



---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA**

**ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA**

**LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**

**Identificación molecular de cepas hidrocarbonoclastas nativas de  
suelo en sitios contaminados por petróleo crudo en Tabasco y Veracruz,  
México.**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

PRESENTA:

JOCELYN MONTSERRAT BRISEÑO TELLEZ.

**DIRECTORA:**

DRA. SYLVIA MARTÍNEZ HERNÁNDEZ.

MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO, 2018.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
 Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería  
 Área Académica de Biología

**M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO**  
**DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR, UAEH.**  
**PRESENTE**

Por este conducto le comunico que el Jurado asignado a la pasante de Licenciatura en Biología **Jocelyn Montserrat Briseño Tellez** quien presenta el trabajo recepcional de tesis intitulado **Identificación molecular de cepas hidrocarbonoclastas nativas de suelo en sitios contaminados por petróleo crudo en Tabasco y Veracruz, México**, después de revisarlo en reunión de sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

PRESIDENTE:	Dr. Juan Carlos Gaytán Oyarzún
SECRETARIO	Dr. Enrique Cruz Chávez
PRIMER VOCAL:	Dra. Claudia Coronel Olivares
SEGUNDO VOCAL:	Dr. Pablo Octavio Aguilar
TERCER VOCAL:	Dra. Sylvia Martínez Hernández
PRIMER SUPLENTE:	Dra. Dulce María Galván Hernández
SEGUNDO SUPLENTE:	Dr. Adriana Leticia Meléndez López

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi más atenta consideración.

**ATENTAMENTE**  
**"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"**  
 Mineral de la Reforma, Hidalgo a 30 de Noviembre de 2018

*Magdalena Meza Sánchez*  
**M. en C. MAGDALENA MEZA SÁNCHEZ**

**COORDINADOR ADJUNTO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**



Unidad del Conocimiento  
 Carretera Pachuca-Tulancingo km: 4.5 Colonia  
 Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo  
 México C.P. 42184  
 Teléfono: 452 7771 / 21 120 00 ext: 6640, 6642  
 Fax: 2112  
 aab\_ichi@uaeh.edu.mx



## ***Dedicatoria***

A mi familia; Betty, Jorge y a mi hermano Irving.

Por alentarme a ser mejor cada día, porque me han apoyado en cada decisión que he tomado aun estando en desacuerdo y de este modo, recordarme que el amor es incondicional, porque gracias a ellos he aprendido que algunas cosas son invaluable, por su paciencia que ha sido infinita en este largo trayecto.

## ***Agradecimientos***

Al Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRODEP), México. Apoyo a la incorporación de nuevos PTC, por financiar el proyecto de investigación.

A los laboratorios de Genética, Conservación Biológica y Sistemática Molecular del Área Académica de Biología, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería (UAEH), por brindar la infraestructura para llevar a cabo este trabajo.

Al dr. Francisco Núñez de Cáceres por compartir su conocimiento, enseñarnos que debes sentir pasión por lo que hagas y tener siempre un pensamiento crítico.

A la dra. Sylvia quien confió en mí desde el primer momento y por brindarme la oportunidad de conocer nuevos lugares.

A los sinodales por sus observaciones para mejorar el escrito.

A mis amigos;

Oly, porque ha formado una parte importante en mi vida y a pesar de todas las vicisitudes, soportarme durante todo este tiempo lleno de aprendizaje, además, por su ayuda y espera en el laboratorio hasta altas horas de la noche.

Nash por saber escuchar y brindarme su confianza, por sus consejos, palabras de aliento, apoyo en el laboratorio desde el primer día y llenarme siempre de buena energía.

Alfredo porque además de leer el trabajo formó parte de él, apoyándome con la elaboración de mapas y en el laboratorio, y sobre todo, por enseñarme que no está mal equivocarse.

Edgar (vv), por tomarse el tiempo de leer, realizar observaciones y hacer comentarios constructivos para este trabajo, por darme otra perspectiva de las cosas, pero principalmente por estar siempre.

Jean por demostrarme que no hay imposibles, que el verdadero fracaso es no intentarlo y debemos hacer siempre lo que amamos para ser feliz a pesar de la crítica.

## **Índice**

Índice de tablas y figuras.....	7
Resumen.....	9
1 Introducción.....	10
2 Antecedentes .....	12
2.1 Petróleo.....	12
2.2 Contaminación e impacto ambiental .....	13
2.3 Contaminación en México.....	14
2.3.1 Contaminación en los estados de Tabasco y Veracruz .....	16
2.4 Métodos de remediación.....	17
2.4.1 Tratamientos fisicoquímicos .....	17
2.4.2 Tratamientos térmicos .....	17
2.4.3 Tratamientos biológicos.....	18
2.5 Bacterias hidrocarbonoclastas .....	19
2.6 Medios minerales adicionados con petróleo .....	21
2.7 Identificación molecular de cepas bacterianas.....	22
2.8 Bacterias con uso potencial para degradar crudo de petróleo .....	23
3 Justificación.....	26
4 Objetivos .....	27
4.1 General .....	27
4.2 Particulares .....	27
5 Material y método.....	28
5.1 Diseño de medios minerales.....	28
5.2 Sitio de muestreo .....	29
5.3 Muestreo .....	31
5.4 Evaluación de hidrocarburos de fracción ligera presentes en el suelo y humedad relativa.....	32
5.5 Diluciones decimales seriadas .....	33
5.6 Conteo de colonias, morfología colonial .....	34
5.7 Cepario .....	34
5.8 Tinciones diferenciales.....	34
5.8.1 Tinción de Gram .....	34
5.9 Pruebas bioquímicas.....	36

5.9.1 Catalasa.....	36
5.9.2 Oxidasa.....	36
5.10 Identificación molecular por PCR convencional .....	37
5.10.1 Protocolo de extracción .....	37
5.10.2 Secuenciación.....	38
6 Resultados .....	39
6.1 Medios minerales .....	39
6.2 Parámetros fisicoquímicos y evaluación de hidrocarburos .....	39
6.3 Determinación de la densidad bacteriana (conteo de UFC).....	41
6.4 Descripción morfológica, tinción diferencial y pruebas bioquímicas de las colonias aisladas.....	42
6.5 Identificación molecular por PCR convencional .....	45
7 Discusión.....	51
7.1 Medios minerales .....	51
7.2 Muestreo. Parámetros fisicoquímicos y evaluación de hidrocarburos.....	51
7.3 Densidad bacteriana y pruebas bioquímicas .....	53
7.4 Identificación de cepas bacterianas degradadoras de petróleo crudo .....	54
8 Conclusiones y perspectivas .....	56
9 Referencias .....	58
10 Anexos. Composición química de agares y disoluciones, protocolo de extracción .....	69

## ***Índice de tablas y figuras***

<b>Figura 1.</b> Clasificación de hidrocarburos. ....	13
<b>Figura 2.</b> Contaminantes involucrados en emergencias ambientales en México, durante el periodo 2008-2015. ....	15
<b>Figura 3.</b> Emergencias ambientales por entidad federativa durante el periodo 2010-2014. ....	16
<b>Figura 4.</b> Etapas de la PCR. Temperaturas, tiempos y ciclos estándares. ....	23
<b>Figura 5.</b> Adición de petróleo a los medios minerales. ....	28
<b>Figura 6.</b> Esquema representativo del método de siembra para la elaboración de medios minerales. ....	29
<b>Figura 7.</b> Ranchería Hueso de Puerco, Tabasco. Coordenadas 17°47'22.1"N, 92°53'41.4"W. ....	30
<b>Figura 8.</b> Estero del Pantano, municipio de Cosoleacaque, Veracruz. Coordenadas 18°03'35.4"N, 94°29'03.0"W. ....	31
<b>Figura 9.</b> Diluciones decimales seriadas y visualización de la siembra en placa. ....	33
<b>Figura 10.</b> Tinción de Gram. ....	35
<b>Figura 11.</b> Medio de cultivo 3. ....	39
<b>Figura 12.</b> Cromatograma obtenido de la evaluación de HFL. ....	41
<b>Figura 13.</b> Visualización de las amplificaciones de PCR en gel de agarosa. ....	45
<b>Tabla I.</b> Límites máximos permisibles para diferentes fracciones de hidrocarburos en suelo. ....	18
<b>Tabla II.</b> Bacterias hidrocarbonoclastas identificadas y el tipo de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) que degradan, según lo reportado en diversos estudios previamente realizados. ....	24
<b>Tabla III.</b> Parámetros fisicoquímicos de los puntos de muestreo en los estados de Tabasco y Veracruz. ....	40
<b>Tabla IV.</b> Promedio de los parámetros fisicoquímicos, porcentaje de humedad de cada sitio y la cantidad de hidrocarburos de fracción ligera presentes en el suelo. ....	40
<b>Tabla V.</b> Número total de Unidades Formadoras de Colonias que crecieron de las diluciones decimales seriadas en agar adicionado con petróleo, incubadas a 37 °C durante 48 h, en condiciones aerobias y anaerobias. ....	42

<b>Tabla VI.</b> Morfología, tinción diferencial de Gram y pruebas bioquímicas. ....	43
<b>Tabla VII.</b> Identificación molecular de cepas aisladas, número de acceso con la base de datos NCBI y porcentaje de similitud. ....	47
<b>Tabla VIII.</b> Diversidad de géneros identificados en Ranchería Hueso de Puerco y Estero del Pantano. ....	50
<b>Tabla IX.</b> Pruebas bioquímicas esperadas para los géneros identificados en el presente trabajo. ....	73



## **Resumen**

México a nivel mundial es uno de los principales productores de petróleo, lo cual ha permitido el desarrollo económico del país; sin embargo, no se han tomado las medidas pertinentes para su manejo adecuado, generando problemáticas principalmente ambientales.

Esto ha conducido a la planeación y aplicación de métodos para mitigar el impacto ambiental, como son las tecnologías de biorremediación, donde el uso de bacterias hidrocarbonoclastas juega un papel importante. En este sentido, el uso de técnicas moleculares ha facilitado la identificación mediante el análisis de secuencias basadas en genes dianas para realizar asignación de especies.

En el presente trabajo, las muestras de suelo contaminado con hidrocarburos fueron tomadas en dos entidades federativas de México; Tabasco y Veracruz.

Se aislaron 76 cepas bacterianas y fueron mantenidas en cultivos axénicos. Posteriormente se caracterizaron mediante pruebas bioquímicas y tinción diferencial de Gram. Para la identificación molecular se utilizó la técnica de PCR convencional, analizando el gen 16S rRNA.

Algunas de las cepas identificadas ya han sido reportadas por su presencia en suelos con dicho contaminante, como por ejemplo aquellas pertenecientes a los géneros *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, entre otras. Sin embargo, algunos géneros descritos en este trabajo como *Lysobacter* y *Bosea* no han sido utilizados en investigaciones similares, los cuales son de uso potencial para estudios posteriores en la degradación de hidrocarburos.

## **1 Introducción**

El petróleo y sus productos derivados son contaminantes que se han introducido en los ecosistemas terrestres debido a derrames accidentales, disposición clandestina y perforación de oleoductos, alterando las características físicas, químicas y biológicas del ambiente (Sepúlveda y Velasco, 2002). Problemas para la salud (Barron, 2012), ecológicos (Atlas and Hazen, 2011; Allan *et al.*, 2012; Lin and Mendelsohn, 2012) y económicos (Bragg *et al.*, 1994; Head *et al.*, 2006) están asociados con este tipo de contaminación.

Sin embargo, dada la naturaleza orgánica del suelo, existe una gran diversidad de especies nativas, principalmente bacterias, arqueas y hongos, que pueden degradar dichos contaminantes (Balkwill and Ghiorse, 1985; Atlas and Hazen, 2011; Fuentes *et al.*, 2014).

La mayoría de los estudios realizados se han llevado a cabo con cepas bacterianas debido a su metabolismo versátil, es decir, poseen una amplia capacidad enzimática para la degradación de las diferentes composiciones del crudo de petróleo (Acosta *et al.*, 2011).

Para estudiar la estructura y composición de comunidades microbianas asociadas a ambientes contaminados, la taxonomía clásica se basa en características morfológicas y propiedades bioquímicas (Pérez *et al.*, 2008), sin embargo, actualmente se ha preferido el uso de técnicas moleculares por su exactitud (Gobernado y López, 2003).

Algunos de los géneros de bacterias reportados como degradadores de hidrocarburos en suelo son: *Acinetobacter* (Fatajeva *et al.*, 2014; Dahal *et al.*, 2017), *Bacillus* (Kishore and Ashis, 2007; Parthipan *et al.*, 2017), *Stenotrophomonas* (Mangwani *et al.*, 2014), *Sphingomonas* (Zhoua *et al.*, 2016), *Actinobacteria* (Lara *et al.*, 2016), *Burkholderia* (Kim *et al.*, 2003), *Nocardia* (Zeinali *et al.*, 2007), *Flavobacterium* (Chaudhary and Kim, 2017), *Rhodococcus* (Hemalatha and Veeramanikandan, 2011), *Pseudomonas* (Stamenov *et al.*, 2015), entre otras.

El aislamiento y la identificación molecular son técnicas que ayudan a conocer la diversidad de los microorganismos, en este caso de bacterias nativas degradadoras de hidrocarburos, para implementar métodos que permitan mejorar la recuperación del suelo, por lo que constituye el primer paso para un proceso biotecnológico de biorremediación (Arrieta *et al.*, 2012).

Por ello, el objetivo principal del presente trabajo fue la identificación de bacterias autóctonas de suelo en sitios contaminados por crudo de petróleo, mediante la utilización de PCR convencional, para su posible uso en la degradación de hidrocarburos.

## **2 Antecedentes**

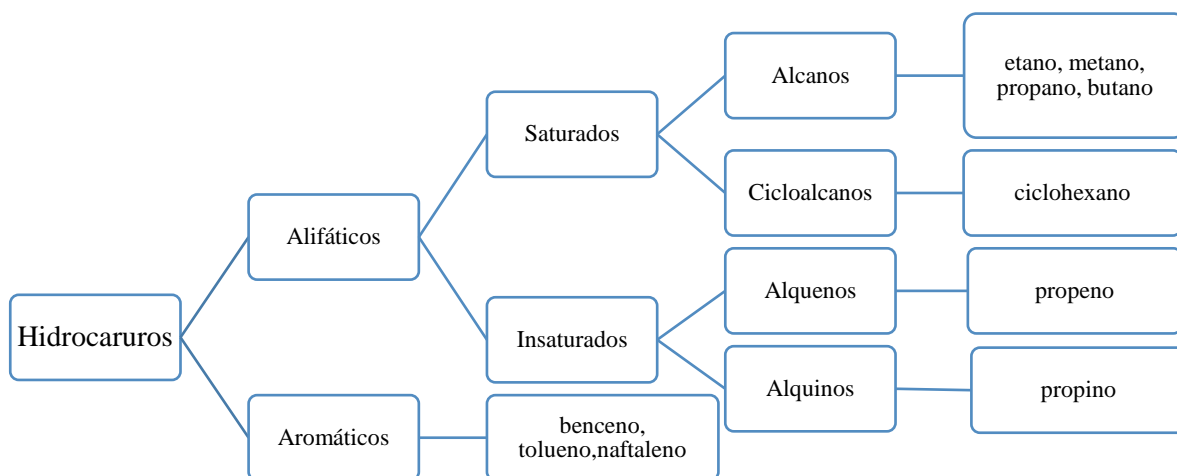
### **2.1 Petróleo**

El petróleo, como lo define el Servicio Geológico Mexicano (2017), deriva del latín *petroleum*, que significa aceite de roca, el cual es un líquido natural oleaginoso e inflamable, constituido por una mezcla de hidrocarburos que se presentan en la naturaleza, en lechos geológicos continentales o marítimos, ya sea en estado sólido, líquido o gaseoso.

Se compone principalmente de carbono e hidrógeno en una porción de 83-87% y del 11-14%, respectivamente. Contiene abundantes impurezas de compuestos orgánicos como el azufre (S), oxígeno (O<sub>2</sub>), nitrógeno (N<sub>2</sub>), mercaptanos, dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>), ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S), alcoholes mezclados con agua, ya sea libre o emulsionada. Como impurezas, se encuentran también diversas sales minerales como cloruros y sulfatos de calcio (Ca), magnesio (Mg) y hierro (Fe), su color varía entre ámbar y negro (Wauquier, 2004; Canals, 2005; Servicio Geológico Mexicano, 2017).

Dependiendo del número de átomos de carbono y de la estructura de los hidrocarburos que integran el petróleo, se tienen diferentes propiedades que los caracterizan y que determinan su comportamiento como combustibles, lubricantes, ceras o disolventes (Instituto Mexicano del Petróleo, 2014).

Los principales hidrocarburos que contienen los crudos son las cadenas lineales de carbono asociadas a hidrógeno las cuales constituyen las parafinas, cuando las cadenas son ramificadas se tienen las isoparafinas, ambos compuestos son volátiles, formados por cadena de 1-10 átomos de carbono y representan alrededor del 30% del petróleo (Canals, 2005; IMP, 2014). Al presentarse dobles uniones entre los átomos de carbono se forman las olefinas o alquenos. Las moléculas en las que se forman ciclos de carbono se denominan naftenos o cicloalcanos y representan hasta el 31% del crudo, cuando estos ciclos presentan dobles uniones alternas (anillo bencénico) se tiene la familia de los aromáticos (Figura 1) (Canals, 2005; IMP, 2014).



**Figura 1.** Clasificación de hidrocarburos. Modificado de Arias (2006).

Según la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, Norma Oficial Mexicana que establece los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y los lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación, los hidrocarburos que conforman el petróleo crudo pueden clasificarse dependiendo del número de carbonos que posean, los cuales corresponden a hidrocarburos de fracción ligera (HFL), media y pesada. Aquellos de fracción ligera están integrados por una mezcla de hidrocarburos cuyas moléculas contienen entre cinco y diez átomos de carbono (C5 a C10), los de fracción media contienen entre diez y veintiocho átomos de carbono (C10 a C28) y los de fracción pesada entre veintiocho y cuarenta átomos de carbono (C28 a C40).

## **2.2 Contaminación e impacto ambiental**

La contaminación es la alteración de las características físicas, químicas y biológicas de un lugar. A nivel mundial uno de los principales factores que generan daños en las composiciones bióticas (como flora y fauna) y abióticas (minerales, aire y agua) de un sitio, son los derrames de hidrocarburos (Olmedo, 2010). Los problemas ocasionados por los derrames de petróleo en suelo son generados

principalmente cuando el petróleo contiene hidrocarburos de fracción ligera ya que la volatilidad de estos compuestos a menudo conduce un riesgo de explosión (Wilkinson *et al.*, 2002).

