

**UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y**  
**BIOTECNOLOGICAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA**



**DETECCIÓN DEL GEN *alkB* EN BACTERIAS CON POSIBLE ACTIVIDAD  
BIODEGRADADORA, AISLADAS DE SUELOS CONTAMINADOS CON  
HIDROCARBUROS**

TESIS PRESENTADA POR LA BACHILLER  
EN INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA:  
**KAROL ANDREA ARIZACA MAQUERA**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL  
DE: **INGENIERO BIOTECNÓLOGO**

ASESORA: **Dra. MARÍA ROSARIO  
VALDERRAMA VALENCIA**

**AREQUIPA – PERU**

**2015**

## AGRADECIMIENTO

Expreso gratitud muy especial:

Al Instituto Politécnico Nacional y al Centro de Biotecnología Genómica (CBG) de México, a sus docentes y personal administrativo por haberme acogido en sus instalaciones donde desarrolle la presente investigación.

A la Universidad Católica de Santa María de Arequipa, a la Carrera Profesional de Ingeniería Biotecnológica y a sus docentes por la formación profesional impartida durante mis años de estudios de pregrado.

A mi asesora, Dra. María Rosario Valderrama, constituyó un valioso apoyo académico y moral en la conclusión del presente trabajo.

A mi familia, que me apoyo en los momentos más difíciles y fueron el empuje adicional para seguir adelante, hasta lograr mis objetivos trazados.

## DEDICATORIA

A mis padres Cesar y Rosario  
y a mi hermano Anthony por  
su apoyo incondicional y  
constante en todas las etapas  
de mi vida.

**Karol Andrea**



## INDICE GENERAL

<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>17</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>17</b>
<b>1.1. OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
1.1.1.General.....	20
1.1.2.Específicos.....	20
<b>1.2. HIPÓTESIS</b> .....	<b>20</b>
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>21</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>21</b>
2.1. Contaminación ambiental.....	21
2.2. Contaminación con hidrocarburos.....	22
2.2.1. Hidrocarburos en el suelo.....	22
2.2.1.a. Parámetros del Contaminante.....	22
2.2.1.b. Parámetros del Suelo.....	23
2.2.1.c. Parámetros Ambientales.....	23
2.3. Remediación de suelos contaminados con hidrocarburos.....	24
2.3.1. Remediación in situ.....	24
2.3.2. Remediación ex situ.....	24
2.3.3. Sistemas de tratamiento.....	24
2.3.3.a. No recuperación.....	24
2.3.3.b. Aislamiento de la contaminación.....	24
2.3.3.c. Recuperación.....	25
2.4. Técnicas para la remediación de suelos.....	25
2.4.1. Bioventilación (In-situ).....	25
2.4.2. Extracción de vapores del suelo (In-situ).....	25
2.4.3. Incineración (Ex -situ).....	25
2.4.4. Oxidación Química (In Situ).....	26
2.5. Biorremediación.....	26

<b>2.5.1.</b>	<b>Técnicas de Biorremediación .....</b>	<b>27</b>
<b>2.5.1.a.</b>	<b>Bioestimulación.....</b>	<b>27</b>
<b>2.5.1.a.i.</b>	<b>Aplicaciones.....</b>	<b>27</b>
<b>2.5.1.a.ii.</b>	<b>Limitaciones.....</b>	<b>27</b>
<b>2.5.1.a.iii.</b>	<b>Costos y tiempos de remediación.....</b>	<b>28</b>
<b>2.5.1.b.</b>	<b>Bioaumentación.....</b>	<b>28</b>
<b>2.5.1.b.i.</b>	<b>Aplicaciones.....</b>	<b>28</b>
<b>2.5.1.b.ii.</b>	<b>Beneficios.....</b>	<b>29</b>
<b>2.5.1.b.iii.</b>	<b>Limitaciones.....</b>	<b>29</b>
<b>2.5.1.b.iv.</b>	<b>Costos y tiempos de remediación.....</b>	<b>29</b>
<b>2.5.1.c.</b>	<b>Bioaumentación Autóctona.....</b>	<b>29</b>
<b>2.5.2.</b>	<b>Consortio Microbiano.....</b>	<b>30</b>
<b>2.6.</b>	<b>Biosurfactantes.....</b>	<b>30</b>
<b>2.6.1.</b>	<b>Clasificación de los biosurfactantes.....</b>	<b>31</b>
<b>2.6.1.a.</b>	<b>Naturaleza química.....</b>	<b>31</b>
<b>2.6.1.b.</b>	<b>Peso molecular.....</b>	<b>32</b>
<b>2.6.1.b.i.</b>	<b>Bajo peso molecular.....</b>	<b>32</b>
<b>2.6.1.b.ii.</b>	<b>Alto peso molecular.....</b>	<b>32</b>
<b>2.6.1.c.</b>	<b>Carga iónica.....</b>	<b>32</b>
<b>2.6.1.c.i.</b>	<b>Agentes aniónicos.....</b>	<b>32</b>
<b>2.6.1.c.ii.</b>	<b>Agentes catiónicos.....</b>	<b>32</b>
<b>2.6.1.c.iii.</b>	<b>Agentes no iónicos.....</b>	<b>33</b>
<b>2.6.2.</b>	<b>Utilización de los Biosurfactantes.....</b>	<b>33</b>
<b>2.6.3.</b>	<b>Surfactantes Microbianos.....</b>	<b>34</b>
<b>2.6.4.</b>	<b>Elaboración de formulados bacterianos.....</b>	<b>36</b>
<b>2.7.</b>	<b>Identificación Bacteriana.....</b>	<b>36</b>
<b>2.7.1.</b>	<b>Aislamiento Bacteriano.....</b>	<b>36</b>
<b>2.7.1.a.</b>	<b>Técnicas de aislamiento.....</b>	<b>36</b>
<b>2.7.1.b.</b>	<b>Medios de cultivo.....</b>	<b>36</b>
<b>2.7.1.b.i.</b>	<b>Requisitos de crecimiento.....</b>	<b>37</b>

