<b>Esc</b>	Esculina citrato férrico	Hidrolisis de β-glucosidasa (esculina)
<b>Gel</b>	Gelatina (origen de bovino)	Hidrolisis (proteasa gelatina)
<b>Pnpg</b>	4-nitrofenil-βd-galactopiranosida	B-galactosidasa
<b>Glu</b>	D- glucosa	Asimilación glucosa
<b>Ara</b>	L-arabinosa	Asimilación arabinosa
<b>Mne</b>	D-manosa	Asimilación manosa
<b>Man</b>	D-manitol	Asimilación manitol
<b>Mag</b>	N- acetil- glucosamina	Asimilación n-acetil-glucosamina
<b>Mal</b>	D-maltosa	Asimilación maltosa
<b>Gnt</b>	Gluconato potásico	Asimilación gluconato potásico
<b>Cap</b>	Ácido caprico	Asimilación ácido caprico
<b>Adi</b>	Ácido adipico	Asimilación ácido adipico
<b>Mlt</b>	Ácido málico	Asimilación asido málico
<b>Cit</b>	Citrato trisodico	Asimilación citrato trisodico
<b>Pac</b>	Ácido fenilacetico	Asimilación ácido fenilacetico
<b>Ox</b>	Citrato oxidasa	Citocromo- oxidasa

#### 4) Datos de los sitios de muestreo:

Sitio	Nombre del sitio	Coordenadas UTM.	Profundidad	Zona
A	Desembocadura río seco	15q 0479947 2037622	1.58mts	Urbana
B	Entrada a puerto ceiba	15q 0480727 2036096	1.50mts	Urbana
C	Puerto ceiba	15q 0481347 2036053	1.66mts	Urbana
D	Torno largo	15q 0482570 2038261	1.53mts	Industrial
E	Embarcadero la Madrid	15q 0483836 2037056	1mts	Urbana
F	Puerto ceiba (laguna)	15q 0483947 2033828	1.34mts	Pesquera
G	Bellote	15q 0484360 2037183	7mts	Restaurantera
H	El bellote	15q 0484768 2037050	.50mts	Restaurantera
I	Banco de ostión	15q 0485639 2035627	1.10mts	Pesquera
J	Entrada al mar	15q 0486078 2037677	.80mts	Industrial
K	Laguna buquero	15q 0486267 2032677	1.17mts	Pesquera
L	Costa de Tilapa	15q 0488694 2032444	.82mts	Pesquera
M	Arroyo hondo	15q 0492485 2032893	.95mts	Pesquera
N	Mangle amarillo	15q 0490188 2034733	1.45mts	Pesquera
O	Embarcadero ejido banco	15q 0487852 2037013	.57mts	Urbana

## 5) Características físicas de la muestra:

Sitio	pH	Temperatura	Turbidez	Color	Olor	Sedimentos	Salinidad
A	7.79	26.8	No	Café	Descomposición	Si	2,000ppm
B	7.68	28.5	Si	Verde	Inodora	Si	2,000ppm
C	8.3	28.3	Si	Incolora	Inodora	No	2,000ppm
D	8.15	28.3	No	Incolora	Inodora	No	2,000ppm
E	8.14	28.6	Si	Verde	Inodora	Si	2,000ppm
F	8.31	29	No	Verde	Inodora	No	2,000ppm
G	8.15	27.8	No	Gris	Inodora	No	2,000ppm
H	8.11	29.4	Si	Verde	Inodora	Si	2,000ppm
I	8.36	29.4	No	Verde	Inodora	Si	2,000ppm
J	8.16	28.5	No	Verde	Inodora	No	2,000ppm
K	8.17	29.4	No	Verde	Inodora	No	2,000ppm
L	8.3	29.6	No	Verde	Inodora	No	2,000ppm
M	7.75	29	No	Verde	Inodora	No	2,000ppm
N	8.17	29.8	No	Verde	Inodora	No	2,000ppm
O	7.55	30.2	No	Negra	Inodora	No	2,000ppm