Adams *et al.*, (2008) reportan que cuando los hidrocarburos cubren la superficie del suelo, interrumpen la interacción electrostática entre la superficie de las partículas del agua y suelo, reduciendo su capacidad de retención de este último, así como también la capacidad de retención de nutrientes, además puede producirse compactación del suelo reduciendo la penetración de las raíces, con afectación directa de la flora nativa.

Para la flora y fauna las composiciones químicas del crudo de petróleo son tóxicas provocando envenenamiento (ya sea por absorción o por contacto), lo cual puede generar pérdida de la biodiversidad y alteración en las cadenas tróficas cuando hay destrucción de las fuentes alimenticias. Otro problema ocasionado por los derrames de hidrocarburos en suelos, es la filtración de estos, provocando contaminación de aguas subterráneas, mientras que en ambientes acuáticos pueden ocasionar eutrofización (Wilkinson *et al.*, 2002).

De igual forma se pueden suscitar problemas en los ámbitos sociales y económicos, así como en el de la salud, ya que algunos compuestos presentes en los hidrocarburos son mutágenos y carcinogénicos para los humanos (Cavazos *et al.*, 2014). La exposición constante a hidrocarburos halogenados ocasiona irritación de ojos, vías nasales, faringe, náuseas que pueden estar acompañados de vómitos, mareos y dolores de cabeza (Wilkinson *et al.*, 2002).

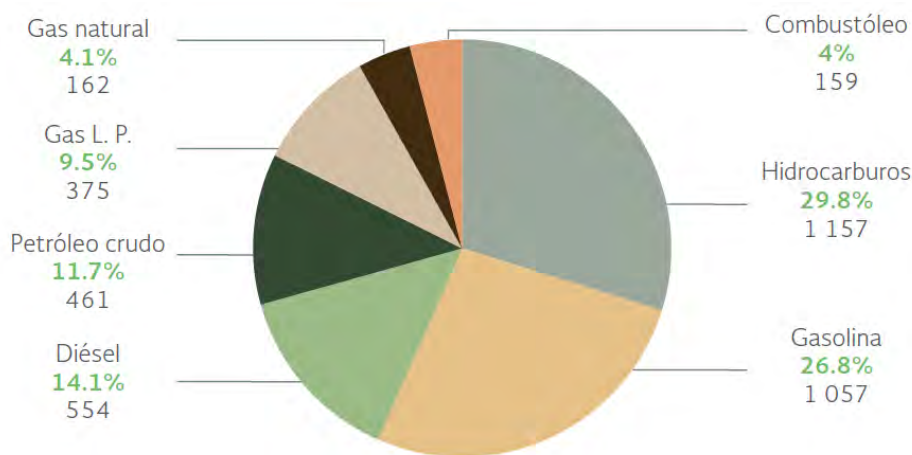
### **2.3 Contaminación en México**

La expansión y desarrollo de la industria petroquímica en México ha dado origen a emergencias ambientales con graves repercusiones a la salud de la población y al equilibrio ecológico de los ecosistemas. Entre las principales causas de deterioro ambiental de suelos y de cuerpos de agua por hidrocarburos a lo largo del país, se encuentran; el manejo inapropiado y abandono de materiales y residuos peligrosos,

mantenimiento inadecuado en instalaciones petroleras, fugas en líneas de conducción y derrames de hidrocarburos (Sepúlveda y Velasco, 2002).

Durante el año 2002 en México se reportó un aumento en derrames de hidrocarburos en suelo y agua debido a la perforación de pozos, los principales estados afectados por la presencia de sustancias químicas fueron Tabasco, Veracruz, Campeche y Chiapas, debido a que son sitios donde se realiza la mayor parte de la actividad petrolera del país (Enciso, 2004).

Entre 2008 y 2015 se identificaron 4078 sitios contaminados por emergencias ambientales, donde Petróleos Mexicanos fue responsable de 2743, según lo reportado por SEMARNAT en su Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Los contaminantes involucrados en el mayor número de emergencias ambientales en dicho periodo fueron; hidrocarburos, gasolina, diésel, petróleo crudo, gas licuado del petróleo (GLP) (Figura 2). Los dos primeros contaminantes estuvieron involucrados en el 56.6% de las contingencias ambientales registradas en ese periodo (SEMARNAT, 2015) y recientemente, en el Informe de Sustentabilidad emitido por PEMEX, se reportaron para el año 2016 un estimado de 192 eventos de fugas y derrames de hidrocarburos en el país (PEMEX, 2016).



**Figura 2.** Contaminantes involucrados en emergencias ambientales en México, durante el periodo 2008-2015. Tomado de SEMARNAT (2015).

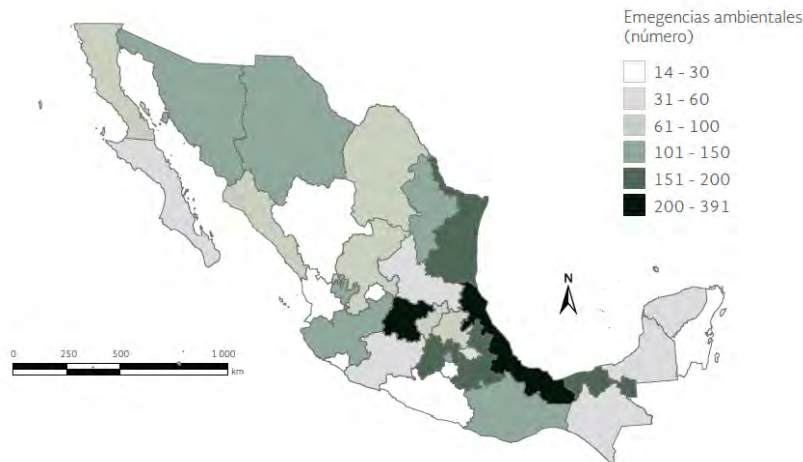
### 2.3.1 Contaminación en los estados de Tabasco y Veracruz

Uno de los principales estados a nivel nacional por su producción petrolera es Tabasco, desde el descubrimiento de este recurso natural no renovable en el año 1863 por Manuel Gil y Sáenz en el municipio de Macuspana (Ortiz, 2016).

El crecimiento industrial y la aplicación inadecuada de normativas para el manejo de residuos peligrosos ha propiciado la contaminación de suelo por hidrocarburos ya sea por las fracciones ligeras, medianas y/o pesadas en el estado, la cual ha llegado a abarcar 0.07% del área total del estado de Tabasco (Ferrera *et al.*, 2006; Quijano, 2015).

En el 2004, se registraron 54 fugas en ductos de PEMEX en el estado de Tabasco, que afectaron cerca de 1000 ha, derramando más de 36680 barriles de petróleo, según datos de la delegación de la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (Quijano, 2015).

En el caso de Veracruz, es uno de los estados con mayor incidencia de sitios contaminados por actividades petroleras (Sepúlveda y Velasco, 2002), ya que en el lapso comprendido entre 2010 y 2014 se contabilizaron un total de 3082 emergencias ambientales dentro del territorio nacional (Figura 3), siendo Veracruz el estado donde se registró el mayor número (391 emergencias) de derrames por hidrocarburos (SEMARNAT, 2015).



**Figura 3.** Emergencias ambientales por entidad federativa durante el periodo 2010-2014. Tomado de SEMARNAT (2015).



## **2.4 Métodos de remediación**

La remediación son medidas a las que se someten los sitios afectados para eliminar o reducir los contaminantes hasta un nivel seguro para la salud y el ambiente o prevenir la dispersión de los contaminantes sin modificarlos (SEMARNAT, 2010a; Ley General Para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos, 2018).

La realización de las tecnologías de remediación puede llevarse a cabo de manera *in situ* o *ex situ*. La primera corresponde a aquellas técnicas en las que el suelo contaminado es tratado para remover los contaminantes, es decir, se realizan en el mismo sitio en donde se encuentra la contaminación. Por otro lado la remediación *ex situ* requiere de excavación, dragado o cualquier otro proceso para remover el suelo contaminado antes de su tratamiento que puede realizarse en el mismo sitio o fuera de él (Sepúlveda y Velasco, 2002).

### **2.4.1 Tratamientos fisicoquímicos**

Este tipo de tratamiento utiliza las propiedades físicas de los contaminantes o del medio afectado para destruir, separar o contener la contaminación, se involucran reacciones de oxidación-reducción que convierten compuestos altamente nocivos en menos tóxicos o menos peligrosos. Los agentes oxidantes más usados para tratar contaminantes peligrosos en el suelo son el ozono ( $O_3$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), hipocloritos ( $ClO^-$ ), cloro ( $Cl_2$ ), dióxido de cloro ( $ClO_2$ ) y el reactivo Fenton que es una mezcla de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y hierro (Fe) (Sepúlveda y Velasco, 2002).

Entre las tecnologías fisicoquímicas para tratamiento *in situ*, se encuentra la remediación electrocinética, lavado de suelos, extracción por disolventes, extracción de vapores y la solidificación/estabilización (Sepúlveda y Velasco, 2002).

### **2.4.2 Tratamientos térmicos**

Se aplica calor al suelo, con la finalidad de incrementar la volatilización (separación) o la inmovilización (por descomposición o fundición) de los contaminantes presentes

(Sepúlveda y Velasco, 2002). Ejemplos de estas técnicas de remediación aplicadas de manera *ex situ* son: incineración, pirólisis y desorción térmica. De manera *in situ* se emplea la extracción de vapores (EV) mejorada por temperatura (Moreno *et al.*, 2004). Otro ejemplo de tratamiento térmico es la vitrificación la cual se puede aplicar tanto de manera *in situ* como *ex situ* (INECC, 2007; Amaya, 2011).

### 2.4.3 Tratamientos biológicos

También conocida como biorremediación, este tipo de remediación tiene como objetivo eliminar o disminuir la concentración de sustancias potencialmente tóxicas, utilizando el proceso de degradación de contaminantes que poseen algunos microorganismos para su transformación en productos asimilables como el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y el agua (H<sub>2</sub>O) (Cortón y Viale, 2006; Solanas, 2009). Este tipo de remediación puede emplear organismos propios del sitio afectado (autóctonos) u organismos aislados de otros sitios (exógenos o halóctonos), en condiciones aerobias o anaerobias. No obstante, para cumplir con dichos objetivos es necesario conocer previamente cuáles son los niveles de contaminación presentes en los sitios afectados ya que una de las desventajas de la biorremediación es que a mayor concentración de los contaminantes, los organismos usados en este proceso no serán capaces de reducirlos o su degradación requerirá mucho tiempo (Cortón y Viale, 2006). Para el caso de suelos contaminados con hidrocarburos la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 establece los límites permisibles así como el método para evaluar las diferentes fracciones de hidrocarburos en suelo (Tabla I).

**Tabla I.** Límites máximos permisibles para diferentes fracciones de hidrocarburos en suelo. Tomada del Diario Oficial de la Federación (2013).

FRACCIÓN DE HIDROCARBUROS	USO DE SUELO PREDOMINANTE (mg/kg BASE SECA)			MÉTODO ANALÍTICO
	Agrícola, forestal, pecuario y de conservación	Residencial y recreativo	Industrial y comercial	
Ligera	200	200	500	NMX-AA-105-SCFI-2008
Media	1 200	1 200	5 000	NMX-AA-145-SCFI-2008
Pesada	3 000	3 000	6 000	NMX-AA-134-SCFI-2006

En resumen, el resultado del proceso de biorremediación depende principalmente de 3 factores; 1) de la población microbiana (diversidad, tasa de reproducción, tipo de metabolismo y actividad enzimática, 2) características del sitio (nutrientes, pH, temperatura, etc.) y 3) características del contaminante (estructura química, toxicidad, solubilidad y concentración) (Boopathy, 2000).

Los microorganismos utilizados en biorremediación son generalmente no-fotosintéticos, descomponedores, por ello para este fin se utilizan principalmente hongos y bacterias (Sepúlveda y Velasco, 2002).

Algunas técnicas de biorremediación *in situ* son: bioventeo, bioestimulación, bioaumentación, biolabranza y fitorremediación; a diferencia de las tecnologías *ex situ* que pueden ser: composteo, biorreactores (Sepúlveda y Velasco, 2002; INECC, 2007).

### **2.5 Bacterias hidrocarbonoclastas**

A mediados del siglo XX se desarrollaron las primeras investigaciones interesadas en conocer el potencial de los organismos microscópicos para degradar contaminantes. En 1946, Claude E. ZoBell descubrió que muchos microorganismos que se encontraban distribuidos en el ambiente tenían la capacidad de utilizar los hidrocarburos como fuente de energía y carbono, basándose en previas observaciones, por ejemplo, si las bacterias podían catalizar la oxidación del ion ferroso al óxido férrico ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), también podían hacerlo al consumir ciertos compuestos como el oxígeno en un ambiente microaerofílico, creando así condiciones anaeróbicas que permiten la reducción bacteriana de compuestos férricos (Ehrlich, 1999). Además, podían generar productos metabólicos, como, por ejemplo, sulfuro (S) en la reducción de sulfato ( $\text{SO}_4$ ), que posteriormente podían reaccionar con iones metálicos y precipitarlos como sulfuros metálicos ( $\text{FeS}_2$  o  $\text{PbS}$ ). Dichos estudios comprobaron que en ausencia de bacterias, cualquiera de estas reacciones se produciría a un ritmo mucho más lento (Ehrlich, 1999; Lappin-Scott, 1999).

ZoBell realizó diversas investigaciones en microbiología del petróleo que comenzaron durante la Segunda Guerra Mundial y continuaron en la década de 1970. Estas investigaciones incluyeron estudios sobre el origen del petróleo, la formación natural de reservorios, el metabolismo degradador de hidrocarburos de las bacterias y la contaminación del ambiente por dichos compuestos. Las observaciones de ZoBell y trabajos de otros investigadores como Cholodny, Conn y Henrici sobre algunas bacterias que pueden metabolizar los hidrocarburos del petróleo condujeron a acuñar el concepto de biorremediación de la contaminación. Además, intentó identificar a los microorganismos aislados de biopelículas marinas, reportando la dificultad de trabajar con muestras ambientales ya que muchas de las bacterias eran halófilas y varias especies aún no reportadas, pertenecían a los géneros de *Achromobacter* y *Flavobacterium*, aunque este último fue renombrado como *Pseudomonas* en 1943 (Ehrlich, 1999; Lappin-Scott, 1999).

A lo largo de sus experimentos ZoBell describió bacterias así como otros organismos micro y macroscópicos, de este modo, gracias a sus observaciones consideró que los organismos colonizadores eran bacterias, las cuales se unían rápidamente a diatomeas y actinobacterias (Ehrlich, 1999; Lappin-Scott, 1999).

En la actualidad, el Dominio bacteria se conforma por microorganismos unicelulares, tienen un promedio entre 0,2 y 10  $\mu\text{m}$  de ancho, están constituidas por una molécula circular de DNA llamada nucleoide y las funciones celulares se llevan en su mayoría en la membrana plasmática, poseen pared celular compuesta de peptidoglicano y la reproducción se lleva a cabo por fisión binaria (Madigan *et al.*, 2009).

Las bacterias se desarrollan en la mayoría de los ecosistemas, incluso en ambientes hostiles y condiciones extremas. Debido a su metabolismo versátil son capaces de convertir compuestos difícilmente degradables en compuestos asimilables para utilizarlos como fuente de carbono y energía, algunas bacterias son capaces de degradar los contaminantes presentes en el medio (Bladimir *et al.*, 2016).

En la industria petrolera, las cepas bacterianas capaces de usar el petróleo crudo o sus derivados como fuente de carbono y energía cumplen un rol importante desde el punto de vista económico y ambiental, ya que ayudan a degradar los

contaminantes presentes para mejorar las condiciones del ecosistema dañado, estas bacterias se denominan hidrocarbonoclastas (Wilkinson *et al.*, 2002; Ramírez *et al.*, 2012). Sin embargo, la tasa de degradación microbiana de hidrocarburos en suelos está condicionada por parámetros fisicoquímicos como: presencia de nutrientes (nitrógeno, fosforo), contenido de oxígeno, presión parcial de gases, temperatura, pH, contenido de sales, diámetro y distribución de partículas (tamices), así como solubilidad, concentración, cantidad y biodisponibilidad de los contaminantes (Ramírez *et al.*, 2012).

Dentro de los géneros de bacterias hidrocarbonoclastas más representativos, que han sido aislados de suelos contaminados con hidrocarburos se encuentran *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter* (Mansur *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016).

## **2.6 Medios minerales adicionados con petróleo**

La metodología empleada para la selección de microorganismos, a través de pruebas realizadas en cultivos puros adicionados con crudo de petróleo, es una estrategia eficiente para evaluar la adaptación y supervivencia de cepas tolerantes a concentraciones de dicho contaminante (Acosta *et al.*, 2011), ya que se ve reflejada la capacidad de los microorganismos para usar a los hidrocarburos como única fuente de carbono y energía (Linares *et al.*, 2006; Jaramillo *et al.*, 2011; Martín *et al.*, 2012).

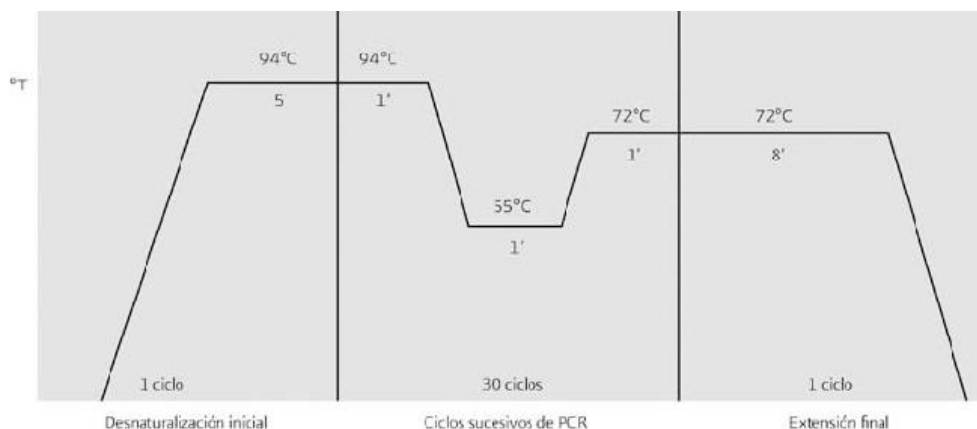
Algunas de las técnicas de aislamiento incluyen la adición de petróleo crudo en el agar o adicionándolo mediante el uso de papel filtro, trabajos realizados por Hernández *et al.*, (2003), prueban la eficacia de las bacterias ante las condiciones hostiles del medio mineral. Dichos autores evalúan el crecimiento de cepas hidrocarbonoclastas en un medio usando papel filtro como un primer paso de selección y posteriormente siembran a las mismas cepas aisladas en un cultivo adicionado con petróleo, donde se observa una reducción en el número de cepas, lo que los llevó a la conclusión de que dependiendo de la fracción de hidrocarburos, será mayormente selectivo el medio de cultivo.