2.7.1.b.i.1. Atmósfera .....	37
2.7.1.b.i.2. Temperatura .....	37
2.7.1.b.i.3. Nutrición .....	37
2.7.2. Características macroscópicas y microscópicas .....	38
2.7.2.a. Microscópicas .....	38
2.7.2.b. Macroscópicas .....	38
2.7.3. Pruebas bioquímicas .....	39
2.7.4. Métodos moleculares de identificación bacteriana .....	39
2.7.4.a. Extracción de DNA cromosómico .....	40
2.7.4.b. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) .....	40
2.7.4.c. Amplificación .....	41
2.7.4.c.i. Ciclos de amplificación .....	41
2.7.4.d. Electroforesis .....	42
2.7.4.e. Análisis de secuencias .....	42
2.7.4.e.i. FASTA .....	43
2.7.4.e.ii. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) .....	44
<b>CAPÍTULO III</b> .....	<b>46</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>46</b>
<b>3.1. MATERIALES</b> .....	<b>46</b>
<b>3.2. MÉTODOS</b> .....	<b>47</b>
3.2.1. Toma de muestra .....	47
3.2.2. Procesamiento de la muestra .....	48
3.2.3. Primera inoculación .....	48
3.2.4. Segunda inoculación, primera siembra .....	50
3.2.5. Caracterización Molecular de la secuencia rRNA16S a partir de DNA genómico bacteriano .....	50
3.2.5.a. Extracción y cuantificación de DNA genómico bacteriano .....	50
.....	50
3.2.5.b. Preparación del Mix de PCR .....	51

3.2.5.c. Secuenciación .....	52
3.2.5.d. Identificación .....	53
3.2.6. Amplificación del Gen AlkB con primers 27F y 519R.....	54
3.2.7. Amplificación del Gen AlkB con primers PPalKBF y PPalKBR.....	54
3.2.8. Selección de cepas identificadas.....	56
3.2.8.a. Pruebas de crecimiento en medio MSM a diferentes concentraciones de aceite diesel.....	56
3.2.9. Determinación de actividad emulsificante de las bacterias identificadas .....	61
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>64</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>64</b>
4.1. Toma de muestra.....	64
4.2. Primera inoculación.....	64
4.3. Segunda Inoculación, primera Siembra.....	65
4.3.1. Crecimiento.....	66
4.3.2. Extracción de DNA bacteriano para identificación molecular.....	69
4.3.3. Cuantificación de DNA con NadoDrop, (concentración mínima >50ng/ul) .....	70
4.3.4. Identificación .....	72
4.3.5. Selección de aislados bacterianos.....	76
4.3.6. Pruebas de crecimiento en medio MSM a diferentes concentraciones de aceite diesel.....	77
4.3.7. Crecimiento a partir de las 0hrs a concentración 1% de aceite diesel, extracto de levadura 0.1% .....	91
4.3.8. Prueba para medir la Actividad Emulsificante generada por cada ml.....	93
<b>CAPÍTULO V.....</b>	<b>97</b>
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>97</b>

<b>CAPÍTULO VI</b> .....	<b>98</b>
<b>6. RECOMENDACIONES</b> .....	<b>98</b>
<b>CAPÍTULO VII</b> .....	<b>99</b>
<b>7. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA</b> .....	<b>99</b>
<b>CAPÍTULO VIII</b> .....	<b>104</b>
<b>8. ANEXOS</b> .....	<b>102</b>
<b>8.1.Figuras</b> .....	<b>102</b>
<b>8.2.Tablas</b> .....	<b>108</b>



## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Microorganismos productores de surfactantes.....	<b>35</b>
<b>Tabla 2.</b> Composición de medio MSM (Medio Mineral Salino).....	<b>49</b>
<b>Tabla 3.</b> Protocolo KIT PROMEGA de extracción de ADN .....	<b>108</b>
<b>Tabla 4.</b> Preparación del mix para PCR.....	<b>51</b>
<b>Tabla 5.</b> Preparación del mix para secuenciación bajo el protocolo del Kit Exo-Sap .....	<b>52</b>
<b>Tabla 6.</b> Preparación del mix para PCR con Primers específicos.....	<b>55</b>
<b>Tabla 7.</b> Distribución de tubos de ensayo con 20ml de medio MSM Alternativo (extracto de levadura 0.4%).....	<b>58</b>
<b>Tabla 8.</b> Distribución de tubos de ensayo con 20ml de medio MSM Alternativo (extracto de levadura 0.4%).....	<b>59</b>
<b>Tabla 9.</b> Distribución de matraces de 250ml con 100ml de medio MSM Alternativo (extracto de levadura 0.1%).....	<b>61</b>
<b>Tabla 10.</b> Composición de Medio Mínimo Goldman, suplementado con extracto de levadura 3%.....	<b>62</b>
<b>Tabla 11.</b> Comparación de crecimiento bacteriano a partir de caldo MSM.....	<b>65</b>
<b>Tabla 12.</b> Comparación de crecimiento bacteriano.....	<b>68</b>
<b>Tabla 13.</b> Resultados de cuantificación de muestras y concentración a emplear....	<b>109</b>
<b>Tabla 14.</b> Resultados obtenidos del alineamiento múltiple y comparación con una secuencia conocida.....	<b>73</b>
<b>Tabla 15.</b> Selección de colonias a partir de la identificación y facilidad de crecimiento. .....	<b>76</b>
<b>Tabla 16.</b> Resultados obtenidos a partir de diferentes siembras en placa.....	<b>78</b>
<b>Tabla 17.</b> Resultados obtenidos de la inoculación en medio MSM Alternativo y extracto de levadura 0.4%.....	<b>80</b>
<b>Tabla 18.</b> Comparación de crecimiento de las diferentes cepas bacterianas.....	<b>80</b>
<b>Tabla 19.</b> Crecimiento bacteriano C4-1% .....	<b>109</b>
<b>Tabla 20.</b> Crecimiento bacteriano C7-1%.....	<b>110</b>