## 6) Resultados de la morfología colonial:

Cepa	Especie	color en Mc Conkey	forma	elevación	margen
1c1	<i>Burkholderia cepacia</i>	crema	circular	umbilicada	ondulada
1c2a	<i>Burkholderia gladioli</i>	rosa pálido	circular	convexa	entera
1c3	<i>Burkholderia cepacia</i>	crema	circular	umbilicada	ondulada
1c4a	<i>Burkholderia cepacia</i>	crema	circular	umbilicada	ondulada
1c6a	<i>Rhizobium radiobacter</i>	rosa fuerte	puntuada	elevada	entero
1c7	<i>Vibrio alginolytiens</i>	crema	puntuada	convexa	entero
1c8	<i>Rhizobium radiobacter</i>	crema	puntuada	elevada	entero
2c1	<i>Burkholderia cepacia</i>	crema	circular	umbilicada	ondulada
3c1	<i>Pseudomonas luteola</i>	rosa	circular	convexa	paliada
4c1a	<i>Burkholderia cepacia</i>	crema	circular	umbilicada	ondulada
4c1b	<i>Burkholderia cepacia</i>	crema	circular	umbilicada	ondulada
8c1b	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	crema transparente	circular	plana	irregular
9c1	<i>Burkholderia cepacia</i>	crema	circular	umbilicada	ondulada
9c2	<i>Burkholderia cepacia</i>	crema	circular	umbilicada	ondulada
9c3	<i>Burkholderia cepacia</i>	crema	circular	umbilicada	ondulada
12c1	<i>Aeromonas hydrophila /caviae</i>	rosa pálido	circular	paliada	entero
12c3	<i>Aeromonas hydrophila /caviae</i>	rosa pálido	circular	pulvinada	entero
12c4	<i>Burkholderia cepacia</i>	crema	circular	umbilicada	ondulada
13c3	<i>Vibrio fluvialis</i>	rosa pálido	puntuada	convexa	entero
13c4a	<i>Burkholderia cepacia</i>	crema	circular	umbilicada	ondulada
14c3b	<i>Burkholderia cepacia</i>	crema	circular	umbilicada	ondulada
14c4	<i>Pseudomonas luteola</i>	rosa	circular	convexa	pulvinada
15c1	<i>Rhizobium radiobacter</i>	rosa fuerte	puntuada	elevada	entero

## 7) Resultados de los API 20 NE:

Cepa	Especie	NO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC	OX
1c1	<i>Burkholderia cepacia</i>	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
1c2a	<i>Burkholderia gladioli</i>	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
1c3	<i>Burkholderia cepacia</i>	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
1c4a	<i>Burkholderia cepacia</i>	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1c6a	<i>Rhizobium radiobacter</i>	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
1c7	<i>Vibrio alginolytiens</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+
1c8	<i>Rhizobium radiobacter</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
2c1	<i>Burkholderia cepacia</i>	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3c1	<i>Pseudomonas luteola</i>	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
4c1a	<i>Burkholderia cepacia</i>	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4c1b	<i>Burkholderia cepacia</i>	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8c1b	<i>Shingomonas paucimobilis</i>	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
9c1	<i>Burkholderia cepacia</i>	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9c2	<i>Burkholderia cepacia</i>	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9c3	<i>Burkholderia cepacia</i>	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
12c1	<i>Aeromonas hydrophila /caviae</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
12c3	<i>Aeromonas hydrophila /caviae</i>	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
12c4	<i>Burkholderia cepacia</i>	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13c3	<i>Vibrio fluvialis</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
13c4a	<i>Burkholderia cepacia</i>	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14c3b	<i>Burkholderia cepacia</i>	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
14c4	<i>Pseudomonas luteola</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
15c1	<i>Rhizobium radiobacter</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+