## **2.7 Identificación molecular de cepas bacterianas**

La taxonomía clásica se basa en las características morfológicas, comportamiento en los medios de cultivo, propiedades bioquímicas y fisiológicas. Sin embargo a lo largo del tiempo se han presentado problemáticas al intentar describir morfológica y bioquímicamente a los microorganismos, ya que no todas las cepas de una misma especie muestran características homogéneas, es decir, una misma especie al someterse a condiciones de estrés puede tener un crecimiento diferente en los medios de cultivo, generando diferentes patrones en ensayos repetidos (Olmos *et al.*, 2010).

En la actualidad se prefiere la taxonomía molecular por su exactitud, con base en el RNA ribosómico (rRNA). El rRNA 16S de las bacterias tiene una longitud de 1500 nucleótidos y sus secuencias se han dividido en distintas áreas de acuerdo con su grado de variabilidad entre diferentes grupos taxonómicos. Las regiones altamente conservadas agrupan a las bacterias en altos órdenes taxonómicos, mientras que las regiones variables (mayor frecuencia de mutación) permiten una clasificación a niveles inferiores como género o especie, de esta manera es posible la construcción de árboles filogenéticos que muestran las relaciones de parentesco (Gobernado y López, 2003).

La PCR (por sus siglas en Inglés *Polymerase Chain Reaction*) es una herramienta molecular ampliamente utilizada para la replicación de DNA *in vitro*, por su eficacia y sensibilidad, ya sea con fines de clonación o para secuenciación. Consta de varios ciclos de amplificación sucesivos mediante tres etapas (Figura 4): desnaturalización, hibridación y elongación (Madigan *et al.*, 2009).



**Figura 4.** Etapas de la PCR. Temperaturas, tiempos y ciclos estándares. Tomado de Díaz *et al.*, (2014).

### **2.8 Bacterias con uso potencial para degradar crudo de petróleo**

La degradación de los hidrocarburos por parte de los microorganismos se basa en su capacidad de aceptar como sustrato sustancias orgánicas para transformarlas en compuestos menos tóxicos o disminuir su concentración, produciendo dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), agua (H<sub>2</sub>O) y biomasa (Cortón y Viale, 2006). Dependiendo de la complejidad de cada fracción del petróleo crudo, es la facilidad de degradación que poseen los microorganismos. Según lo reportado por Rich *et al.*, (2003), los Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP) en el ambiente son degradados principalmente por bacterias que poseen la capacidad peroxidasa y oxidasa.

Rivera *et al.*, (2002) y Sutton *et al.*, (2012), establecen que la tolerancia microbiana a la presencia de petróleo en el suelo induce a la selectividad y a la disminución de la diversidad, como resultado del estrés ambiental. Pese a ello, hay un buen número de especies que se han aislado de suelos contaminados con petróleo y se ha estudiado su capacidad para degradar diferentes fracciones de hidrocarburos (Tabla II), tal es el caso de bacterias pertenecientes a los géneros *Acinetobacter* (Fatajeva *et al.*, 2014; Dahal *et al.*, 2017), *Bacillus* (Kishore and Ashis, 2007; Parthipan *et al.*, 2017), *Stenotrophomonas* (Mangwani *et al.*, 2014), *Sphingomonas* (Zhoua *et al.*, 2016), *Actinobacteria* (Lara *et al.*, 2016), *Burkholderia* (Kim *et al.*, 2003), *Nocardia* (Zeinali *et al.*, 2007), *Flavobacterium* (Chaudhary and Kim, 2017),

*Rhodococcus* (Hemalatha and Veeramanikandan, 2011), *Mycobacterium* (Mesa *et al.*, 2006), y *Pseudomonas*. Siendo este último, uno de los géneros más estudiados por su potencial para degradar crudo de petróleo (Stamenov *et al.*, 2015).

Además de la composición química de las sustancias tóxicas, la biodegradación de hidrocarburos va a depender de diversos factores como: temperatura, nutrientes, concentración de oxígeno y de humedad, pH y uso de suelo. Debido a ello y por las condiciones que se presentan en los ambientes tropicales, la degradación de los contaminantes se ve favorecida en esos sitios, a diferencia de un ambiente con bajas temperaturas (menor a 20 °C) o suelos ácidos (pH menor o igual a 6) (Rivera *et al.*, 2002).

A partir de diversos estudios realizados sobre la identificación de bacterias hidrocarbonoclastas se ha descrito que todas deben compartir ciertas características para poder usarlas con fines de biorremediación, por ejemplo; deben tener sitios receptores para unir hidrocarburos, deben ser capaces de producir surfactantes, estar bien adaptadas al ambiente, ser genéticamente estables con rápidas tasas de reproducción, no deben ser patógenos ni producir productos metabólicos tóxicos finales (Wilkinson *et al.*, 2002; Chikere *et al.*, 2011; Wolicka and Borkowski, 2012).

**Tabla II.** Bacterias hidrocarbonoclastas identificadas y el tipo de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) que degradan, según lo reportado en diversos estudios previamente realizados.

<b>Especie</b>	<b>HTP que degradan</b>	<b>Referencia</b>
<i>Acinetobacter oleivorans</i>	Hidrocarburos C-18, C-20, C-22, queroseno, diesel.	(Dahal <i>et al.</i> , 2017)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	N-alcanos de longitud media	(Priyangshu <i>et al.</i> , 2004; Tanase <i>et al.</i> , 2013)
<i>Pseudomonas hibiscicola</i>	Tricloroetileno	(Anzai <i>et al.</i> , 2000; Piyali and Pranab, 2012)



<i>Pseudomonas indica</i>	Butano, alcanos	(Pandey <i>et al.</i> , 2002)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Crudo de petróleo	(Kishore and Ashis, 2007; Hanafy <i>et al.</i> , 2016)
<i>Pseudomonas azotoformans</i>	Crudo de petróleo	(Tekoriené, 2008; Zhi-Juan <i>et al.</i> , 2011)
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Fluoranteno	(Hickey <i>et al.</i> , 2007)
<i>Pseudomonas knackmussii</i>	Hidrocarburos aromáticos clorados	(Stolz, <i>et al.</i> , 2007)
<i>Bacillus subtilis</i>	Crudo de petróleo; hidrocarburos C <sub>10</sub> –C <sub>14</sub> , C <sub>15</sub> –C <sub>19</sub>	(Kishore and Ashis, 2007; Parthipan <i>et al.</i> , 2017)
<i>Bacillus atrophaeus</i>	Crudo de petróleo	(Zhang <i>et al.</i> , 2016)
<i>Bacillus aerius</i>	Crudo de petróleo	(Mansur <i>et al.</i> , 2014)
<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>	Hidrocarburos policíclicos aromáticos	(Mangwani <i>et al.</i> , 2014)

### **3 Justificación**

En México existe actualmente una gran cantidad de sitios contaminados y una de las principales problemáticas es causada por diferentes tipos de compuestos de crudo de petróleo generados por actividades de la industria petroquímica, la disposición clandestina y derrames de residuos peligrosos (Sepúlveda y Velasco, 2002). De acuerdo a lo descrito por la SEMARNAT (2010b), por el riesgo que presenta para la salud humana la contaminación de suelos por hidrocarburos ocupa el segundo lugar en contingencias ambientales.

El daño provocado al medio por dicho contaminante no solo radica en el mal manejo por parte de la industria petrolera sino también a la falta de un monitoreo en las zonas (Diario Oficial de la Federación, 2013).

Conocer la composición de la microbiota resistente y/o con la capacidad de degradar un determinado contaminante, como el resultado de un plan de muestreo, será de vital importancia si se desea en un futuro emplear a dichos microorganismos en técnicas de biorremediación.

## **4 Objetivos**

### **4.1 General**

- Identificar bacterias autóctonas en suelos contaminados por crudo de petróleo, mediante PCR convencional, para su posible uso en la degradación de hidrocarburos.

### **4.2 Particulares**

- Identificar cepas bacterianas consideradas hidrocarbonoclastas, mediante su aislamiento en medios selectivos y caracterización bioquímica; para el establecimiento de un cepario.
- Caracterizar a las cepas aisladas, mediante PCR convencional y secuenciación; para evaluar la diversidad procedente de las zonas afectadas por derrames de hidrocarburos en Tabasco y Veracruz.

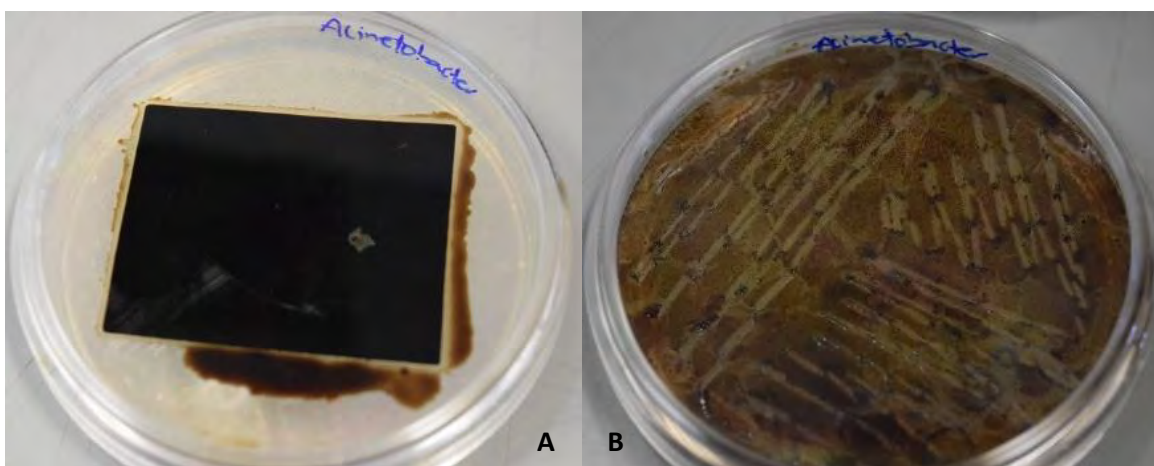
## 5 Material y método

### 5.1 Diseño de medios minerales

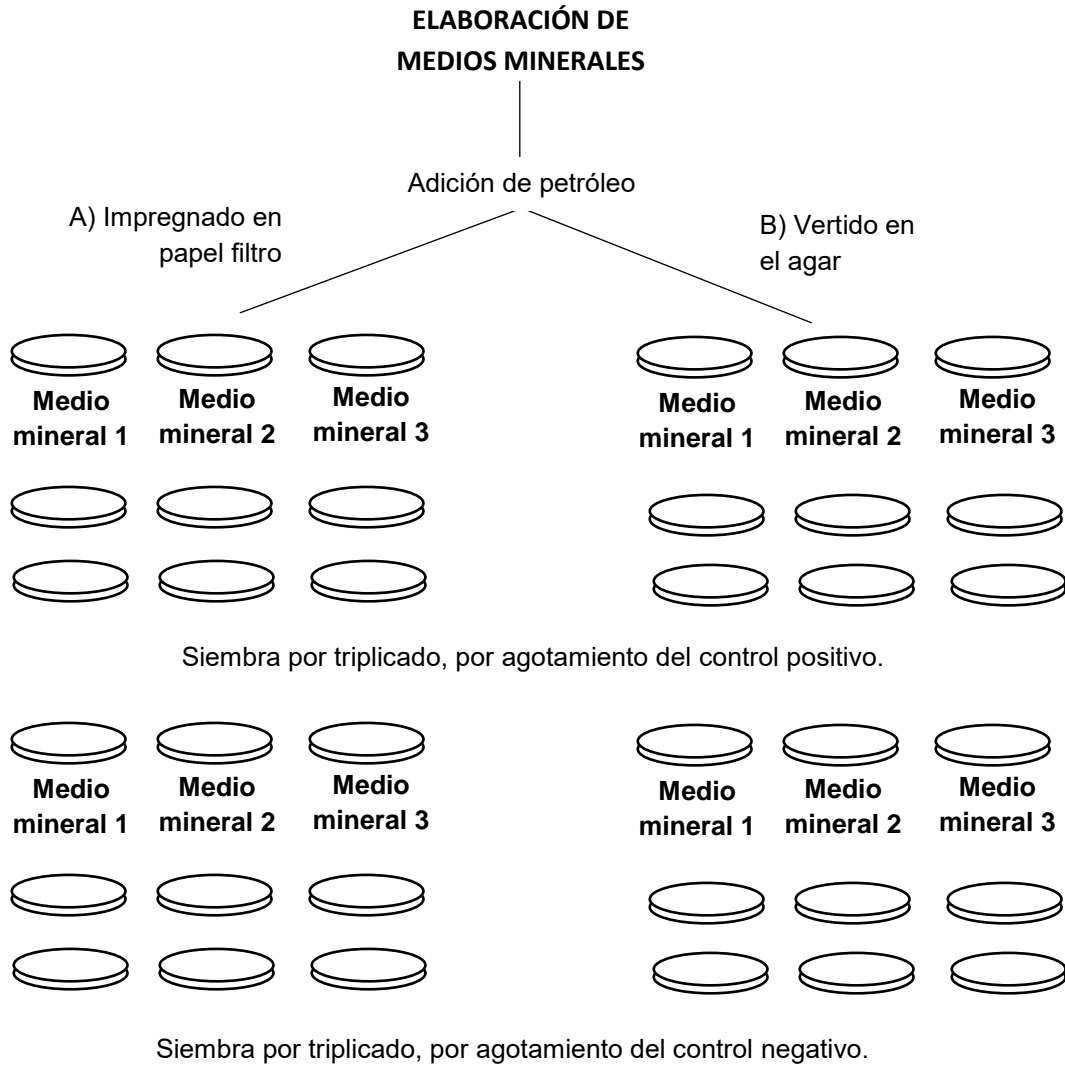
Previo al muestreo y con base en la revisión bibliográfica de los estudios realizados por Jobson *et al.*, (1972); Zajic and Supplisson (1972); Richarda and Vogel (1999); Hernández *et al.*, (2003); Linares *et al.*, (2006); Pérez Silva *et al.*, (2008); Dadrasnia and Agamuthu (2013); Segura *et al.*, (2016), se diseñaron tres medios de cultivo (ver Anexo 1, 2 y 3) utilizando como control positivo *Acinetobacter venetianus* CDBB-B-1525 y como control negativo *Escherichia coli* ATCC 35218. A los tres medios minerales se les suministró petróleo crudo, aproximadamente 1 mL, de dos formas: A) se adicionó el petróleo en papel filtro esterilizado y se colocó en la tapa de las cajas Petri y B) correspondió a la adición de petróleo como se muestra en la figura 5.

Cada una de las cepas, tanto del control positivo como el negativo, se sembraron por agotamiento y fue por triplicado en cada uno de los medios minerales, lo cual tenía por objetivo asegurar el crecimiento de las cepas procedentes del muestreo (Figura 6).

Para el cultivo de las muestras se eligió el medio mineral que presentara mejor crecimiento de *A. venetianus*, es decir, del control positivo.



**Figura 5.** Adición de petróleo a los medios minerales. A) Adición de petróleo mediante la utilización de papel filtro previamente esterilizado, B) Adición de petróleo en el agar.

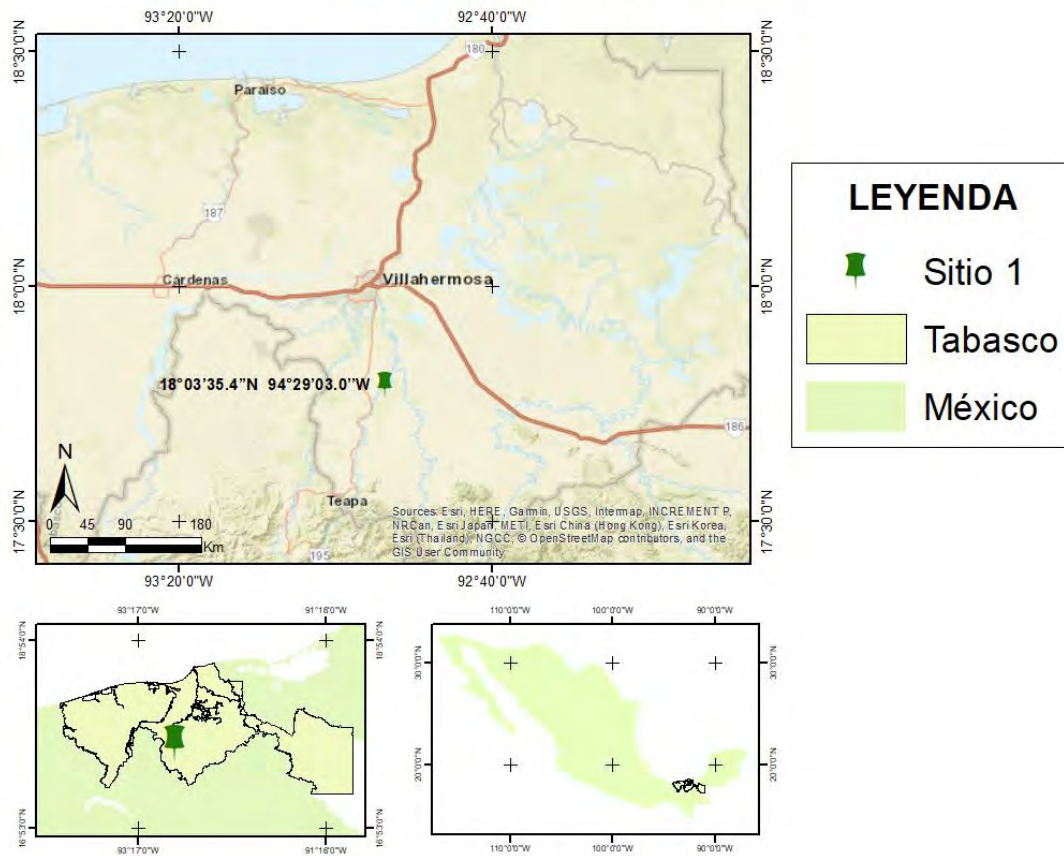


**Figura 6.** Esquema representativo del método de siembra para la elaboración de medios minerales.

### 5.2 Sitio de muestreo

Los muestreos se llevaron a cabo en dos estados: Tabasco y Veracruz. Las muestras fueron tomadas de la Ranchería Hueso de Puerco, Tabasco (Figura 7) que geográficamente se ubica en las coordenadas 17°47'22.1" latitud Norte y, 92°53'41.4" latitud Oeste, el sitio fue dictaminado en abril del 2015 como contaminado, provocado por un derrame de Pemex (López, 2015).