<b>Tabla 21.</b> Crecimiento bacteriano C13-1% .....	<b>110</b>
<b>Tabla 22.</b> Crecimiento bacteriano C14-1% .....	<b>110</b>
<b>Tabla 23.</b> Crecimiento bacteriano C4-2% .....	<b>111</b>
<b>Tabla 24.</b> Crecimiento bacteriano C7-2% .....	<b>111</b>
<b>Tabla 25.</b> Crecimiento bacteriano C13-2% .....	<b>111</b>
<b>Tabla 26.</b> Crecimiento bacteriano C14-2% .....	<b>112</b>
<b>Tabla 27.</b> Crecimiento bacteriano C4-4% .....	<b>112</b>
<b>Tabla 28.</b> Crecimiento bacteriano C7-4% .....	<b>112</b>
<b>Tabla 29.</b> Crecimiento bacteriano C13-4% .....	<b>113</b>
<b>Tabla 30.</b> Crecimiento bacteriano C14-4% .....	<b>113</b>
<b>Tabla 31.</b> Crecimiento bacteriano C4-6% .....	<b>113</b>
<b>Tabla 32.</b> Crecimiento bacteriano C7-6% .....	<b>114</b>
<b>Tabla 33.</b> Crecimiento bacteriano C13-6% .....	<b>114</b>
<b>Tabla 34.</b> Crecimiento bacteriano C14-6% .....	<b>114</b>
<b>Tabla 35.</b> Crecimiento bacteriano C4-8% .....	<b>115</b>
<b>Tabla 36.</b> Crecimiento bacteriano C7-8% .....	<b>115</b>
<b>Tabla 37.</b> Crecimiento bacteriano C13-8% .....	<b>115</b>
<b>Tabla 38.</b> Crecimiento bacteriano C14-8% .....	<b>116</b>
<b>Tabla 39.</b> Distribución de matraces de 250ml con 100ml de medio MSM Alternativo (Extracto de levadura 0.1%).....	<b>90</b>
<b>Tabla 40.</b> Crecimiento bacteriano C4 .....	<b>116</b>
<b>Tabla 41.</b> Crecimiento bacteriano C7 .....	<b>116</b>
<b>Tabla 42.</b> Crecimiento bacteriano C13 .....	<b>117</b>
<b>Tabla 43.</b> Crecimiento bacteriano C14 .....	<b>117</b>
<b>Tabla 44.</b> Actividad Emulsificante – Placa .....	<b>117</b>
<b>Tabla 44.</b> Actividad Emulsificante – Placa vs Inóculo .....	<b>118</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Etapas del proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S.....	<b>102</b>
<b>Figura 2.</b> Zona de muestreo (Parque Cultural).....	<b>102</b>
<b>Figura 3.</b> Secado, y procesamiento de la muestra.....	<b>103</b>
<b>Figura 4.</b> Capturas de colonia crecida en caldo MSM, teñida con colorante azul de coomassie.....	<b>103</b>
<b>Figura 5.</b> Captura de colonias globulares con tinción de gram (-).....	<b>103</b>
<b>Figura 6.</b> Captura de colonias bacilares gram (+).....	<b>103</b>
<b>Figura 7.</b> Captura de colonias bacilares gram (-).....	<b>104</b>
<b>Figura 8.</b> Captura de gel corrido para DNA en cámara electroforética.....	<b>69</b>
<b>Figura 9.</b> Captura de gel corrido en cámara electroforética a 80v con primers 16s rRNA.....	<b>71</b>
<b>Figura 10.</b> Captura de los electroferogramas a partir de la secuenciación del DNA bacteriano.....	<b>104</b>
<b>Figura 11.</b> Captura de gel corrido en cámara electroforética con primers 27F y 519R.....	<b>74</b>
<b>Figura 12.</b> Captura de gel corrido en cámara electroforética con primers PPalKBF y PPalKBR.....	<b>75</b>
<b>Figura 13.</b> Curva de crecimiento a partir de las 72hrs a concentración 1% de aceite diesel – C4, C7, C13 y C14.....	<b>81</b>
<b>Figura 14.</b> Curva de crecimiento a partir de las 72hrs a concentración 2% de aceite diesel – C4, C7, C13 y C14.....	<b>83</b>
<b>Figura 15.</b> Curva de crecimiento a partir de las 72hrs a concentración 4% de aceite diesel – C4, C7, C13 y C14.....	<b>84</b>
<b>Figura 16.</b> Crecimiento bacteriano en MSM alternativo, a distintas concentraciones de aceite diesel.....	<b>106</b>
<b>Figura 17.</b> Curva de crecimiento a partir de las 72hrs a concentración 6% de aceite diesel – C4, C7, C13 y C14.....	<b>86</b>

<b>Figura 18.</b> Curva de crecimiento a partir de las 72hrs a concentración 8% de aceite diesel – C4, C7, C13 y C14.....	<b>88</b>
<b>Figura 19.</b> Esquema del sistema de enriquecimiento secuencial para el aislamiento de cepas bacterianas degradadoras de petróleo a partir de suelos contaminados con crudo. .....	<b>107</b>
<b>Figura 20.</b> Curva de crecimiento a concentración 1% de aceite diesel, extracto de levadura 0.1% - C4, C7, C13, C14.....	<b>91</b>
<b>Figura 21.</b> Crecimiento bacteriano en MSM NO ALTERNATIVO, demostrando propiedad emulsificante.....	<b>107</b>
<b>Figura 22.</b> Prueba para medir la Actividad Emulsificante generada por cada ml (placa) .....	<b>94</b>
<b>Figura 23.</b> Prueba para medir la Actividad Emulsificante generada por cada ml (placa vs inóculo activado).....	<b>95</b>



## ABREVIATURAS

- **DNA** : ácido desoxirribonucleico
- **RNA** : Ácido Ribonucleico
- **rRNA** : Ácido Ribonucleico ribosomal
- **PAHs** : Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
- **pb** : Pares de bases
- **rpm** : revoluciones por minuto
- **MSM** : Medio Mineral Salino
- **UAE** : Unidad de Actividad Emulsificante
- **ml** : mililitros
- **ABS** : Absorbancia
- **nm** : nanómetros
- **PCR** : Reacción en Cadena de la Polimerasa
- **VOC's** : Compuestos Orgánicos Volátiles
- **PCBs** : Bifenilos Policlorados
- **°C** : Grados Celsius
- **O<sub>2</sub>** : Oxígeno
- **m<sup>3</sup>** : Metros cúbicos
- **pH** : Potencial de Hidrógeno
- **INTA** : Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
- **NCBI** : Centro Nacional para Información Biotecnológica
- **h** : horas
- **Gram (+)** : Tinción de Gram positiva
- **Gram (-)** : Tinción de Gram negativa
- **BH** : Medio Bushnell Haas
- **Cepa** : Colonia aislada pura
- **(M)** : Marcador de peso molecular
- **(C-)** : Control negativo
- **Bco, B** : Blanco

- **ng** : Nanogramo
- **g** : Gramo
- **ul** : Microlitro
- **C<sub>1</sub>** : Concentración 1
- **C<sub>2</sub>** : Concentración 2
- **Vol.** : Volumen
- **- P** : de Placa
- **- I** : de Inóculo Activado
- **DCPIP** : Diclorofenol-indofenol



## RESUMEN

Actualmente existen diferentes métodos para remediar los derrames de hidrocarburos en el suelo. La biorremediación señala que el uso de un consorcio bacteriano autóctono aislado directamente del suelo contaminado aumenta la eficacia en la remediación (Gan et al., 2009). En el presente trabajo de investigación, se ha estudiado la prevalencia del gen AlkB, que codifica a la enzima alcano monooxigenasa, ésta facilita la emulsión bacteriana permitiendo romper las cadenas del hidrocarburo de manera que la bacteria consume el carbono presente. Se muestreó en una zona con antecedentes de derrames ubicada en la ciudad de Reynosa, Tamaulipas-México, se aisló los cultivos en agar nutritivo, se extrajo el DNA y se secuenció las muestras para identificarlas obteniendo 14 aislados dentro de ellos microorganismos ya reportados por su capacidad biodegradadora de PAHs como *Bacillus cereus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Paenibacillus sp.*, adicionalmente se amplificó cada una de las muestras con primers específicos (27F y 519R) que codifican al gen AlkB relacionado con la actividad enzimática de la alcano monooxigenasa, obteniendo la presencia de una banda a la altura de 600 pares de bases en 12 muestras, se seleccionó cuatro bacterias gracias a la bibliografía reportada y estas se crecieron en caldo MSM (Medio Mineral Salino) conteniendo distintas concentraciones de aceite diesel (1%, 2%, 4%, 6% y 8%), para determinar su capacidad de crecer en un medio donde la única fuente de carbono fue el hidrocarburo presente, hubo crecimiento y clara disrupción del aceite diesel agregado, lo cual se reportó con el control de absorbancia de cada muestra; la actividad emulsificante bacteriana se corroboró mediante el método propuesto por Goldman y col. (1982), a partir del cual se inoculó las bacterias seleccionadas (C4, C7, C13, C14) en un medio específico (Medio Goldman), se centrifugaron y se mezclaron con un hidrocarburo a fin de facilitar la emulsión, posterior a esto se registra las ABS a 540nm y se determinó la UAE/ml (Unidades de Actividad Emulsificante), obteniendo valores entre 0.069 y 0.667 siendo las bacterias seleccionadas las que registran mayor UAE/ml.

**Palabras Clave:** Biorremediación, gen AlkB, alcano monooxigenasa, *Bacillus cereus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Paenibacillus sp.*, primers.