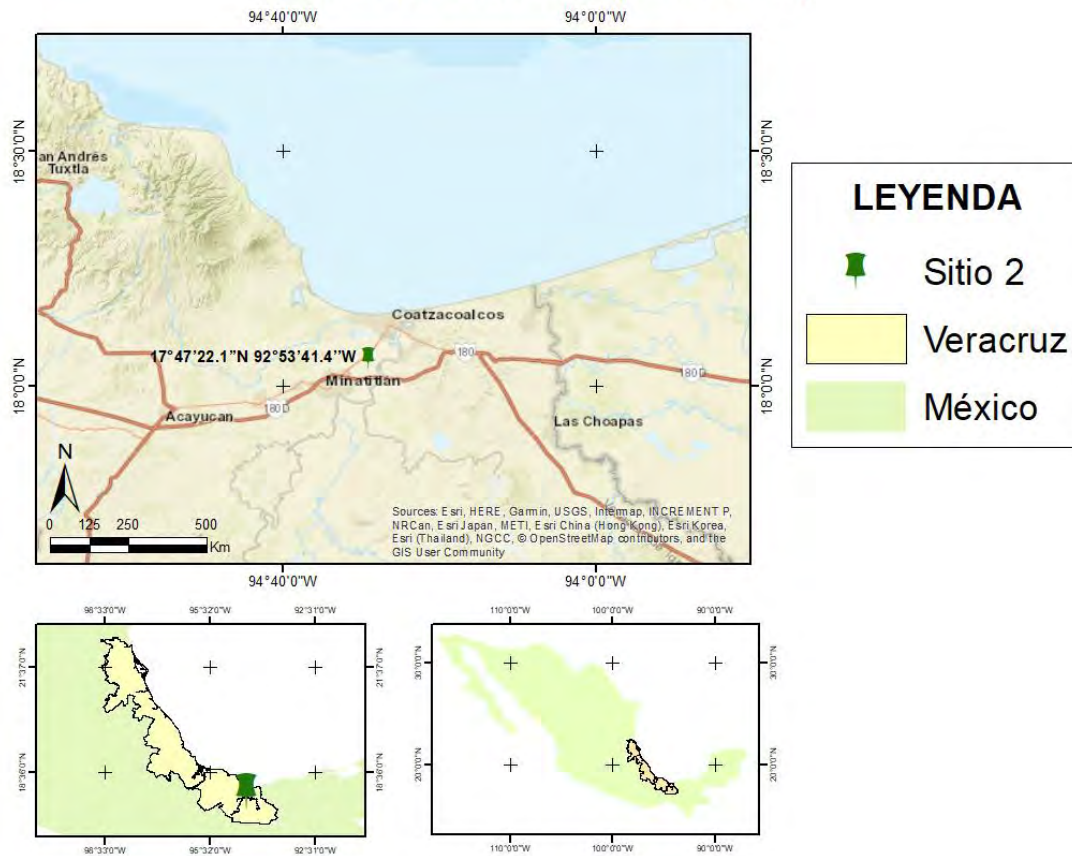
## ÁREA DE ESTUDIO (TABASCO)



**Figura 7.** Ranchería Hueso de Puerco, Tabasco. Coordenadas 17°47'22.1"N, 92°53'41.4"W.

En Veracruz las muestras fueron colectadas en la región conocida como Estero del Pantano, localizado en el municipio de Cosoleacaque (Figura 8), geográficamente se ubica en las coordenadas 18°03'35.4" latitud Norte y, 94°29'03.0" latitud Oeste dicho sitio fue dictaminado en septiembre del 2016 como contaminado de igual forma por un derrame de Pemex (Córdova, 2016).

## ÁREA DE ESTUDIO (VERACRUZ)



**Figura 8.** Estero del Pantano, municipio de Cosoleacaque, Veracruz. Coordenadas 18°03'35.4\"N, 94°29'03.0\"W.

Para la elaboración de los mapas (Figuras 7 y 8) se utilizó el programa ArcGIS versión 10.5 (ESRI, 2016).

### 5.3 Muestreo

El muestreo se diseñó conforme a lo establecido en la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 que establece los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos. El tipo de muestreo fue aleatorio simple, tomando ocho puntos dentro de cada área contaminada, y una de esas muestras se tomó por duplicado con el fin de asegurar la representatividad.

Para la toma de las muestras se perforó el suelo con una barrena Riverside y se colectaron con ayuda de una espátula a 30 cm de profundidad, se guardaron en

frascos de 40 mL de boca ancha, con tapa y sello de teflón previamente esterilizados, cada frasco fue etiquetado y marcado con tinta indeleble con la información necesaria. Se almacenaron a 4 °C y se transportaron al Laboratorio de Genética de la Conservación del Área Académica de Biología (AAB), para ser analizadas.

Las muestras se tomaron durante la época de lluvia durante el mes de octubre del año 2016.

Los parámetros físicoquímicos; temperatura y pH, fueron medidos *in situ* de acuerdo a la metodología propuesta por Linares *et al.*, (2006).

#### **5.4 Evaluación de hidrocarburos de fracción ligera presentes en el suelo y humedad relativa**

Para determinar la concentración de hidrocarburos de fracción ligera del petróleo, dos muestras de suelo contaminado (una perteneciente a la Ranchería Hueso de Puerco, Tabasco y la otra tomada en Estero del Pantano, Veracruz) fueron enviadas al laboratorio LAQMISA, S.A. de C.V en la Ciudad de México, analizadas por el método establecido en la NMX-AA-105-SCFI-2014 donde se evalúan los HFL por cromatografía de gases con detectores de ionización de flama o espectrometría de masas (Diario Oficial de la Federación, 2014).

Para lo cual, se utilizó un Cromatógrafo Varian 3700 con detector de conductividad térmica y una columna OV 17 en Cromosorb W 3% 80/100 AW. El programa de temperatura fue de 70 – 260 °C a 6 °C/min, seguido de una isoterma de 260 °C durante 60 min. La temperatura de inyector y detector fue de 250 °C, se utilizó 1 µL de muestra por inyección y el gas acarreador fue helio.

De esas mismas muestras en el laboratorio LAQMISA, S.A. de C.V se llevó a cabo la evaluación de humedad relativa, que es la cantidad de agua que el suelo contiene en el momento de su extracción, siguiendo la metodología modificada por Linares *et al.*, (2006).

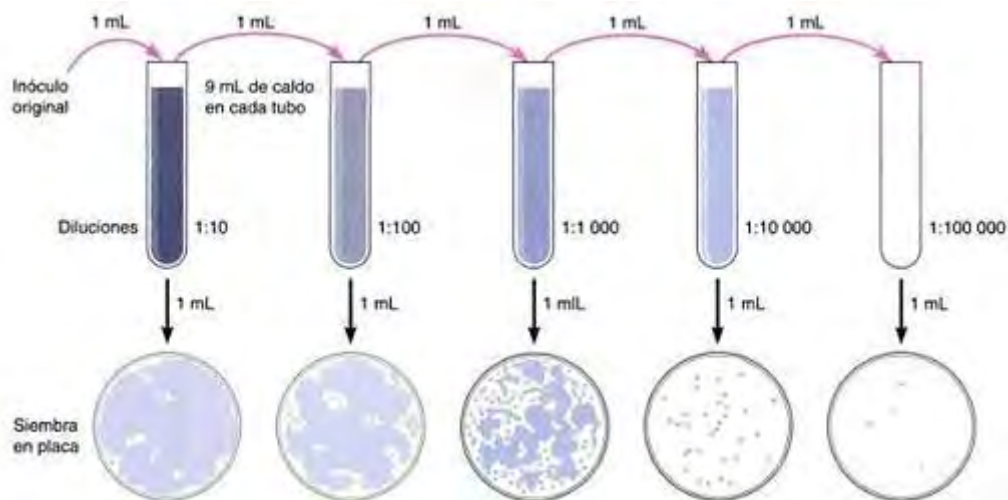


### 5.5 Diluciones decimales seriadas

Se realizaron diluciones decimales seriadas en tubos eppendorf de plástico con tapón de rosca de 10 mL previamente esterilizados; se preparó 9 mL de disolución salina isotónica 0.85% (ver Anexo 5) adicionada con 1 gramo de suelo, se agitó en vórtex durante 30 segundos, a partir de esa primer disolución las diluciones se prepararon con un volumen de 9 veces el diluyente y un volumen de la muestra, se realizó el mismo procedimiento hasta que se obtuvieron las diluciones necesarias (Figura 9).

Las diluciones se realizaron en series decimales de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$  en tubos eppendorf de microcentrífuga de 1.5 mL. Únicamente las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  se sembraron en cajas Petri con el medio mineral seleccionado, cada una por triplicado, para ello se tomaron 200  $\mu$ L y se sembraron por extensión en placa, se incubaron a 37 °C durante 48 h.

De igual forma se sembró en condiciones de anaerobiosis siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para las diluciones, sin embargo, la incubación se realizó utilizando una jarra de anaerobiosis.



**Figura 9.** Diluciones decimales seriadas y visualización de la siembra en placa. Tomado de Tortosa (2016).

## **5.6 Conteo de colonias, morfología colonial**

Transcurrido el tiempo de incubación (48 h) se realizó el conteo de colonias a simple vista y se reportaron como unidades formadoras de colonia (UFC).

Se realizó una descripción morfológica de las colonias que se deseaban aislar refiriendo su borde, elevación y textura basados en el manual de Prácticas de microbiología General (Ramírez *et al.*, 1998; Benson, 2002).

## **5.7 Cepario**

Principio: un cepario es una colección de microorganismos, que se han conservado para su uso en diagnóstico e investigación (Pesina, 2014).

Metodología: se seleccionaron UFC aisladas, con diámetro mayor a 5 mm y que fueran morfológicamente diferentes entre ellas. Se resembraron en caldo nutritivo (ver Anexo 4), y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo y tras observar buena densidad óptica (540nm) se prepararon de la siguiente forma:

1. Se tomó 1 mL del cultivo en un tubo de microcentrifuga estéril de 2 mL.
2. Se adicionó glicerol al 30% v/v previamente esterilizado y se resuspendió perfectamente.
3. Las muestras se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron en ultracongelación a -70 °C, debidamente rotuladas.

## **5.8 Tinciones diferenciales**

Este tipo de tinciones permiten observar la morfología celular y diferentes características como el grosor de la pared celular (Pérez y Peris, 2003).

### **5.8.1 Tinción de Gram**

Principio: basada en reacción diferencial de la composición y estructura de la pared celular las bacterias Gram positivas se teñirán con el primer colorante que es el cristal violeta, debido a que su pared celular es más gruesa, tienen mayor contenido de peptidoglicano y por sus enlaces  $\beta$  (1,4) entre las moléculas N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico y especialmente por la gran cantidad de enlaces peptídicos a

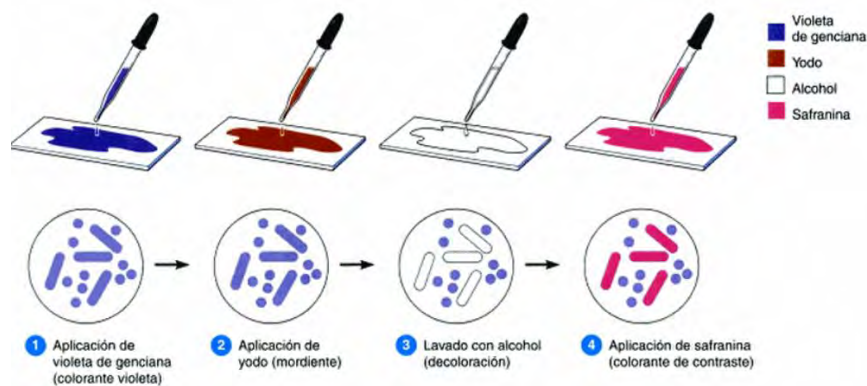
través de puentes de pentaglicina. Por el contrario, las cepas bacterianas Gram negativas se teñirán con el colorante de contraste que es la safranina (Ramírez *et al.*, 2015).

Metodología: el procedimiento clásico de este tipo de tinción consiste en fijar la muestra biológica en la superficie del portaobjetos por calor. Posteriormente la muestra se cubre con el primer colorante; cristal violeta, durante un minuto, transcurrido el tiempo la muestra se lava ligeramente con agua destilada para eliminar el exceso de colorante. El siguiente paso consiste en teñir con un mordiente ya sea lugol o yodo un minuto y nuevamente lavar con agua el exceso del reactivo usado. Se agregan gotas de alcohol-acetona a la muestra para su decoloración, para lo que se deja 30 segundos y posteriormente se lava con agua abundante. Finalmente se cubre la preparación con un colorante de contraste; safranina, durante un minuto (Figura 10). Se lava con agua, se seca al aire y se observa al microscopio (Cavallini *et al.*, 2005).

#### Resultados esperados:

Prueba positiva: las cepas bacterianas Gram positivas tendrán una coloración azul o violeta.

Prueba negativa: las cepas bacterianas Gram negativas tendrán una coloración rosa.



**Figura 10.** Tinción de Gram. Tomado de Tortora *et al.*, (2007).

## **5.9 Pruebas bioquímicas**

El metabolismo es el conjunto de reacciones que ocurren en los seres vivos, las cuales son catalizadas por enzimas. Las pruebas bioquímicas permiten evaluar la presencia o ausencia de ciertas enzimas en los microorganismos, lo cual tiene por objeto realizar una identificación rápida y así mismo sustentar los datos moleculares con la tipificación de las cepas (Tortora *et al.*, 2007).

Para la realización de las pruebas bioquímicas se tomaron las UFC que crecieron en el medio mínimo utilizado.

### **5.9.1 Catalasa**

Principio: la catalasa es una enzima presente en la mayoría de las bacterias aerobias estrictas, facultativas y anaerobias aerotolerantes. Dicha enzima cataliza la liberación de agua ( $H_2O$ ) y oxígeno ( $O_2$ ) a partir de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ); (Forbes *et al.*, 2007).

Metodología: con un asa bacteriológica se toma una muestra de una colonia de los microorganismos de interés, se coloca en un portaobjetos y se le adiciona una gota de peróxido de hidrógeno al 30% (ver Anexo 6).

Resultados esperados:

Prueba positiva: se presenta efervescencia.

Prueba negativa: no hay efervescencia (Forbes *et al.*, 2007).

### **5.9.2 Oxidasa**

Principio: la enzima citocromo oxidasa participa en el transporte de electrones y en la vía metabólica del nitrato de algunas bacterias (Forbes *et al.*, 2007).

Metodología: con asa de siembra se toma una muestra de la colonia, se coloca sobre papel filtro y se cubre con una gota del reactivo clorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina al 1% v/v (ver Anexo 7).

Resultados esperados:

Prueba positiva: color violeta oscuro dentro de los 10 segundos.

Prueba negativa: ausencia de color (Forbes *et al.*, 2007).

### **5.10 Identificación molecular por PCR convencional**

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (por sus siglas en inglés PCR) es el método utilizado para sintetizar secuencias específicas de DNA de manera *in vitro*, dentro de la versatilidad de usos de esta técnica molecular se utiliza para realizar estudios comparativos o filogenéticos para amplificar genes de diversas procedencias. En estos casos los cebadores (o primers) se sintetizan para regiones del gen cuya secuencia está conservada en una gran variedad de organismos, como el gen rRNA 16S en procariontes (Madigan *et al.*, 2009).

#### Metodología:

##### **5.10.1 Protocolo de extracción**

Modificado de Hernández *et al.*, (2013).

- 1) Suspensión: para las extracciones de DNA cromosómico de las bacterias aisladas se subcultivaron en agar nutritivo, incubándolas durante 24 horas a 35 °C.  
Posteriormente se tomaron 3 mL del cultivo, se centrifugaron durante 1 minuto a máxima velocidad (15000 rpm) y se tiró el sobrenadante para conservar únicamente los botones con células o pellets.
- 2) Extracción: el protocolo de extracción se llevó a cabo de manera indistinta para bacterias Gram positivas y Gram negativas (ver Anexo 11).
- 3) Cuantificación y amplificación: el DNA se cuantificó usando un Nanodrop (Shanghai Mapada Instruments Co, Ltd.) y la amplificación de fragmentos se realizó usando un Arktik Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) y un par de cebadores para el gen 16S rRNA E517F 5'-GCCAGCAGCCGCGGTAA-3' y E1065R 5'-ACAGCCATGCAGCACCT-3'. La PCR incluyó una desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos, amplificación (33 ciclos a 94 °C durante 45 s, 55 °C durante 45 s, 72 °C durante 45 s) y la extensión final a 72 °C durante 8 min.

El rendimiento y la integridad de los amplicones de DNA se probaron mediante electroforesis en gel con agarosa al 2% (ver Anexo 10).

### **5.10.2 Secuenciación**

Los fragmentos amplificados fueron secuenciados por Macrogen (Seúl, Corea del Sur), para su envío se prepararon de la siguiente forma; 10 µL de muestra de DNA en un tubo eppendorf de 1.5 mL + 5 µL de primer (concentración 5 pmol).

El proceso de secuenciación se realizó con los mismos oligonucleótidos utilizados en la amplificación.

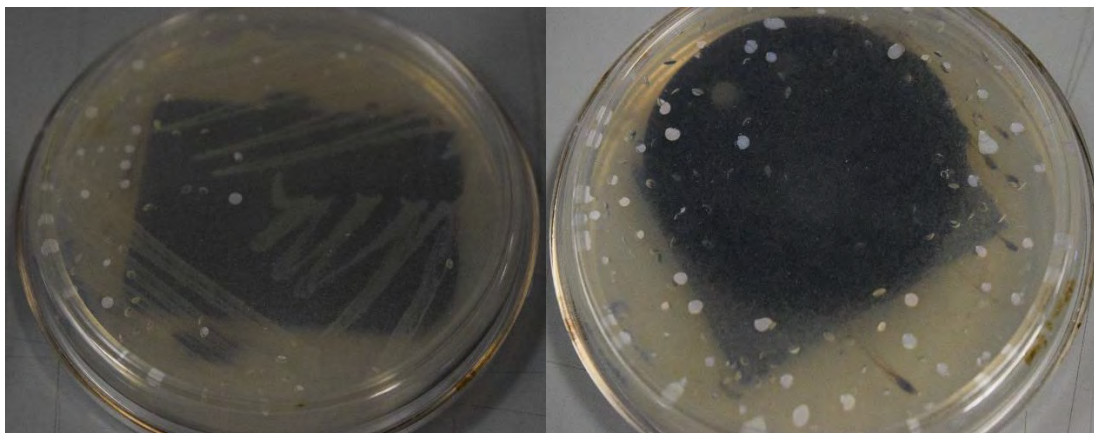
Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias conocidas disponibles en la base de datos NCBI por medio de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), para conocer los géneros y/o especies de las cepas bacterianas aisladas.

## **6 Resultados**

### **6.1 Medios minerales**

De acuerdo con los resultados obtenidos a partir de la prueba de los 3 medios minerales, el medio número 1 se descartó ya que no se observó crecimiento por parte de ninguno de los dos controles. En el medio número dos, a pesar de haber crecimiento de *Acinetobacter venetianus*, no era tan abundante como lo obtenido en el medio número 3 (ver Anexo 3), adicionando el petróleo mediante el uso de papel filtro como se observa en la figura 11.