## ABSTRACT

At the present, it have carried out diferents methods to try remedy the environmental damage because of the oil spills on the floor. Bioremediation uses microorganisms with the ability to degrade hydrocarbons, pointing out the use of an isolated from contaminated soil like an indigenous bacterial consortium, that increases the effectiveness of the remediation (Gan et al., 2009). In this research, we studied the prevalence of AlkB gene which encoding the enzyme alkane monooxygenase, it facilitates bacterial emulsion breaking the chains of hydrocarbon so that the bacteria consume the carbon present. It was sampled in an area with an antecedent of spills located in the city of Reynosa, Tamaulipas-Mexico, isolate crops on nutrient agar, the DNA was extracted and the samples were identified obtaining 14 isolated, within the sequenced organisms as reported by their biodegradation ability of PAHs as *Bacillus cereus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Paenibacillus sp.*, additionally the samples were sequenced with specific primers (27F and 519R) to AlkB gene, associated with the activity of the enzyme alkane monooxygenase, obtaining presence of bands in 12 samples at 600pb of molecular weight, and the bacteria reported were selected to grown in broth MSM which contained different concentrations of diesel oil (1%, 2%, 4%, 6% and 8%) to know their ability to grow in an environment where the only source of carbon is the hydrocarbon present in the medium, there was a clear growth and disruption of diesel oil added, which was reported in the control of absorbance in each sample, the emulsifying bacterial activity was corroborated using a method proposed by Goldman y col. (1982), where isolated grow in a specific medium, centrifuged and mixed with a hydrocarbon to facilitate the emulsion after this the ABS was recorded at 540nm and the UAE/ml (units of activity was determined emulsifier), obtaining values between 0.069 and 0.667 being selected bacteria which recorded higher UAE/ml.

**Keywords:** Bioremediation, AlkB gene, alkane monooxygenase, *Bacillus cereus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Paenibacillus sp*, primers.

## CAPÍTULO I

### 9. INTRODUCCIÓN

Los derrames o vertimientos de hidrocarburos en el suelo sobre todo los cercanos a zonas agrícolas pueden llegar a ella por procesos de escorrentía e incluso alcanzar las aguas subterráneas, las cuales muchas veces son usadas para consumo directo o para actividades de riego. Se han planteado muchos métodos para evitar estos problemas desde los químicos hasta los biológicos. En la última década la biorremediación, ha tomado mucha importancia lo que implica la búsqueda de microorganismos con capacidad para degradar hidrocarburos, sin embargo el encontrar estos microorganismos implica buscar dentro de toda una gran gama, cuál de ellos tienen esta capacidad. Por lo que se requiere buscar técnicas que permitan una selección rápida para este proceso.

Gran parte de empresas dedicadas a surtir combustibles procesados están localizadas en autopistas cercanas a zonas agrícolas, y empiezan a realizar trabajos de adecuación que implica incluso derrames en gran dimensión, al respecto las autoridades piden un plan de contingencia, con el cual no todas las empresas cuentan y se genera un abandono de las zonas afectadas. Según un reporte periodístico del Diario Últimas Noticias (3 de Octubre del 2014, Cd. Victoria-México), se señala que la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA), supervisa los trabajos de saneamiento, remediación y caracterización de suelo natural, el cual fue impactado tras un derrame provocado por una fuga de hidrocarburo en un árbol de válvulas de un pozo de gas natural, en las instalaciones de Petróleos Mexicanos (PEMEX), ubicadas en Reynosa, Tamaulipas-México, razón por la cual se decidió realizar el trabajo de investigación en este ámbito.

La biorremediación está acompañada de dos métodos: bioaumentación y bioestimulación; el proceso de bioaumentación envuelve el uso de microorganismos que han sido cultivados para degradar diferentes compuestos dentro de un sistema

contaminado, donde por lo general los cultivos deben derivar del mismo lugar que ha sido contaminado o pueden pertenecer a un stock de microorganismos previamente probados para degradar un contaminante específico; es decir puede emplear microorganismos endógenos o exógenos con capacidad de degradación local. También se demostró por estudios recientes, que el uso de un consorcio bacteriano autóctono aislado directamente del suelo contaminado, aumentó la eficacia en la remediación (Gan et al., 2009). El estudio de los procesos de biorremediación tiene un gran interés, y no sólo por las ventajas que posee la restauración de un ecosistema. Las bacterias responsables de la biorremediación, los procesos bioquímicos que llevan a las reacciones de degradación, así como los genes que codifican las enzimas responsables de estos procesos se han ido analizando tanto para un conocimiento desde un punto de vista básico como aplicado, esto permite conocer mejor la evolución ligada a procesos geoquímicos de nuestro planeta.

Una de las características más importantes de las bacterias degradadoras de hidrocarburos es la capacidad de emulsionar hidrocarburos en solución mediante la producción de agentes activos de superficie tales como biosurfactantes (Hommel, 1990; Neu, 1996; Desai y Banat, 1997; Bredholt et al., 1998). Para llevar a cabo esta emulsión es necesario que las bacterias presenten el gen (AlkB) para la enzima específica: alcano monooxigenasa, la cual permite la producción de un surfactante, el mismo que gracias a la tensión superficial ayuda al rompimiento de cadenas carbonadas presentes en los hidrocarburos.

En el año 2003, se reporta una investigación por parte del Instituto de Biología Molecular de Eslovaquia, según la revista Biología, en dónde se efectuó una localización de una zona afectada por derrames radioactivos y de combustibles fósiles, para lo cual procedieron a aislar bacterias de los suelos contaminados en medio MSM (Medio Mineral Salino) suplementado con una mezcla de PAHs(Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos) (Fluka Sigma-Aldrich, St. Louise, USA), posterior a esto reportan setenta y tres cultivos aislados, efectuaron un

análisis RISA (Software Simple de Análisis Estructural) y una identificación por 16sRNA, con lo cual identificaron géneros bacterianos como *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter* and *Sphingomonas*, presentes en estos suelos contaminados. Para comprobar su posible actividad biodegradadora efectuaron el ensayo del 2,6-diclorofenol indofenol (Hanson et al. 1993), y crecimiento en caldo mínimo suplementado con PAHs (naftaleno, fenantreno, pireno, fluoranteno). De estos en los resultados que muestran, señalan que cinco tipos de bacterias (*Pseudomonas putida*, *Arthrobacter oxydans*, *Sphingomonas sp.*, *S. paucimobilis*, *Bacillus cereus*) muestran capacidad degradadora de PAHs, y su posible empleo en las estrategias de biorremediación.

Las alcano monooxigenasas pueden encontrarse en bacterias Gram-negativas, como, *Pseudomonas* (Pp AlkB; C5-C12 n-alcános) (van Beilen, J.B., Wubbolts, M.G. and Witholt, B. (1994)), y *Acinetobacter* (Ac alkM; C10-C20 n-alcános) (Ratajczak, A., GeiMdo«rfer, W. and Hillen, W. (1998), las cuales a la fecha se han caracterizado en detalle genéticamente. Este género y otras bacterias estrechamente relacionados son considerados miembros importantes de las poblaciones microbianas degradantes de hidrocarburos en suelos contaminados. Sin embargo, en la actualidad no hay mucha información disponible que describe la prevalencia y distribución de varios genes alcano monooxigenasas en otras bacterias presentes en suelos contaminados con hidrocarburos.

En la presente investigación, se ha estudiado la prevalencia del gen (AlkB), que codifica para la enzima alcano monooxigenasa en suelos contaminados con hidrocarburos obtenidos de una zona con antecedentes de derrames de petróleo, se determinó esto por métodos moleculares, utilizando oligonucleótidos cebadores específicos ya reportados de los genotipos Pp AlkB, Rh alkB1, adicionalmente se llevó a cabo pruebas de crecimiento en caldo MSM suplementado con hidrocarburos y posteriormente una evaluación sobre la capacidad de producción de biosurfactantes o capacidad de emulsión.

## 9.1. OBJETIVOS

### 9.1.1. General

Detectar el gen AlkB en bacterias con posible actividad biodegradadora, aisladas de suelos contaminados con hidrocarburos

### 9.1.2. Específicos

- Aislar bacterias nativas con capacidad biodegradadora a partir de suelos contaminados con hidrocarburos.
- Identificar y caracterizar las bacterias aisladas a partir de pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares.
- Amplificar el gen AlkB mediante PCR en las bacterias obtenidas de suelos contaminados con hidrocarburos.
- Evaluar la capacidad biodegradadora de las bacterias que presentan el gen AlkB.

## 9.2. HIPOTESIS

En suelos contaminados con hidrocarburos, es posible encontrar bacterias nativas con presencia y expresión del gen AlkB que efectuarán su capacidad biodegradadora sobre estos contaminantes.

## CAPITULO II

### 10. MARCO TEÓRICO

El interés de la ciudadanía por el cuidado del medio ambiente se ha incrementado notablemente a lo largo de los últimos años, a medida que se ha notado la afección del ecosistema y las limitaciones existentes con los recursos de la biosfera, el incremento de población genera una mayor demanda de energía, siendo este el caso de distintos hidrocarburos empleados a nivel mundial, siendo extraídos para abastecer a la población o emplearlos a nivel industrial, lo cual ha ido desencadenando factores adversos.

#### 10.1. Contaminación ambiental

Se denomina contaminación a la aparición de una nueva sustancia en un sistema natural (atmósfera, aguas, suelos) o al aumento de la concentración de una sustancia del sistema superando las variaciones típicas y naturales. La contaminación puede ser química (mediante elementos o compuestos químicos en estado sólido, líquido o gaseoso), física (calor, ruido, radioactividad), o biológica (bacterias, virus y otros microorganismos).

Los principales contaminantes que llegan a los mares son: aguas residuales de origen urbano, metales pesados, herbicidas, pesticidas, desechos y productos industriales, sustancias radioactivas, petróleo y sus derivados. Los suelos pueden contaminarse con los desechos urbanos (basuras), industriales y radioactivos. Entre los contaminantes más frecuentes emitidos a la atmósfera se hallan los propelentes de aerosoles (propano, butano), óxidos de azufre (principalmente anhídrido sulfuroso), monóxido de carbono, óxidos de nitrógeno (óxido nítrico y dióxido de nitrógeno), hidrocarburos (ej. etileno), compuestos halogenados (cloro, fluoruro de hidrógeno, cloruro de hidrógeno y ciertos haluros), metales tóxicos como el plomo y el mercurio. (M.VILLVERDE, F.MARTIN, M.MONTERO, J.M.SANZ. 1984)

## 10.2. Contaminación con hidrocarburos

La palabra hidrocarburos designa un grupo de compuestos orgánicos constituidos principalmente por átomos de carbono e hidrógeno. La conformación y estructura de sus moléculas abarca desde la más simple, el metano (CH<sub>4</sub>), hasta aquellas de elevada complejidad como las correspondientes a los hidrocarburos aromáticos policíclicos (DOMENECH, X., 1994).

La contaminación involucra todas las operaciones relacionadas con la explotación y transporte de hidrocarburos, que conducen inevitablemente al deterioro gradual del ambiente. Afecta en forma directa al suelo, agua, aire, y a la fauna y la flora (Instituto Argentino del Petróleo, 1991).

Los hidrocarburos se pueden encontrar de la siguiente forma en el suelo: líquida, soluble en el agua del suelo, adsorbidos por el suelo y en la atmósfera edáfica (Lesser, 1995).

### 10.2.1. Hidrocarburos en el suelo

En la actualidad los suelos contaminados con estos compuestos representan el 70% del total de los ecosistemas impactados. (Swannell, 2000).

Diferentes factores climatológicos como la temperatura y la precipitación pluvial también tienen una gran influencia. Todas las variables en su conjunto definen el tamaño y la distribución tridimensional del frente de contaminación en una zona específica, los parámetros del compuesto químico, suelo y ambiente que influyen en el transporte a través del suelo son (Jury, 1989):

**10.2.1.a. Parámetros del Contaminante:** solubilidad, presión de vapor, número y tipo de grupos funcionales, polaridad.