En ninguno de los tratamientos se observó crecimiento del control negativo.



**Figura 11.** Medio de cultivo 3. Seleccionado para la siembra de las muestras tomadas en Tabasco y Veracruz debido a que se observó mejor el crecimiento del control positivo (izquierda), en ninguno de los medios preparados creció el control negativo (derecha).

### **6.2 Parámetros fisicoquímicos y evaluación de hidrocarburos**

En la Tabla III se observan condiciones similares en la temperatura del suelo para ambos sitios de muestreo; sin embargo, hubo un intervalo de variación importante en el pH, donde se observa en Tabasco pH desde 7.88 hasta 8.32 y en Veracruz desde 6.62 hasta 7.63.

En la Tabla IV se observan los promedios de la temperatura 32.61 °C y 30.02 °C, pH 8 y 7.14 para Ranchería Hueso de Puerco y Estero del Pantano

respectivamente, así como los resultados obtenidos del análisis de cromatografía de gases realizada en el laboratorio LAQMISA, S.A. de C.V en la Ciudad de México (Figura 12), donde las fracciones de hidrocarburos de fracción ligera no sobrepasan los límites máximos permisibles de acuerdo a la NMX-AA-105-SCFI-2014 para ninguno de los dos sitios.

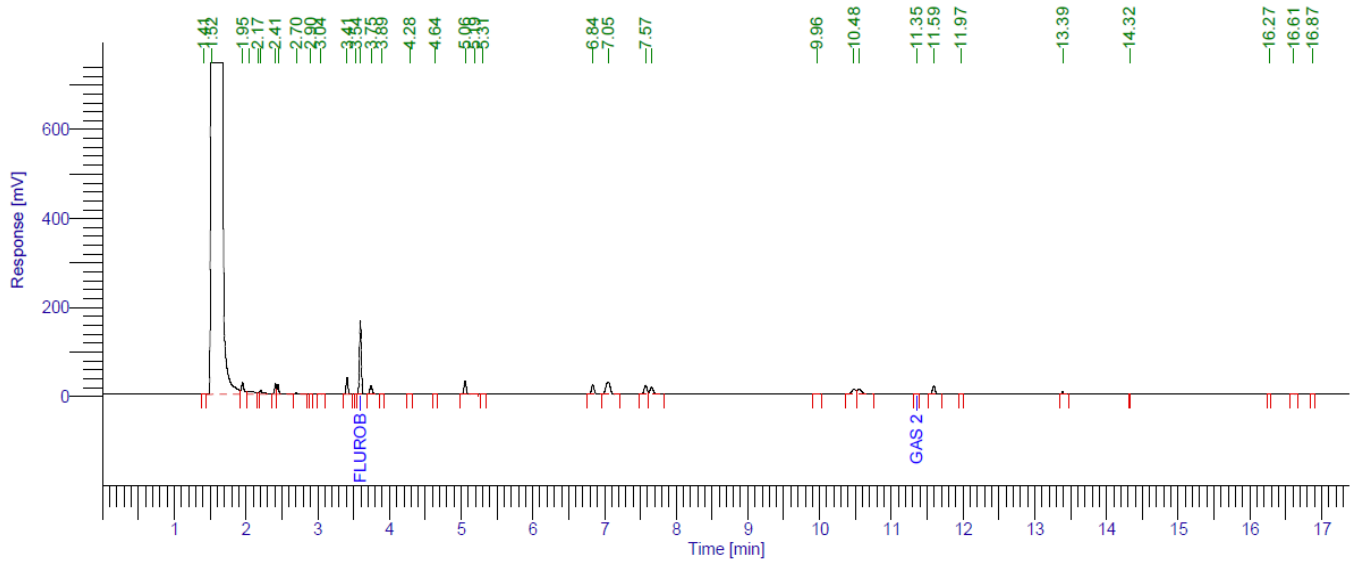
**Tabla III.** Parámetros fisicoquímicos de los puntos de muestreo en los estados de Tabasco y Veracruz.

SITIO 1. RANCHERÍA HUESO DE PUERCO, TABASCO			SITIO 2. ESTERO DEL PANTANO, VERACRUZ		
Punto de muestreo	pH	°C	Punto de muestreo	pH	°C
1	8.09	33.7	1	6.62	31.8
2	8.32	34.3	2	6.95	31.4
3	7.92	32.8	3	7.46	29.1
4	7.88	30.2	4	7.54	29.2
5	7.96	30	5	7.63	31.7
6	8.18	33.4	6	7.29	30.8
7	8.27	31.6	7	7.19	29.6
8	7.97	33.5	8	6.91	28
9	8.01	34	9	6.75	30.5

**Tabla IV.** Promedio de los parámetros fisicoquímicos, porcentaje de humedad de cada sitio y la cantidad de hidrocarburos de fracción ligera presentes en el suelo.

Sitio	pH	Temperatura (°C)	Humedad relativa (%)	Hidrocarburos de fracción ligera (mg.kg <sup>-1</sup> )
1	8 ± 0.15	32.61 ± 1.62	29.15	< 0.931 mg.Kg <sup>-1</sup>
2	7.14 ± 0.36	30.2 ± 1.32	25.01	< 0.931 mg.Kg <sup>-1</sup>





Peak #	Time [min]	Component Name	Area [ $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ]	Height [ $\mu\text{V}$ ]	Conc mg/L
	2.610	GAS 1	1712784.23	38729.57	98.4623
15	3.631	Flurobenceno	4221794.29	163511.10	0.7999
29	11.372	GAS 2	1705964.78	3500.72	98.7543
			73640543.30	202276.39	198.0165

**Figura 12.** Cromatograma obtenido de la evaluación de HFL.

### 6.3 Determinación de la densidad bacteriana (conteo de UFC)

En la Tabla V se observa de manera resumida el conteo de células viables realizada en medios sólidos, donde se reportan como Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por cada punto de muestreo. En la tabla completa (ver Anexo, Tabla V. Continuación) se aprecia que en muestras tomadas en ambos estados las cepas crecieron principalmente en las diluciones  $10^{-3}$  y raramente hubo crecimiento en las últimas diluciones decimales seriadas; de igual forma se puede observar que hubo mayor crecimiento en las muestras tomadas en Tabasco, con un máximo de 4.55  $\text{Log}_{10}$  UFC.g<sup>-1</sup> contra un máximo de 4  $\text{Log}_{10}$  UFC.g<sup>-1</sup> con las del estado de Veracruz.

**Tabla V.** Número total de Unidades Formadoras de Colonias que crecieron de las diluciones decimales seriadas en agar adicionado con petróleo, incubadas a 37 °C durante 48 h, en condiciones aerobias y anaerobias.

<b>Sitio 1. Ranchería Hueso De Puerco</b>		
<b>Punto de muestreo</b>	<b># total de UFC.g<sup>-1</sup></b>	<b>Log<sub>10</sub> UFC.g<sup>-1</sup></b>
2	4X10 <sup>3</sup>	3.60
3	31X10 <sup>3</sup>	4.49
4	36X10 <sup>3</sup>	4.55
<b>Sitio 2. Estero Del Pantano</b>		
<b>Punto de muestreo</b>	<b># total de UFC.g<sup>-1</sup></b>	<b>Log<sub>10</sub> UFC.g<sup>-1</sup></b>
2	1X10 <sup>3</sup>	3
3	1X10 <sup>4</sup>	4
5	4X10 <sup>3</sup>	3.60

#### **6.4 Descripción morfológica, tinción diferencial y pruebas bioquímicas de las colonias aisladas**

En total se seleccionaron 76 UFC de ambos sitios. En los datos observados para las cepas aisladas de ambos sitios (Tabla VI) la morfología fue similar para la mayoría de las colonias; los colores predominantes fueron beige con una forma circular y borde principalmente filamentosos o enteros, siendo en su mayoría Gram negativas y en las observaciones al microscopio la morfología celular correspondió principalmente a bacilos. Dentro de las pruebas bioquímicas realizadas de igual forma para ambos sitios se registraron cepas catalasa positiva; sin embargo, en la prueba bioquímica de oxidasa para el estado de Tabasco la mayoría de las cepas tuvieron un resultado negativo, mientras que en las de Veracruz fue positivo.

**Tabla VI.** Morfología, tinción diferencial de Gram y pruebas bioquímicas.

SITIO 1. RANCHERÍA HUESO DE PUERCO								
MUESTRA	CARACTERÍSTICAS COLONIALES				TINCIÓN DIFERENCIAL	MORFOLOGÍA CELULAR	BIOQUÍMICAS	
	COLOR	FORMA	BORDE	ELEVACIÓN	GRAM		CATALASA	OXIDASA
1, 4, 5, 6, 8, 13, 15, 19, 20, 21, 27, 28, 40, 41, 45, 55, 57	blanco	filamentosa	filamentoso	rugosa	-	bacilos	+	-
2, 29, 32, 37	beige	ameboide	ondulado	convexa	-	bacilos cortos	-	+
7	blanco	filamentosa	filamentoso	rugosa	-	bacilos	-	-
53	blanco	filiforme	irregular	elevada	-	bacilos cortos	-	-
3	blanco	filamentosa	filamentoso	rugosa	+	bacilos cortos	+	-
10, 38	beige	circular	irregular	elevada	-	bacilos	+	-
11, 48, 49, 50, 52, 56	beige	circular	irregular	convexa	-	bacilos	+	+
12	beige	circular	irregular	convexa	-	bacilos	-	-
14, 26, 29	beige	circular	entero	elevada	-	bacilos	+	-
16	amarillo	circular	irregular	convexa	-	bacilos cortos	+	-
18, 22, 23, 34	beige	circular y extendida	ondulado	plana	-	bacilos	+	+
25, 51	beige	circular	irregular	convexa	-	bacilos	+	+
30, 58, 64	beige	circular	entero	plana	-	bacilo	+	-
35	beige	ameboide	ondulado	elevada	-	bacilos	+	+
36	beige	ameboide	ondulado	convexa	-	bacilos cortos	+	+
42, 46	beige	circular con margen elevado	entero	elevada	-	bacilos	+	+
43	beige	circular	irregular	acuminada	-	bacilos	+	+
44	beige	ameboide	crenado	elevada	-	bacilos	+	-
47, 65, 66	blanco	ameboide	entero	elevada	+	bacilos cortos	-	-

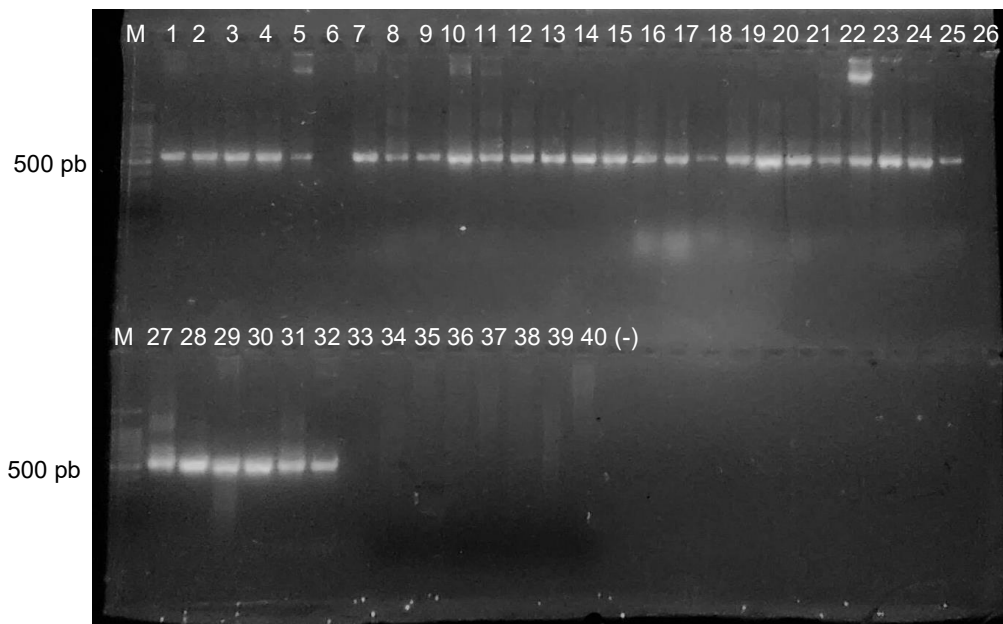
54	blanco	circular	lobulado	plana	+	bacilos	-	-
59,60, 62, 63	rosa pálido	irregular y extendido	irregular	plana	-	bacilos	-	+
61	anaranjado	redonda con margen radial	ondulado	elevada	-	bacilos	-	-
67	anaranjado	circular	entero	elevada	-	bacilos cortos	+	+

**SITIO 2. ESTERO DEL PANTANO**

MUESTRA	CARACTERÍSTICAS COLONIALES				TINCIÓN DIFERENCIAL	MORFOLOGÍA CELULAR	BIOQUÍMICAS	
	COLOR	FORMA	BORDE	ELEVACIÓN	GRAM		CATALASA	OXIDASA
68, 72, 76	beige	circular	entero	plana	-	bacilos	+	+
69, 70, 79	blanco	ameboide	ondulado	elevada	-	bacilos	+	+
73	beige	ameboide	irregular	plana	-	bacilos	-	+
74, 75	blanco	puntiforme	irregular	plana	-	bacilos	+	-
77	blanco	circular	entero	elevada	-	bacilos cortos	-	-
78	beige	circular	entero	elevada	-	bacilos cortos	+	-
80	beige	circular	entero	plana	-	bacilos	-	+
81	beige	circular	entero	plana	+	bacilos	-	-
82	beige	puntiforme	entero	plana	-	bacilos	+	+

### 6.5 Identificación molecular por PCR convencional

Los resultados de la PCR mostraron la presencia de una banda de 500-600 pb que corresponde al tamaño esperado del gen 16S (Figura 13).



**Figura 13.** Visualización de las amplificaciones de PCR en gel de agarosa.

De las 76 cepas seleccionadas de ambos sitios, se aislaron 62 cepas en el estado de Tabasco, las cuales corresponden a 19 especies dentro de 7 géneros, los más representativos fueron: 1) *Pseudomonas* por *P. aeurginosa*, *P. alcaligenes*, *P. azotoformans*, *P. hibscicola*, *P. indica*, *P. prosekii* y *P. tolaasii*; 2) *Bacillus* por *B. aerius*, *B. atrophaeus*, *B. paralicheniformis* y *B. subtilis* y 3) *Acinetobacter* por *A. baumannii*, *A. brisouii* y *A. oleivorans* (Tabla VII, donde se observa el número de cepa aislada, seguido del nombre y número de referencia del NCBI, así como el porcentaje de similitud).

De las muestras tomadas en el estado de Veracruz se aislaron 14 cepas, las cuales pertenecen a 9 especies dentro de 5 géneros, los más representativos fueron: 1) *Pseudomonas* por *P. azotoformans*, *P. knackmussii*, *P. multiresinivorans* y *P. panipatensis* y 2) *Acinetobacter* por *A. schindleri* y *A. tandoii*.

La mayoría de las cepas aisladas en ambos estados, mostraron una gran similitud (97%-100%) con secuencias disponibles en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Los géneros más comunes identificados tanto en Tabasco como en Veracruz fueron *Acinetobacter* y *Pseudomonas*.

Algunas de las cepas que crecieron en los medios minerales enriquecidos con petróleo en condiciones anóxicas corresponden a *B. atrophaeus*, *L. panacisoli*, *P. hibiscicola*, *P. aeruginosa*, *P. alcaligenes*, *D. polyhydroxybutyrativorans*, siendo estos dos últimos géneros (*Diaphorobacter* y *Pseudomonas*) los únicos que crecieron tanto en condiciones aerobias como anaerobias.

Para evaluar los resultados de las pruebas bioquímicas, posterior a la identificación molecular, se compararon los resultados obtenidos con lo reportado por Boone *et al.*, (2001) y se observó que algunas de las cepas aisladas presentaban resultados diferentes a las pruebas de catalasa y oxidasa esperados (ver anexo, Tabla IX); las cepas 2, 29, 32, 37 identificadas dentro del género *Acinetobacter* tienen catalasa - y oxidasa +. De igual forma, las cepas 7, 53 y 77 pertenecientes al mismo género, poseen catalasa – y oxidasa -.

Para el caso de las cepas 12, 54, 47 65, 66 y 81 presentan catalasa – y oxidasa -, así como la cepa número 35 presenta catalasa + y oxidasa +, todas las cepas identificadas dentro del género *Bacillus*.

La cepa número 16 identificada como *L. huabeiensis* presenta catalasa + y oxidasa -. Para la cepa número 44 identificada como *Pseudomonas azotoformans* presenta catalasa + y oxidasa -.

Y finalmente las cepas número 59, 60, 62, 63 presentaron catalasa - y oxidasa +, mientras que la número 61 presentó catalasa - y oxidasa -, todas identificadas como *Lysobacter panacisoli*.

**Tabla VII.** Identificación molecular de cepas aisladas, número de acceso con la base de datos NCBI y porcentaje de similitud.