**10.2.1.b. Parámetros del Suelo:** contenido y retención de agua, porosidad, densidad y permeabilidad, contenido de arcilla, contenido de materia orgánica, profundidad de agua subterránea.

**10.2.1.c. Parámetros Ambientales:** temperatura, precipitación, evapotranspiración.

Probablemente el componente más importante del suelo en relación con la persistencia de sustancias tóxicas es la arcilla. La persistencia aumenta cuanto más pequeñas son las partículas debido a que aportan una gran área superficial para la absorción de los productos químicos (SCHINNER F. 2001).

Las propiedades químicas más afectadas por un derrame de hidrocarburos en el suelo son:

- Aumento del carbono orgánico ya que el 75 % del carbono del petróleo crudo es oxidable.
- Disminución del pH, debido a la acumulación del carbono orgánico y generación de ácidos orgánicos.
- Aumento del manganeso y hierro intercambiable.
- Aumento del fósforo disponible (Semarnap, 1996).

Los efectos tóxicos de los hidrocarburos en el ambiente dependerán de:

- La cantidad y composición del petróleo
- La frecuencia y tiempo de exposición
- El estado físico del derrame.
- Las características del sitio donde sucedió el derrame.
- Variables ambientales como temperatura, humedad y oxígeno.
- El uso de dispersantes químicos (está restringido su uso).

- La sensibilidad de la biota específica del ecosistema impactado (Semarnap, 1996).

### **10.3. Remediación de suelos contaminados con hidrocarburos:**

El tratamiento y recuperación de suelos contaminados se puede definir como el conjunto de operaciones realizadas con el objetivo de controlar, disminuir o eliminar los contaminantes presentes.

**10.3.1. Remediación in situ:** Se lleva a cabo directamente en la zona afectada, son de menor costo, de bajo impacto ambiental inducido pero existen muchas dudas sobre los resultados finales.

**10.3.2. Remediación ex situ:** se destacan por su efectividad, dado que el suelo contaminado es físicamente eliminado y el suelo nuevo que se incorpora se homogeniza con el anterior no contaminado, pudiendo controlarse mejor el proceso. El sistema se opera prescindiendo de los factores externos como el clima. Su problema radica en el alto costo (Schinner F. 2001).

**10.3.3. Sistemas de tratamiento:** Los sistemas de tratamiento se pueden dividir en: No recuperación, Aislamiento de la contaminación y Recuperación.

**10.3.3.a. No recuperación:** debe modificarse la asignación del suelo y delimitarse perfectamente el espacio afectado, además de efectuarse monitoreos que aseguren la imposibilidad de afectaciones a terceros (Vogel TM 1996).

**10.3.3.b. Aislamiento de la contaminación:** consiste en establecer medidas correctas de seguridad que impida la progresión de la contaminación y mitigando los efectos adversos relacionados con la dispersión de sustancias contaminantes. El aislamiento puede utilizarse para evitar la creación de lixiviados o la infiltración en napas freáticas (Vogel TM 1996).

**10.3.3.c. Recuperación:** Las medidas de recuperación se dividen en tratamiento in situ, que implica la eliminación de contaminantes sin sacar el terreno, y ex situ donde el material a tratar se lleva a un espacio confinado o se trata en instalaciones adecuadas (Vogel TM 1996).

#### **10.4. Técnicas para la remediación de suelos:**

**10.4.1. Bioventilación (In-situ):** Se basa en la extracción de vapores del suelo mediante una diferencia de presión generada por el bombeo de aire desde el exterior. Se aplica en suelos no saturados contaminados con hidrocarburos. Los gases generados deben ser tratados, normalmente haciéndolos pasar por filtros que contengan sustancias retenedoras adecuadas para cada gas como, por ejemplo, carbón activado. Es una técnica de bajo costo y mínimo impacto.

**10.4.2. Extracción de vapores del suelo (In-situ):** Los compuestos volátiles se remueven en fase vapor del suelo mediante la obtención de un gradiente de presión/concentraciones por aplicación de vacío realizado a través de pozos de extracción. Se aplica para VOC's (compuestos orgánicos volátiles) y algunos combustibles volátiles pero no es adecuado para aceites, hidrocarburos pesados y PCBs (bifenilos policlorados). No es efectivo en suelos saturados y alto contenido de finos. Es una tecnología disponible comercialmente que funciona bien en condiciones de suelo de permeabilidad alta. Los gases extraídos requieren tratamiento y los líquidos residuales tratamiento y disposición final.

**10.4.3. Incineración (Ex -situ):** Se somete el suelo contaminado con hidrocarburos a altas temperaturas (1200°C) para que los contaminantes se evaporen y se quemen luego en condiciones controladas. Se requiere la depuración de gases. La disposición final de los suelos contaminados puede

hacerse en hornos de cemento por la técnica denominada valorización de residuos lo que permite una eliminación segura de pasivos ambientales.

**10.4.4. Oxidación Química (In Situ):** es una innovadora tecnología de tratamiento en la cual los oxidantes químicos son inyectados en el sitio contaminado para oxidar los contaminantes. Los beneficios de esta tecnología son: la habilidad que tienen los oxidantes químicos para oxidar los contaminantes; la reducción del tiempo total del tratamiento; la posibilidad de tratar áreas contaminadas sin perturbar el sistema y la eliminación del costo de excavación y manipulación de suelos contaminados (Killian et al., 2007). Esta técnica emplea oxidantes como el ozono, peróxido de hidrógeno, permanganato y persulfato lo cual la convierte en una técnica prometedora, pero que genera una determinada demanda tecnológica y solvente (Bissey et al 2006; Rivas 2006; Ferrarese et al. 2008).