<b>SITIO 1. RANCHERÍA HUESO DE PUERCO</b>					
<b>No.</b>	<b>Referencia</b>	<b>% de similitud</b>	<b>No.</b>	<b>Referencia</b>	<b>% de similitud</b>
<b>1</b>	<i>Acinetobacter oleivorans</i> NR_102814.1	98%	<b>37</b>	<i>Acinetobacter oleivorans</i> NR_102814.1	99%
<b>2</b>	<i>Acinetobacter oleivorans</i> NR_102814.1	96%	<b>38</b>	<i>Acinetobacter baumannii</i> NR_117677.1	99%
<b>3</b>	<i>Bacillus paralicheniformis</i> NR_137421.1	95%	<b>39</b>	<i>Acinetobacter brisouii</i> NR_115871.1	99%
<b>4</b>	<i>Acinetobacter oleivorans</i> NR_102814.1	99%	<b>40</b>	<i>Acinetobacter oleivorans</i> NR_102814.1	99%
<b>5</b>	<i>Acinetobacter oleivorans</i> NR_102814.1	99%	<b>41</b>	<i>Acinetobacter oleivorans</i> NR_102814.1	99%
<b>6</b>	<i>Acinetobacter oleivorans</i> NR_102814.1	99%	<b>42</b>	<i>Pseudomonas tolaasii</i> NR_114481.1	99%
<b>7</b>	<i>Acinetobacter oleivorans</i> NR_102814.1	99%	<b>43</b>	<i>Pseudomonas prosekii</i> NR_132724.1	91%
<b>8</b>	<i>Acinetobacter oleivorans</i> NR_102814.1	99%	<b>44</b>	<i>Pseudomonas azotoformans</i> NR_113600.1	99%
<b>10</b>	<i>Acinetobacter baumannii</i> NR_117677.1	99%	<b>45</b>	<i>Acinetobacter oleivorans</i> NR_102814.1	99%
<b>11</b>	<i>Pseudomonas hibiscicola</i> NR_024709.1	99%	<b>46</b>	<i>Pseudomonas tolaasii</i> NR_114481.1	99%
<b>12</b>	<i>Bosea vestrisii</i> NR_028799.1	98%	<b>47</b>	<i>Bacillus subtilis</i> NR_102783.1	97%
<b>13</b>	<i>Acinetobacter oleivorans</i> NR_102814.1	99%	<b>48</b>	<i>Pseudomonas hibiscicola</i> NR_024709.1	89%
<b>14</b>	<i>Acinetobacter brisouii</i> NR_115871.1	99%	<b>49</b>	<i>Pseudomonas hibiscicola</i> NR_024709.1	99%
<b>15</b>	<i>Acinetobacter oleivorans</i>	99%	<b>50</b>	<i>Pseudomonas hibiscicola</i>	99%

	NR_102814.1			NR_024709.1	
<b>16</b>	<i>Luteimonas huabeiensis</i> NR_109692.1	98%	<b>51</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NR_117678.1	98%
<b>18</b>	<i>Pseudomonas indica</i> NR_114196.1	99%	<b>52</b>	<i>Pseudomonas hibiscicola</i> NR_024709.1	89%
<b>19</b>	<i>Acinetobacter oleivorans</i> NR_102814.1	99%	<b>53</b>	<i>Acinetobacter oleivorans</i> NR_102814.1	91%
<b>20</b>	<i>Acinetobacter oleivorans</i> NR_102814.1	99%	<b>54</b>	<i>Bacillus atrophaeus</i> NR_116190.1	99%
<b>21</b>	<i>Acinetobacter oleivorans</i> NR_102814.1	99%	<b>55</b>	<i>Acinetobacter oleivorans</i> NR_102814.1	99%
<b>22</b>	<i>Pseudomonas indica</i> NR_114196.1	99%	<b>56</b>	<i>Pseudomonas hibiscicola</i> NR_024709.1	99%
<b>23</b>	<i>Pseudomonas indica</i> NR_114196.1	98%	<b>57</b>	<i>Acinetobacter oleivorans</i> NR_102814.1	99%
<b>25</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NR_117678.1	95%	<b>58</b>	<i>Diaphorobacter polyhydroxybutyratorans</i> NR_137222.1	100%
<b>26</b>	<i>Acinetobacter brisouii</i> NR_115871.1	99%	<b>59</b>	<i>Lysobacter panacisoli</i> NR_134075.1	94%
<b>27</b>	<i>Acinetobacter oleivorans</i> NR_102814.1	99%	<b>60</b>	<i>Lysobacter panacisoli</i> NR_134075.1	99%
<b>28</b>	<i>Acinetobacter oleivorans</i> NR_102814.1	99%	<b>61</b>	<i>Lysobacter panacisoli</i> NR_134075.1	93%
<b>29</b>	<i>Acinetobacter oleivorans</i> NR_102814.1	97%	<b>62</b>	<i>Lysobacter panacisoli</i> NR_134075.1	98%
<b>30</b>	<i>Diaphorobacter polyhydroxybutyratorans</i> NR_137222.1	99%	<b>63</b>	<i>Lysobacter panacisoli</i> NR_134075.1	99%
<b>32</b>	<i>Acinetobacter oleivorans</i> NR_102814.1	99%	<b>64</b>	<i>Diaphorobacter polyhydroxybutyratorans</i> NR_137222.1	99%
<b>34</b>	<i>Pseudomonas indica</i> NR_114196.1	99%	<b>65</b>	<i>Bacillus subtilis</i> NR_102783.1	97%



<b>35</b>	<i>Bacillus aerius</i> NR_118439.1	99%	<b>66</b>	<i>Bacillus subtilis</i> NR_102783.1	97%
<b>36</b>	<i>Azospirillum formosense</i> NR_117483.1	97%	<b>67</b>	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> NR_113646.1	99%
<b>SITIO 2. ESTERO DEL PANTANO</b>					
<b>No.</b>	<b>Referencia</b>	<b>% de similitud</b>	<b>No.</b>	<b>Referencia</b>	<b>% de similitud</b>
<b>68</b>	<i>Pseudomonas knackmussii</i> NR_121733.1	98%	<b>76</b>	<i>Pseudomonas knackmussii</i> NR_121733.1	99%
<b>69</b>	<i>Pseudomonas azotoformans</i> NR_113600.1	99%	<b>77</b>	<i>Acinetobacter tandoii</i> NR_117630.1	97%
<b>70</b>	<i>Pseudomonas azotoformans</i> NR_113600.1	99%	<b>78</b>	<i>Acinetobacter schindleri</i> NR_025412.1	99%
<b>72</b>	<i>Pseudomonas knackmussii</i> NR_121733.1	99%	<b>79</b>	<i>Pseudomonas azotoformans</i> NR_113600.1	99%
<b>73</b>	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i> NR_025104.1	79%	<b>80</b>	<i>Pseudomonas panipatensis</i> NR_044209.1	99%
<b>74</b>	<i>Aeromonas aquatica</i> NR_136829.1	99%	<b>81</b>	<i>Bacillus atrophaeus</i> NR_112723.1	99%
<b>75</b>	<i>Aeromonas aquatica</i> NR_136829.1	95%	<b>82</b>	<i>Pseudomonas multiresinivorans</i> NR_119225.1	99%

Para conocer la diversidad bacteriana por grupos, contrastando los datos con el manual de Bergey (Boone *et al.*, 2001), se observó que los géneros identificados se encuentran distribuidos en dos Phyla; BXII. Proteobacteria y BXIII. Firmicutes como se observa en la Tabla VIII.

**Tabla VIII.** Diversidad de géneros identificados en Ranchería Hueso de Puerco y Estero del Pantano.

<b>Dominio Bacteria</b>	
<p><b>Phylum BXII. Proteobacteria</b></p> <p><b>Clase I. Alfaproteobacteria</b></p> <p><b>Orden I. Rhodospirillales</b></p> <p><b>Familia I. Rhodospirillaceae</b></p> <p><b>Género II. <i>Azospirillum</i></b></p> <p><b>Orden VI. Rhizobiales</b></p> <p><b>Familia VIII. Bradyrhizobiaceae</b></p> <p><b>Género V. <i>Bosea</i></b></p> <p><b>Clase II. Betaproteobacteria</b></p> <p><b>Orden I. Burkholderiales</b></p> <p><b>Familia IV. Comamonadaceae</b></p> <p><b>Género VII. <i>Diaphorobacter</i></b></p> <p><b>Clase III. Gammaproteobacteria</b></p> <p><b>Orden III. Xanthomonadales</b></p> <p><b>Familia I. Xanthomonadaceae</b></p> <p><b>Género III. <i>Luteimonas</i></b></p> <p><b>Género IV. <i>Lysobacter</i></b></p> <p><b>Género IX.</b></p> <p><i>Stenotrophomonas</i></p> <p><b>Orden IX. Pseudomonadales</b></p> <p><b>Familia I. Pseudomonadaceae</b></p> <p><b>Género I. <i>Pseudomonas</i></b></p> <p><b>Familia II. Moraxellaceae</b></p> <p><b>Género II. <i>Acinetobacter</i></b></p> <p><b>Orden XII. Aeromonadales</b></p> <p><b>Familia I. Aeromonadaceae</b></p> <p><b>Género I. <i>Aeromonas</i></b></p>	<p><b>Phylum BXIII. Firmicutes</b></p> <p><b>Clase III. Bacilli</b></p> <p><b>Orden I. Bacillales</b></p> <p><b>Familia I. Bacillaceae</b></p> <p><b>Género I. <i>Bacillus</i></b></p>

## **7 Discusión**

### **7.1 Medios minerales**

De acuerdo a los resultados, el uso de papel filtro para adicionar el crudo en los medios minerales probados para el aislamiento de bacterias hidrocarbonoclastas fue el más eficiente en comparación con el otro tratamiento, donde se adicionó el petróleo directamente en el agar (Figura 5), ya que permitió realizar las descripciones de la morfología y el conteo de las UFC. Esto coincide con la metodología empleada por Rivera *et al.*, (2002) donde, de igual forma que en el presente trabajo, aislaron cepas bacterianas degradadoras de hidrocarburos. Los mismos autores proponen que la sobrevivencia de bacterias a dichas condiciones poseen la capacidad para utilizar hidrocarburos alifáticos y aromáticos como donadores de electrones, debido a que la fuente de carbono está colocada a unos milímetros de distancia de la superficie del medio de cultivo.

Esta técnica, como lo describe Linares *et al.*, (2006), tiene su fundamento en la volatilización de los HFL, el crudo de petróleo al impregnarse en el papel filtro permite que las bacterias hidrocarbonoclastas se alimenten de los hidrocarburos volátiles.

En los medios donde se adicionó el petróleo directamente en el agar no fue posible apreciar el crecimiento del control positivo, *Acinetobacter venetianus*, cuya especie es capaz de degradar alcanos, lo cual puede estar relacionado con los datos obtenidos por Rivera *et al.*, (2002), donde las mismas bacterias que crecieron utilizando la metodología anterior fueron sometidas a un segundo tratamiento en el cual el medio fue adicionado con petróleo, sus resultados demostraron mayor rigurosidad en la selección, ya que crecieron un menor número de bacterias.

### **7.2 Muestreo. Parámetros fisicoquímicos y evaluación de hidrocarburos**

Las condiciones físicoquímicas descritas en este estudio son adecuadas para el crecimiento de microorganismos hidrocarbonoclastos. En la Ranchería Hueso de Puerco la temperatura fue un poco más alta y el pH estuvo en un intervalo neutro en contraste con Estero del Pantano (Tabla III y IV), esto se vio reflejado en la

diferencia de riqueza de especies, lo que sugiere una mejor atenuación del contaminante por el aumento del metabolismo de hidrocarburos en cepas aisladas en Tabasco. Dichos resultados concuerdan con lo propuesto por Leahy and Cowell (1990), donde establecen que las altas temperaturas aumentan las tasas de metabolismo de hidrocarburos por parte de los microorganismos, generalmente en un intervalo de 30 a 40 °C, de este modo la temperatura ambiental es clave para determinar las diferentes poblaciones presentes en el suelo.

Los mismos autores plantean que el pH tiene una influencia en la capacidad de las poblaciones microbianas para degradar los hidrocarburos, pues aunque éste puede ser muy variable, la mayoría de las bacterias y hongos heterótrofos se ven favorecidos por un pH neutro. En suelos con un pH alcalino o ácido se espera que la influencia de este parámetro químico sea negativa sobre la capacidad de las poblaciones microbianas para degradar los hidrocarburos (Leahy and Cowell, 1990).

Para los resultados obtenidos de la evaluación de HFL, el suelo de los sitios de muestreo no sobrepasa los límites de concentraciones de hidrocarburos de fracción ligera establecidos en la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012; sin embargo, de acuerdo con estudios realizados por del Carmen *et al.*, (2002), algunos microorganismos aislados en sitios donde ha ocurrido un derrame, independientemente del tiempo que lleve contaminado el lugar, son degradadores de petróleo. De igual forma Spain and Veld (1984), indican que las comunidades microbianas cercanas a los sitios de derrames aun con pequeñas cantidades del contaminante podrían utilizarse como una respuesta microbiana rápida de biorremediación por su resistencia a la presencia del crudo de petróleo.

El medio mínimo utilizado, como se mencionó anteriormente, únicamente tenía petróleo como fuente de energía, de esta forma es posible establecer que las bacterias aisladas son degradadoras de HFL, a partir de ello y con lo afirmado por los autores anteriores, se infiere una relación con la adaptación de la comunidad microbiana para los resultados obtenidos en la evaluación de HFL y el porcentaje de humedad.

### **7.3 Densidad bacteriana y pruebas bioquímicas**

El número total de microorganismos en el suelo, su composición y actividad están sujetos a diferentes variaciones geográfico-ecológicas, además del uso de suelo. Dos de los principales factores que son determinantes para la diversidad de la microbiota son la cantidad y composición de las sustancias orgánicas, ya que constituyen la base de la nutrición (Jiménez *et al.*, 2006).

Según lo anterior y de acuerdo a los estudios realizados por Jangid *et al.*, (2008), los fertilizantes orgánicos como el estiércol del ganado pueden promover las actividades de las comunidades microbianas del suelo, ya que responden a los cambios en el carbono y demás nutrientes. Con base en esto, el contraste de riqueza de especies entre Ranchería Hueso de Puerco y Estero del Pantano podría estar relacionado con las características dinámicas del suelo ya que las muestras tomadas en el estado de Tabasco, encontradas junto a potreros (los cuales actúan como fuente continua de materia orgánica, nitrógeno y fósforo) influyen en la diversidad bacteriana.

Además, otros factores que podrían evaluarse posteriormente, como la conductividad darían mayor información sobre las condiciones del suelo que podrían relacionarse con la diferencia en la diversidad de especies en el presente trabajo, ya que según estudios llevados a cabo por Mesa *et al.*, (2006), altos gradientes de salinidad pueden destruir la estructura terciaria de proteínas, desnaturalizar enzimas y deshidratar células, lo cual es letal para muchos microorganismos usados para el tratamiento de suelos contaminados.

Respecto a los resultados obtenidos de la tinción diferencial de Gram y en las observaciones de la morfología celular, se obtuvo una mayor densidad de bacilos Gram negativos, lo cual concuerda con lo reportado por varios autores como Sikkema *et al.*, (1995), Jaramillo *et al.*, (2011) y Martín *et al.*, (2012). Esto se debe a que las bacterias Gram negativas a diferencia de las Gram positivas, poseen en su membrana lipopolisacáridos, los cuales facilitan la formación y estabilización de emulsiones de hidrocarburos y contribuyen al incremento en la superficie de contacto con el contaminante.

En cuanto a las pruebas bioquímicas y la morfología descrita de las cepas aisladas, la mayoría de las pruebas coinciden con el comportamiento bioquímico de las bacterias; sin embargo, en algunos casos a pesar de ser la misma especie, algunas respondieron de manera diferente a las pruebas de catalasa y oxidasa. Esto se debe, como explica Martín *et al.*, (2012), a que los hidrocarburos inducen una respuesta de estrés en las bacterias generando cambios celulares a nivel de membrana, enzimáticos y proteicos. Es por ello que el uso de técnicas moleculares suelen preferirse por su eficacia, mientras que las pruebas bioquímicas sirven para apoyar identificaciones moleculares con porcentajes no tan elevados de similitud (menor al 95% de similitud); sin embargo, en este estudio no fue el caso.

Este tipo de problemáticas muestran la necesidad del uso de diferentes herramientas de identificación en microbiología, ya que basarse únicamente en un método sin conocer la morfología o la estructura genética podría presentar datos incongruentes, sin embargo como establecen Olmos *et al.*, (2010), cuando hay discrepancias entre el fenotipo y el genotipo de una cepa, ambos se deben estudiar de nuevo y confirmados los resultados, se considera que el genotipo se impone sobre el fenotipo.

#### **7.4 Identificación de cepas bacterianas degradadoras de petróleo crudo**

En el presente trabajo se lograron aislar especies que han sido descritas en estudios previos por su capacidad para degradar petróleo crudo o sus derivados como se muestra en la Tabla II, tal es el caso de *A. oleivorans* (Dahal *et al.*, 2017), *A. baumannii* (Tanase *et al.*, 2013), *P. hibiscicola* (Piyali and Pranab, 2012), *P. indica* (Pandey *et al.*, 2002), *P. aeruginosa* (Hanafy *et al.*, 2016), *P. azotoformans* (Zhi *et al.*, 2011), *P. alcaligenes* (Hickey *et al.*, 2007), *P. knackmussii* (Stolz *et al.*, 2007), *B. subtilis* (Parthipan *et al.*, 2017), *B. atrophaeus* (Zhang *et al.*, 2016), *B. aerius* (Mansur *et al.*, 2014) y *S. acidaminiphila* (Mangwani *et al.*, 2014).

Así mismo, para algunas de las especies identificadas como *A. aquatica* (Ilori *et al.*, 2005; Beaz *et al.*, 2015), *A. brisouii* (Rangasamy *et al.*, 2010), *A. schindleri* (Nemec *et al.*, 2001), *A. tandoii* (Carr *et al.*, 2003), *B. paralicheniformis* (Dunlap *et al.*, 2015), *P. panipatensis* (Gupta *et al.*, 2008), *P. prosekii* (Kosina *et al.*, 2013), *L. huabeiensis*

(Wu *et al.*, 2013), *D. polyhydroxybutyrativorans* (Qiu *et al.*, 2015), *B. vestrisii* (Bernard *et al.*, 2003) y *L. panacisoli* (Choi *et al.*, 2014), no se han realizado estudios sobre su capacidad para degradar el petróleo crudo como fuente de carbono.

Para el caso de *L. panacisoli* (Choi *et al.*, 2014) creció en los medios minerales enriquecidos con petróleo incubados en condiciones de anaerobiosis. Sin embargo, esta especie ha sido descrita en estudios recientes, aislada de igual forma de suelo contaminado con hidrocarburos, pero aún no se ha probado su capacidad de degradación ya sea en condiciones aerobias o anaerobias.

Para las especies como *P. alcaligenes* y *P. hibiscicola* que crecieron tanto en presencia y ausencia de oxígeno, según lo establecido por Silva *et al.*, (2006), el género *Pseudomonas* tiene una amplia versatilidad metabólica, la cual está asociada a plásmidos, siendo esto, una de las razones por las cuales es de los géneros de bacterias más utilizados con fines de remediación. Por otro lado, el género *Acinetobacter* cumple un rol importante en los procesos de degradación de hidrocarburos, por su presencia ubicua (Priyangshu *et al.*, 2004).

Merece una atención especial la identificación de la capacidad metabólica para usar petróleo crudo como fuente de carbono y energía que poseen especies bacterianas descritas recientemente, ya que en el futuro se puede explotar su capacidad para degradar dicho contaminante. Finalmente, la diversidad de bacterias hidrocarbonoclastas identificada podría ser el resultado del ensamblaje de gremios bacterianos funcionalmente diferentes (Sheppard *et al.*, 2012).

## **8 Conclusiones y perspectivas**

Los resultados presentados demuestran que existen varios grupos de microorganismos capaces de tolerar y resistir condiciones de estrés ante la contaminación por HTP, ya que fue posible aislar 76 cepas que usan petróleo crudo como fuente de carbono y energía.

Además se encontró mayor diversidad de bacterias hidrocarbonoclastas en Tabasco. Diversidad de especies de los géneros *Pseudomonas* y *Acinetobacter* fueron mejor representados, esto proporciona un aporte para entender la dinámica poblacional bacteriana con las condiciones ambientales y el rol que juega la adaptabilidad al poseer una gran versatilidad del metabolismo por parte de los microorganismos.

En diversos trabajos realizados en sitios contaminados con hidrocarburos, se han aislado especies pertenecientes al género *Pseudomonas*, en el presente estudio, dicho género se encontró en ambos sitios: Ranchería Hueso de Puerco y Estero del Pantano, por lo que sigue siendo una de las mejores opciones con fines de biorremediación.

Es necesaria la evaluación de las poblaciones microbianas presentes en los suelos contaminados para su posible uso como estrategias de remediación, debido a que la capacidad para degradar petróleo de algunas de las especies y/o géneros identificados en este estudio no ha sido reportada, tal es el caso de *Lysobacter* y *Bosea*.

Así mismo, los suelos presentan variabilidad temporal, dado que este estudio se llevó a cabo en época de lluvia posiblemente presentará condiciones diferentes en otra estacionalidad, por ello es importante tomar en cuenta todos los factores que pueden influenciar la diversidad encontrada, por tanto, se consideran como perspectivas; realizar análisis de suelos para evaluar la capacidad de las cepas para crecer en condiciones ambientales específicas, ya que esto permite desarrollar mejores estrategias de remediación, de igual forma, probar las tasas de degradación para las especies recién descritas e incluir análisis de genes involucrados en la degradación de hidrocarburos de especies previamente reportadas. Esto aportará



información necesaria para conocer la biología de los grupos encontrados en sitios contaminados con petróleo crudo.

## 9 Referencias

- Acosta-Rodríguez, I., Moctezuma-Zárate, M. G., Tovar-Oviedo, J., y Cárdenas-González, J. F. (2011). *Aislamiento e Identificación de Bacterias y Levaduras resistentes a petróleo*. Obtenido de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/infotec/v22n6/art11.pdf>
- Adams, R., Zavala-Cruz, J., y Morales-García, F. A. (2008). Concentración residual de hidrocarburos en suelo del trópico. II: afectación a la fertilidad y su recuperación. *Asociación Interciencia*, 483-489.
- Allan, S. E., Smith, B. W. and Anderson, K. A. (2012). Impact of the Deepwater Horizon Oil Spill on bioavailable polycyclic aromatic hydrocarbons in Gulf of Mexico coastal waters. *Environmental Science & Technology*, 2033-2039.
- Amaya, H. F. (2011). *Remediación de suelos*. Obtenido de <http://www.tesoem.edu.mx/alumnos/cuadernillos/2011.038.pdf>
- Anzai, Y., Kim, H., Park, J., Wakabayashi, H., and Oyaizu, H. (2000). Phylogenetic affiliation of the *Pseudomonas* based on 16S rRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1563-1589.
- Arias, F. A. (2006). *Química Orgánica*. Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia.
- Arrieta, R. O. M., Rivera, R. A. P., Arias, M. L., Alberto, R.B., Ruiz, O. and Cardona, G. S. A. (2012). Bioremediation of soil with diesel. Through the use of autochthonous microorganisms. *Gestión y Ambiente*, 27-40.
- Atlas, R. M. and Hazen, T. C. (2011, Junio). Oil biodegradation and bioremediation: a tale of the two worst spills in U.S. history. *Environmental Science and Technology*, 6709–6715.
- Balkwill, D. L. and Ghiorse, W. C. (1985). Characterization of subsurface bacteria associated with two shallow aquifers in Oklahoma. *Applied and Environmental Microbiology*, 580-588.
- Barron, M. G. (2012). Ecological impacts of the Deepwater Horizon Oil Spill: Implications for immunotoxicity. *Toxicologic Pathology*, 315-320.
- Beaz-Hidalgo, R., Latif-Eugenín, F., Hossain, M. J., Berg, K., Niemi R., M., Rapala, J., and Lile M., R. (2015). *Aeromonas aquatica* sp. nov., *Aeromonas finlandiensis* sp. nov. and *Aeromonas lacus* sp. nov. isolated from Finnish waters associated with cyanobacterial. *Systematic and Applied Microbiology*, 161-168.
- Benson, H. J. (2002). *Microbiological Applications. Laboratory Manual in General Microbiology*. México: Mc Graw-Hill.
- Bernad, I. O., García, J. S., Valiño, M. D., y Fernández, S. V. (2007). *Técnicas de recuperación de suelos contaminados*. Obtenido de

[https://www.madrimasd.org/informacionidi/biblioteca/publicacion/doc/vt/vt6\\_tecnicas\\_recuperacion\\_suelos\\_contaminados.pdf](https://www.madrimasd.org/informacionidi/biblioteca/publicacion/doc/vt/vt6_tecnicas_recuperacion_suelos_contaminados.pdf)

- Bernard, L. S., Mallet, M. N., Grimont, P. A., and Raoult, D. (2003). *Bosea eneeae* sp. nov., *Bosea massiliensis* sp. nov. and *Bosea vestrisii* sp. nov., isolated from hospital water supplies, and emendation of the genus *Bosea* (Das et al. 1996). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 15-20.
- Bladimir, C., Victor, I., y Alvaro, G. (2016). Recuperación mejorada de petróleo mediante biotecnología en el Campo BEV. *Revista Politécnica*, 1-10.
- Boone, D. R., Castenholz, R. W., Garrity, G. M., Staley, J. T., Brenner, D. J., Goodfellow, M., Schleifer, K. H. (2001). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Nueva York: Springer Science+Business Media o Springer.
- Boopathy, R. (2000). Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, 63-67.
- Bragg, J. R., Prince, R. C., Harner, E. J. and Atlas R. M. (1994). Effectiveness of bioremediation for Exxon-Valdez oil spill. *Nature*, 413-418.
- Canals, M. V. (2005). *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica*. Obtenido de [http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2396/TESIS\\_MVINAS\\_CANALS.pdf](http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2396/TESIS_MVINAS_CANALS.pdf)
- Carr, L. E., Kämpfer, P., Patel C., B. K., Gürtler, V., and Seviour J., R. (2003). Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 953-963.
- Cavallini, E. R., Coronado, M. G., Hidalgo, J. D., y Chavarría, F. H. (2005). *Bacteriología general: principios y prácticas de laboratorio*. Costa Rica: Universidad de Costa Rica.
- Cavazos-Arroyo, J., Pérez-Armendáriz, B., y Mauricio-Gutiérrez, A. (2014). Afectaciones y consecuencias de los derrames de hidrocarburos en suelos agrícolas de acatzingo, Puebla, México. *Agricultura, sociedad y desarrollo*, 539-550.
- CENAPRED. (2018). *Glosario*. Obtenido de [http://www.cenapred.unam.mx/es/Glosario/Glosario\\_M.php](http://www.cenapred.unam.mx/es/Glosario/Glosario_M.php)
- Chaudhary, D. K., and Kim, J. (2017). *Flavobacterium naphthae* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 305-309.
- Chikere, C. B., Okpokwasili, G. C., and Chikere, B. O. (2011). Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil. *3 Biotech*, 117–138.

- Choi, J.-H., Seok, J.-H., Cha, J.-H., and Cha, C.-J. (2014). *Lysobacter panacisoli* sp. nov., isolated from ginseng soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2193–2197.
- Córdova, S. C. (2016). Pemex oculta derrame de crudo en Veracruz. *La Jornada*, pág. 26.
- Cortón, E., y Viale, A. (2006). Solucionando grandes problemas ambientales con la ayuda de pequeños amigos: las técnicas de biorremediación. *Ecosistemas. Revista científica y técnica de ecología y medio ambiente*, 1-10.
- Dadrasnia, A., and Agamuthu, P. (2013). Dynamics of diesel fuel degradation in contaminated soil using organic wastes. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 769–778.
- Dahal, R. H., Chaudhary, D. K., and Kim, J. (2017). *Acinetobacter halotolerans* sp. nov., a novel halotolerant, alkalitolerant, and hydrocarbon degrading bacterium, isolated from soil. *Archives of Microbiology*, 701-710.
- del Carmen Rivera, M., Ferrera, R., Haller, V., Vázquez, R., y Linares, L. F. (2002). Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo. *Terra*, 423-434.
- Diario Oficial de la Federación. (2013). Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación. México: Diario Oficial.
- Diario Oficial de la Federación. (2014). Norma Mexicana NMX-AA-105-SCFI-2014 Suelos-Hidrocarburos Fracción Ligera (FL) por cromatografía de gases con detectores de ionización de flama o espectrometría de masas. Mexico: Diario Oficial.
- Díaz, A. S., Flores-Rentería, L., Cortez, J. A., y Sierra-Palacios, E. d. (2014). PCR. reacción en cadena de la polimerasa. Obtenido de [https://www.researchgate.net/figure/Figura-3-Etapas-de-la-PCR-temperaturas-tiempos-y-ciclos-estandares\\_fig3\\_266856169](https://www.researchgate.net/figure/Figura-3-Etapas-de-la-PCR-temperaturas-tiempos-y-ciclos-estandares_fig3_266856169)
- Dunlap A., C., Kwon, S.-W., Rooney P., A., and Kim, S. (2015). *Bacillus paralicheniformis* sp. nov., isolated from fermented soybean paste. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 3487-3492.
- Ehrlich, H. L. (1999). ZoBell and his contributions to the geosciences. En M. B. G. Colin Bell, *Microbial Biosystems: New Frontiers*. Canada: Bell CR, Brylinsky M, Johnson-Green P.
- Enciso, A. (2004). SEMARNAT: aumentó la descarga de contaminantes de Pemex. Obtenido de <http://www.jornada.unam.mx/2004/12/31/008n2pol.php>

- ESRI. (2016). ArcMap 10.5. *Environmental Systems Research Institute. Redlands, California.*
- Fatajeva, E., Gailiūtė, I., Paliulis, D., and Grigiškis, S. (2014). The use of *Acinetobacter* ssp. for oil hydrocarbon degradation in saline waters. *Biologija*, 126-133.
- Ferrera-Cerrato, R., Rojas-Avelizapa, N. G., Poggi-Varaldo, H. M., Alarcón, A., y Cañizares-Villanueva, R. O. (2006). Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y los compuestos orgánicos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 179-187.
- Forbes, B. A., Sahm, D., Weissfeld, A., y Trevino, E. (2007). *Diagnostico Microbiologico*. México: Panamericana.
- Fuentes, S., Médez, V., Aguila, P. and Seeger, M. (2014). Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 4781-4794.
- Gobernado, M., y López-Hontangas, J. (2003). Identificación bacteriana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 54-60.
- Gupta, S., Kumari, R., Prakash, O., and Lal, R. (2008). *Pseudomonas panipatensis* sp. nov., isolated from an oil-contaminated site. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1339-1345.
- Hanafy, A. A.-E., Anwar, Y., Mohamed, S. A., Al-Garni, S. M., Sabir, J. S., Abdullah, O., and Ahmed, M. M. (2016). Isolation and identification of bacterial consortia responsible for degrading oil spills from the coastal area of Yanbu, Saudi Arabia. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 69-74.
- Head, I. M, Jones, D. M. and Roling, W. F. M. (2006). Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Review of Microbiology*, 173-182.
- Hemalatha, S., and Veeramanikandan, P. (2011). Characterization of Aromatic Hydrocarbon Degrading Bacteria from Petroleum Contaminated Sites. *Journal of Environmental Protection*, 243-254.
- Hernández-Acosta, E., Ferrera-Cerrato, R., Gutiérrez-Castorena, M. D., Rodríguez-Vázquez, R., Rubiños-Panta, J. E., y Fernández-Linares, L. (2003). Bacterias y hongos hidrocarbonoclastas de rizósfera frijol y maíz, en un suelo contaminado con petróleo. *Terra Latinoamericana*, vol. 21, núm. 4, 493-502.
- Hickey, A. M., Gordon, L., Dobson, A. D., Kelly, C., and Doyle, E. (2007). Effect of surfactants on fluoranthene degradation by *Pseudomonas alcaligenes* PA-10. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74.

- Ilori, M., Amobi, C. J., and C., O. A. (2005). Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment. *Chemosphere*, 61(7), 985-992.
- Instituto Mexicano del Petróleo (IMP), (2014). *El petróleo. Composición*. Obtenido de <http://www.imp.mx/petroleo/?imp=comp>
- Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC), (2007). *Tecnologías de remediación*. Obtenido de <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/372/tecnolog.html>
- Jangid, K., Williams, M. A., Franzluebbers, A. J., Sanderlin, J. S., Reeves, J. H., Jenkins, M. B., and Whitman, W. B. (2008). Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems. *Soil Biology & Biochemistry*, 2843–2853.
- Jaramillo, G. E., Paba, G. M., y Ospino, M. C. (2011). Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en hábitats de ecosistemas costeros en la Bahía de Cartagena, Colombia. *NOVA Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 76 - 86.
- Jiménez, I., García, M. A., Díaz, M. M., Serrano, J. B., Calderon, N. G., y Paredes, J. G. (2006). *El suelo: Fundamentos sobre su formación, los cambios globales y su manejo*. México: INCA.
- Jobson, A., Cook, F. D., and Westlake, D. W. (1972). Microbial Utilization of Crude Oil. *Applied Microbiology*. Vol. 23, No. 6, 1082-1089.
- Kim, T. J., Lee, E. Y., Kim, Y. J., Cho, K. S., and Ryu, H. W. (2003). Degradation of polyaromatic hydrocarbons by *Burkholderia cepacia* 2A-12. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 411–417.
- Kishore, D., and Ashis, K. M. (2007). Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology*, 1339-1345.
- Kosina, M., Barták, M., Mašlaňová, I., Vávrová Pascutti, A., Šedo, O., Lexa, M., and Sedláček, I. (2013). *Pseudomonas prosekii* sp. nov., a novel psychrotrophic bacterium from Antarctica. *Current Microbiology*, 637–646. .
- Lappin-Scott, H. M. (1999). Claude E. Zobell; his life and contributions to biofilm. En M. B. G. Colin Bell, *Microbial biosystems: new frontiers*. Canada: Bell CR, Brylinsky M, Johnson-Green P (ed).
- Lara-Severino, R. d., Camacho-López, M. A., Casanova-González, E., Gómez-Oliván, L. M., Sandoval-Trujillo, Á. H., Isaac-Olivé, K., and Ramírez-Durán, N. (2016). *Haloalkalitolerant Actinobacteria* with capacity for anthracene degradation isolated

from soils close to areas with oil activity in the State of Veracruz, Mexico. *International Microbiology*, 15-26.

Leahy, J., and Cowell, R. (1990). Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Biodegradation of Hydrocarbons in the environment*, 305-315.

Ley General Para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos. (2018). *Diario Oficial de la Federación*. Obtenido de [http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/263\\_190118.pdf](http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/263_190118.pdf)

Lin, Q. X. and Mendelsson, I. A. (2012) Impacts and recovery of the deepwater Horizon Oil Spill on vegetation structure and function of coastal salt marshes in northern Gulf of Mexico. *Environmental Science & Technology*, 3737-3743.

Linares, L. C., Avelizapa, N. G., Carrillo, T. G., Islas, M. E., Martínez, H. G., Hernández, R. U., y Ortega, J. M. (2006). *Manual de técnicas de análisis de suelos*. México, D.F.: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Mexicano del Petróleo, Instituto Nacional de Ecología.

López, R. A. (2015). 500 mil habitantes de Tabasco, sin agua tras derrame de combustible. *La Jornada*, pág. 29.

Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., y Clark, D. (2009). *Brock. Biología de los microorganismos*. México: Pearson Educación.

Mangwani, N., Shukla, S. K., Kumari, S., Rao, T. S., and Das, S. (2014). Characterization of *Stenotrophomonas acidaminiphila* NCW-702 biofilm for implication in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Applied Microbiology*, 1012-1024.

Mansur, A. A., Adetutu, E. M., Kadali, K. K., Morrison, P. D., Nurulita, Y., and Ball, A. S. (2014). Assessing the hydrocarbon degrading potential of indigenous bacteria isolated from crude oil tank bottom sludge and hydrocarbon-contaminated soil of Azzawiya oil refinery, Libya. *Environmental Science and Pollution Research*, 10725–10735.

Martín, Y. B.-S., Acosta, S., Sánchez, A., Toledo, A., González, F., y García, R. M. (2012). Estudio y selección de bacterias aerobias degradadoras de hidrocarburos del petróleo aisladas de costas de Cuba. *Biotecnología Aplicada*, 73-79.

Martínez-Hernández, S., Vázquez-Rodríguez, G. A., Beltrán-Hernández, R. I., Prieto-García, F., Miranda-López, J. M., Franco-Abuín, C. M., Coronel-Olivares, C. (2013). Resistance and Inactivation Kinetics of Bacterial Strains Isolated from the Non-Chlorinated and Chlorinated Effluents of a WWTP. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 3363-3383.

- Mesa, J. B., Quintero, G., Vizcaíno, A. L., Cáceres, D. C., Riaño, S. M., y García, J. M. (2006). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *NOVA Publicación Científica*, 82-90.
- Moreno, C. M., Becerra, A. G., y Santos, M. J. (2004). Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. *Revista Iberoamericana de Micología*, 103-120.
- Nemec, A., De Bare, T., Tjernberg, I., Vaneechoutte, M., van der Reijden, T., and Dijkshoorn, L. (2001). *Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1891-1899.
- Olmedo, F. (2010). *Derrame de Petróleo. Catástrofe ecológica. Efecto sobre los seres vivos y el ecosistema*. Obtenido de <http://www.biodisol.com/contaminacion-ambiental/derrame-de-petroleo-catastrofe-ecologica-efecto-sobre-los-seres-vivos-y-el-ecosistema-medio-ambiente-contaminacion-ambiental/>
- Olmos, A. F., Fuente, C. G., Nieto, J. A., y Ramos, S. V. (2010). *Clínica, Procedimientos en Microbiología*. Obtenido de Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>
- Ortiz, M. O. (2016). *La explotación petrolera en Tabasco inició en el Campo Sarlat, 1900-1923*. Obtenido de <http://www.reibci.org/publicados/2016/nov/1900108.pdf>
- Pandey, K. K., Mayilraj, S., and Chakrabarti, T. (2002). *Pseudomonas indica* sp. nov., a novel butane-utilizing species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1559-1567.
- Parthipan, P., Preetham, E., Machuca, L., and Rahman, P. M. (2017). Biosurfactant and degradative enzymes mediated crude oil degradation by bacterium *Bacillus subtilis* A1. *Frontiers in Microbiology*, 193.
- PEMEX. (2016). *Informe de sustentabilidad 2016*. Obtenido de [http://www.pemex.com/etica-e-integridad/sustentable/informes/Documents/inf\\_sustentabilidad\\_2016\\_esp\\_verificacion.pdf](http://www.pemex.com/etica-e-integridad/sustentable/informes/Documents/inf_sustentabilidad_2016_esp_verificacion.pdf)
- Pérez Silva, R. M., Camacho Pozo, M. I., Gómez Montes de Oca, J. M., Ábalos Rodríguez, A., Viñas, M., y Cantero Moreno, D. (2008). Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, vol. 39, núm. 1., 44-51.
- Pérez, R. G., y Peris, M. D. (2003). *Microbiología*. España: Thomson paraninfo.



- Pesina, G. R. (2014). *Cepario Nacional de Salud Animal*. Obtenido de <http://bmeditores.mx/cepario-nacional-de-salud-animal/>
- Piyali, M., and Pranab, R. (2012). Identification and characterisation of a bacterial isolate capable of growth on trichloroethylene as the sole carbon source. *Advances in Microbiology*, 284-294.
- Priyanshu, S., Dhruva, M. B., Krishnan, S., and Banwari, L. (2004). Assessment of intra-species diversity among strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from sites contaminated with petroleum hydrocarbons. *Can. J. Microbio*, 405–414.
- Qiu, T., Zuo, Z., Gao, J., Gao, M., Han, M., Sun, L., and Wang, X. (2015). *Diaphorobacter polyhydroxybutyrativorans* sp. nov., a novel poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)-degrading bacterium isolated from biofilms. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2913–2918.
- Quijano, J. G. (2015). *Evaluación de la degradación de hidrocarburos totales del petróleo por bioestimulación con abonos orgánicos asociados a especies arbóreas (Tesis de maestría)*. Villa Hermosa, Tabasco: Colegio de la Frontera Sur.
- Ramírez, O. M., Rivera, A. P., Marin, L. A., Rojano, B. A., Ruiz, O., y Gallo, S. A. (2012). Biorremediación de un suelo con diésel Mediante el uso de microorganismos autóctonos. *Gestión y Ambiente, Volumen 15, Número 1*, 27-40.
- Ramírez-Gama, R. M., Hernández, M. D., Cruz, A. C., Reyes, G. T., y Esquivel-Cote, R. (2015). *Técnicas básicas de microbiología y su fundamento*. México: Trillas.
- Ramírez-Gama, R. M., Millán, B. L., Chávez, A. M., Madrazo, O. V., Reyes, G. T., García, L. V., y Muggenburg, I. (1998). *Manual de Prácticas de Microbiología General*. México: UNAM.
- Rangasamy, A., Hang-Yeon, W., Soo-Jin, K., Yi-Seul, K., Byung-Yong, K., and Soon-Wo, K. (2010). *Acinetobacter brisouii* sp. nov., Isolated from a Wetland in Korea. *The Journal of Microbiology*, 36-39.
- Rich, J., Heichen, R., Bottomley, P., Cromack, K., and Myrold, D. (2003). Community composition and functioning of denitrifying bacteria from adjacent meadow and forest soils. Applied and Environmental Microbiology. *Applied and Environmental Microbiology*, 597-598.
- Richarda, J., and Vogel, T. (1999). Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 93-100.
- Rivera-Cruz, M., Ferrera-Cerrato, R., Volke-Haller, V., Rodríguez-Vázquez, R., y Fernández-Linares, L. (2002). Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo. *Terra*, 423-434.

- Sagardoy, M., y Mandolesi, M. (2004). *Biología del suelo*. Argentina: Editorial de la Universidad Nacional del Sur.
- Segura, B. E., Mogollón, A. H., Zapata, A. O., Peña, E. G., Moran, P. P., y Madrid, J. O. (2016). Eficiencia de cepas bacterianas aisladas del manglar para biorremediar suelos contaminados con petróleo. *Revista Química Viva*, 20-30.
- SEMARNAT. (2010a). *Guía para orientar en la ejecución de la comunicación de los riesgos en sitios contaminados prioritarios o de alto riesgo*. México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- SEMARNAT. (2010b). *Programa Nacional de Remediación de Sitios Contaminados*. Obtenido de <http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/Libros2011/CD000953.pdf>
- SEMARNAT. (2015). *Dirección General de Gestión Integral de Materiales y Actividades Riesgosas*. Obtenido de <http://apps1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe15/tema/cap7.html#tema5>
- Sepúlveda, T. V., y Velasco, J. A. (2002). *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. México: INE-SEMARNAT.
- Servicio Geológico Mexicano. (2017). *Características del petróleo*. Obtenido de [http://www.sgm.gob.mx/Web/MuseoVirtual/Aplicaciones\\_geologicas/Caracteristicas-del-petroleo.html](http://www.sgm.gob.mx/Web/MuseoVirtual/Aplicaciones_geologicas/Caracteristicas-del-petroleo.html)
- Sheppard, P. J., Simons, K. L., Kadali, K. K., Patil, S. S., and Ball, A. S. (2012). The Importance of Weathered Crude Oil as a Source of Hydrocarbonoclastic Microorganisms in Contaminated Seawater. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1185–1192.
- Sikkema, J., Bont, J., and Poolman, B. (1995). Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, 201–222.
- Silva, R. M., Rodríguez, A. Á., Oca, J. M., and Moreno, D. C. (2006). Degradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* AT18 strain. *Tecnología Química*, 70-77.
- Solanas, A. M. (2009). La biodegradación de hidrocarburos y su aplicación en la biorremediación de suelos. *Estudios en la Zona no Saturada del Suelo. Vol IX*, 1-8.
- Spain, J., and Veld, P. V. (1984). Adaptation of Natural Microbial Communities to Degradation of Xenobiotic Compounds: Effects of Concentration, Exposure Time, Inoculum, and Chemical Structure. *Applied and environmental microbiology*, 428-435.
- Stamenov, D., Duric, S., and Jafari, T. H. (2015). Biorremediation potencial of five strains of *Pseudomonas* sp. *Journal of Nature and Science (JNSCI)* , 41-46.

- Stolz, A., Bussen, H. J., and Kämpfer, P. (2007). *Pseudomonas knackmussii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 572-576.
- Sutton, N. B., Maphosa, F., Morillo, J. A., Al-Soud, W. A., Langenhoff, A. A., Grotenhuis, T., and Smidt, H. (2012). Impact of Long-Term Diesel Contamination on Soil Microbial Community Structure. *Applied and Environmental Microbiology*, 619–630.
- Tanase, A. M., Ionescu, R., Chiciudean, I., Vassu, T., and Stoica, I. (2013). Characterization of hydrocarbon-degrading bacterial strains isolated from oil-polluted soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 150-154.
- Tekorienè, R. (2008). Distribution of the genus *Pseudomonas* bacteria in oil-polluted soil, water, polymeric materials, plant remnants and food products. *EKologija*, 143–148.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., y Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología*. México: Panamericana.
- Tortosa, G. (2016). *Aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno presentes en el compost*. Obtenido de <http://www.compostandociencia.com/2016/01/aislamiento-de-bacterias-fijadoras-de-nitrogeno/>
- Wauquier, J. P. (2004). *El refino del petróleo: petróleo crudo, productos petrolíferos, esquemas de fabricación*. Madrid: Díaz de Santos .
- Wilkinson, S., Nicklin, S., and Faull, J. L. (2002). Biodegradation of fuel oils and lubricants: Soil and water bioremediation options. *Elsevier Science. Biotransformations: Bioremediation Technology for Health and Environmental Protection*.
- Wolicka, D., and Borkowski, A. (2012). *Microorganisms and Crude Oil*. Obtenido de [http://cdn.intechopen.com/pdfs/37040/InTech-Microorganisms\\_and\\_crude\\_oil.pdf](http://cdn.intechopen.com/pdfs/37040/InTech-Microorganisms_and_crude_oil.pdf)
- Wu, G., Liu, Y., Li, Q., Du, H., You, J., Li, H., and Zhao, T. (2013). *Luteimonas huabeiensis* sp. nov., isolated from stratum water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 3352-3357.
- Zajic, E., and Supplisson, B. (1972). Emulsification and Degradation of “Bunker C” Fuel Oil by Microorganisms. *Biotechnology And Bioengineering*, 331-343.
- Zeinali, M., Vossoughi, M., Ardestani, S. K., Babanezhad, E., and Masoumian, M. (2007). Hydrocarbon degradation by thermophilic *Nocardia otitidiscaviarum* strain TSH1: physiological aspects. *Journal of Basic Microbiology*, 534–539 .
- Zhang, J., Xue, Q., Gao, H., Lai, H., and Wang, P. (2016). Bacterial degradation of crude oil using solid formulations of *Bacillus* strains isolated from oil-contaminated soil towards microbial enhanced oil recovery application. *RSC Advances*, 5566-5574.
- Zhi-Juan, N., Bao-Jian, H., Shu, C., Xiang-Ting, X., Jian, H., and Shun-Peng, L. (2011). Degradation of Cyhalofop-butyl (CyB) by *Pseudomonas azotoformans* strain QDZ-1

and cloning of a novel gene encoding CyB-Hydrolyzing esterase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 6040-6046.

Zhoua, L., Li, H., Zhang, Y., Hana, S., and Xu, H. (2016). *Sphingomonas* from petroleum-contaminated soils in Shenfu, China and their PAHs degradation abilities. *Brazilian Journal of Microbiology*, 271–278.

**10 Anexos. Composición química de agares y disoluciones, protocolo de extracción**

<p style="text-align: center;"><b>1. <u>Medio mineral número 1</u></b></p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 60%;">MgSO<sub>4</sub></td><td style="text-align: right;">0.2 g</td></tr> <tr><td>CaCl<sub>2</sub></td><td style="text-align: right;">0.02 g</td></tr> <tr><td>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></td><td style="text-align: right;">1.0 g</td></tr> <tr><td>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></td><td style="text-align: right;">1.0 g</td></tr> <tr><td>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></td><td style="text-align: right;">1.0 g</td></tr> <tr><td>FeCl<sub>3</sub></td><td style="text-align: right;">1.0 g</td></tr> <tr><td>Agar-Agar</td><td style="text-align: right;">14 g</td></tr> </table> <p>Elaboración: pesar todos los reactivos y disolver en un litro de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.</p>	MgSO <sub>4</sub>	0.2 g	CaCl <sub>2</sub>	0.02 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0 g	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.0 g	FeCl <sub>3</sub>	1.0 g	Agar-Agar	14 g	<p style="text-align: center;"><b>2. <u>Medio mineral número 2</u></b></p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 60%;">KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></td><td style="text-align: right;">0.4 g</td></tr> <tr><td>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></td><td style="text-align: right;">1.6 g</td></tr> <tr><td>CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</td><td style="text-align: right;">0.05 g</td></tr> <tr><td>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</td><td style="text-align: right;">0.02 g</td></tr> <tr><td>NaSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</td><td style="text-align: right;">2.0 g</td></tr> <tr><td>NH<sub>4</sub>Cl</td><td style="text-align: right;">1.0 g</td></tr> <tr><td>Agar-Agar</td><td style="text-align: right;">14 g</td></tr> </table> <p>Elaboración: pesar todos los reactivos y disolver en un litro de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.</p>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.4 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.6 g	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.05 g	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.02 g	NaSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2.0 g	NH <sub>4</sub> Cl	1.0 g	Agar-Agar	14 g
MgSO <sub>4</sub>	0.2 g																												
CaCl <sub>2</sub>	0.02 g																												
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0 g																												
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0 g																												
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.0 g																												
FeCl <sub>3</sub>	1.0 g																												
Agar-Agar	14 g																												
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.4 g																												
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.6 g																												
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.05 g																												
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.02 g																												
NaSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2.0 g																												
NH <sub>4</sub> Cl	1.0 g																												
Agar-Agar	14 g																												
<p style="text-align: center;"><b>3. <u>Medio mineral número 3</u></b></p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 60%;">KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></td><td style="text-align: right;">0.4 g</td></tr> <tr><td>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></td><td style="text-align: right;">1.6 g</td></tr> <tr><td>NH<sub>4</sub>Cl</td><td style="text-align: right;">1.5 g</td></tr> <tr><td>MgCl<sub>2</sub> .6H<sub>2</sub>O</td><td style="text-align: right;">0.2 g</td></tr> <tr><td>NaSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</td><td style="text-align: right;">1.5 g</td></tr> <tr><td>CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</td><td style="text-align: right;">0.45 g</td></tr> <tr><td>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</td><td style="text-align: right;">0.2 g</td></tr> <tr><td>FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O</td><td style="text-align: right;">0.02 g</td></tr> <tr><td>EDTA</td><td style="text-align: right;">0.05 mL/L</td></tr> <tr><td>Agar-Agar</td><td style="text-align: right;">14 g</td></tr> </table> <p>Elaboración: pesar todos los reactivos y disolver en un litro de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.</p>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.4 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.6 g	NH <sub>4</sub> Cl	1.5 g	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.2 g	NaSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1.5 g	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.45 g	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2 g	FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0.02 g	EDTA	0.05 mL/L	Agar-Agar	14 g	<p style="text-align: center;"><b>4. <u>Caldo Nutritivo</u></b></p> <p style="text-align: center;">MCD LAB</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 60%;">Peptona de gelatina</td><td style="text-align: right;">4.0 g</td></tr> <tr><td>Extracto de carne</td><td style="text-align: right;">3.0 g</td></tr> <tr><td>Extracto de levadura</td><td style="text-align: right;">5.0 g</td></tr> <tr><td>Agar bacteriológico</td><td style="text-align: right;">15.0 g</td></tr> </table> <p>pH final 6.8</p> <p>Modo de preparación: disolver 23 g del medio en un litro de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.</p>	Peptona de gelatina	4.0 g	Extracto de carne	3.0 g	Extracto de levadura	5.0 g	Agar bacteriológico	15.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.4 g																												
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.6 g																												
NH <sub>4</sub> Cl	1.5 g																												
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.2 g																												
NaSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1.5 g																												
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.45 g																												
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2 g																												
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0.02 g																												
EDTA	0.05 mL/L																												
Agar-Agar	14 g																												
Peptona de gelatina	4.0 g																												
Extracto de carne	3.0 g																												
Extracto de levadura	5.0 g																												
Agar bacteriológico	15.0 g																												



8) Precipitar en volumen igual de isopropanol, centrifugar durante 10 minutos a máxima velocidad.	
9) Eliminar el isopropanol.	
10) Agregar 500 $\mu$ L de etanol al 70%, reposar durante 1 minuto y centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto.	
11) Eliminar el etanol, secar el pellet y resuspender en 30 $\mu$ L de agua ultra pura.	
12. <u>Buffer 1.</u>	13. <u>Buffer 2.</u>
100 mM Tris	CTAB 10%
20 mM EDTA	NaCl 0.7 M
RNAse 200 mg/L	
1% SDS	

**Tabla V.** Continuación. Número total de Unidades Formadoras de Colonias que crecieron de las diluciones decimales seriadas en agar adicionado con petróleo, incubadas a 37 °C durante 48 h, en condiciones aerobias y anaerobias.

SITIO 1. RANCHERÍA HUESO DE PUERCO				
PUNTO DE MUESTREO	DILUCIÓN	UFC	# TOTAL UFC (FACTOR DE DILUCIÓN)	# TOTAL DE UFC.g <sup>-1</sup>
1	Sin crecimiento			
2	-3 A	4	4000	4X10 <sup>3</sup>
3	-3 A	31	31000	31X10 <sup>3</sup>
4	-3 A	36	36000	36 X10 <sup>3</sup>
	-3 B	62	62000	62 X10 <sup>3</sup>
	-4 A	7	70000	7 X10 <sup>4</sup>
	-4 B	8	80000	8 X10 <sup>4</sup>
5	-4 C	16	160000	16X10 <sup>4</sup>
	-3 A	1	1000	1 X10 <sup>3</sup>
	-4 A	4	40000	4 X10 <sup>3</sup>
6	-4 B	3	3000	4 X10 <sup>3</sup>
	-3 A	448	448000	448 X10 <sup>3</sup>
	-3 B	436	436000	436 X10 <sup>3</sup>

	-3 C	92	92000	92 X10 <sup>3</sup>
	-4 A	15	150000	15 X10 <sup>4</sup>
	-6	2	2000000	2 X10 <sup>6</sup>
7	-3 A	12	12000	12 X10 <sup>3</sup>
	-3 B	10	10000	10 X10 <sup>3</sup>
	-3 C	1	1000	1 X10 <sup>3</sup>
8	-3 A	1	1000	1 X10 <sup>3</sup>
	-4 A	1	10000	1 X10 <sup>4</sup>
9	-3 A	4	4000	4 X10 <sup>3</sup>
<b>ANAEROBIAS</b>				
1	-3 A	16	16000	16 X10 <sup>3</sup>
	-4 A	8	80000	8 X10 <sup>4</sup>
2	Sin crecimiento			
3	-3 A	5	5000	X10 <sup>3</sup>
4	Sin crecimiento			
5	-3 A	46	46000	46 X10 <sup>3</sup>
6	-3 A	65	65000	65 X10 <sup>3</sup>
7	-3 A	54	54000	54 X10 <sup>3</sup>
8	-3 A	30	30000	30 X10 <sup>3</sup>
9	-3 A	34	34000	34 X10 <sup>3</sup>

<b>SITIO 2. ESTERO DEL PANTANO</b>				
<b>PUNTO DE MUESTREO</b>	<b>DILUCIÓN</b>	<b>UFC</b>	<b># TOTAL UFC (FACTOR DE DILUCIÓN)</b>	<b># TOTAL DE UFC.g<sup>-1</sup></b>
1	Sin crecimiento			
2	-3 A	1	1000	1 X10 <sup>3</sup>
3	-4 C	1	10000	1 X10 <sup>4</sup>
4	Sin crecimiento			
5	-3 A	4	4000	4 X10 <sup>3</sup>
6	Sin crecimiento			



7	-3 A	10	10000	10 X10 <sup>3</sup>
	-3 B	18	18000	18 X10 <sup>3</sup>
	-3 C	5	5000	5 X10 <sup>3</sup>
	-6 A	1	1000000	1 X10 <sup>6</sup>
8	-5 A	1	100000	1 X10 <sup>5</sup>
<b>ANAEROBIAS</b>				
1	Sin crecimiento			
2	-3 A	1	1000	1 X10 <sup>3</sup>
9	-3 A	3	3000	3 X10 <sup>3</sup>

**Tabla IX.** Pruebas bioquímicas esperadas para los géneros identificados en el presente trabajo. Información tomada de Boone *et al.*, (2001).

<b>Género</b>	<b>Catalasa</b>	<b>Oxidasa</b>
<i>Azospirillum</i>	+	+
<i>Bosea</i>	+	+
<i>Diaphorobacter</i>	+	+
<i>Luteimonas</i>	+	+
<i>Lysobacter</i>	+	-
<i>Stenotrophomonas</i>	+	+
<i>Pseudomonas</i>	+	+/-
<i>Acinetobacter</i>	+	-
<i>Aeromonas</i>	+	+
<i>Bacillus</i>	+	+/-