La tecnología oxidativa ofrece varias ventajas sobre las tecnologías convencionales de tratamiento tales como el bombeo y la inyección. Por ejemplo, esta tecnología no genera grandes volúmenes de materiales de desecho que deben ser depositados y/o tratados. La misma también es implementada en un periodo de tiempo mucho más corto.

#### **10.5. Biorremediación:**

Es el resultado de los procesos de digestión, asimilación y metabolización de un compuesto orgánico llevado a cabo por bacterias, hongos, protozoos y otros organismos. En principio, todo compuesto sintetizado biológicamente puede ser descompuesto biológicamente. Sin embargo, muchos compuestos biológicos (lignina, celulosa, etc.) son difícilmente degradados por los microorganismos debido a sus características químicas.

La biorremediación puede llevarse a cabo in-situ o ex-situ, y está basada en la capacidad que tienen los microorganismos de crecer a partir de la utilización de sustancias recalcitrantes al medio ambiente (Shmaefsky, 1999, Mack Kay, 2001). Algunos de ellos son capaces de degradar estos compuestos hasta dióxido de carbono, sales, agua y otros productos inocuos al medio ambiente (Advanced Bio-Tech, 2000) los cuales se integran posteriormente a los ciclos biogeoquímicos naturales (Mack Kay, 2001). Esta técnica permite tratar grandes volúmenes de contaminantes con un impacto ambiental mínimo, a diferencia de otros procedimientos de descontaminación (Molnaa y Grubbs, 2001).

Los procesos de biorremediación clasifican en técnicas de bioestimulación y bioaumentación.

#### **10.5.1. Técnicas de Biorremediación**

**10.5.1.a. Bioestimulación:** La bioestimulación implica la circulación de soluciones acuosas (que contengan nutrientes y/u oxígeno) a través del suelo contaminado, para estimular la actividad de los microorganismos autóctonos, y mejorar así la biodegradación de contaminantes orgánicos o bien, la inmovilización de contaminantes inorgánicos in situ (Van Deuren y col., 1997).

**10.5.1.a.i. Aplicaciones:** Se ha usado con éxito para remediar suelos contaminados con gasolinas, COVs, COSs, y pesticidas (Alexander, 1994). Estudios a escala piloto, han mostrado la biodegradación de suelos contaminados con desechos de municiones.

**10.5.1.a.ii. Limitaciones:** Esta tecnología no es recomendable para suelos arcillosos, altamente estratificados o demasiado heterogéneos, ya que pueden provocar limitaciones en la transferencia de O<sub>2</sub>. Otros factores que pueden limitar su aplicación, incluyen: (i) que el tipo del suelo no favorezca el

crecimiento microbiano; (ii) incremento en la movilidad de los contaminantes; (iii) obstrucción en los pozos de inyección provocada por el crecimiento microbiano.

**10.5.1.a.iii. Costos y tiempos de remediación:** La limpieza de una pluma de contaminación, puede tomar varios años. Su costo oscila entre 30 y 100 USD/m<sup>3</sup>. La naturaleza y profundidad de los contaminantes y el uso de bioaumentación puede aumentar sus costos (Van Deuren y col., 1997).

**10.5.1.b. Bioaumentación:** El principio de la bioaumentación es de utilizar bacterias altamente especializadas para incrementar y mejorar, la capacidad de digestión total de la población bacteriana natural (Shmaefsky, 1999; Saponaro et al, 2002). La bioaumentación asegura que estén presentes los microorganismos específicos capaces de degradar al compuesto contaminante no deseado hasta sus moléculas básicas (Advanced BioTech, 2000).

Esta tecnología se utiliza cuando se requiere el tratamiento inmediato de un sitio contaminado, o cuando la microflora autóctona es insuficiente en número o capacidad degradadora. El tamaño del inóculo a utilizar, depende del tamaño de la zona contaminada, de la dispersión de los contaminantes y de la velocidad de crecimiento de los microorganismos degradadores (Riser-Roberts, 1998).

**10.5.1.b.i. Aplicaciones:** Se ha usado para tratar suelos contaminados con herbicidas (2,4-D, clorofam), insecticidas (lindano, clordano, paratión), clorofenoles (PCP) y nitrofenoles, BPCs, HTPs y HAPs (Alexander, 1994). También se ha aplicado efectivamente para tratar desechos con concentraciones relativamente altas de metales (Eweis y col., 1998).

**10.5.1.b.ii. Beneficios:**

- Reducción de la Formación del H<sub>2</sub>S (Ácido Sulfhídrico).
- Mejoramiento de la bioactividad.
- Reducción de la DBO (Demanda bioquímica de oxígeno).
- Mejoramiento de la estabilidad del sistema.
- Reducción de espuma.
- Mejoramiento de la sedimentación de sólidos.
- Reducción del volumen de lodos.

**10.5.1.b.iii. Limitaciones:** Antes de llevar a cabo la bioaumentación en un sitio, deben realizarse cultivos de enriquecimiento, aislar microorganismos capaces de co-metabolizar o utilizar el contaminante como fuente de carbono, y cultivarlos hasta obtener grandes cantidades de biomasa (Alexander, 1994). Se sabe también que la respuesta microbiana no será igual en todos los suelos, esto debiéndose a las condiciones del suelo.

**10.5.1.b.iv. Costos y tiempos de remediación:** Es una tecnología que puede durar varios meses o años, y su utilización no implica mucho capital ni costos de operación.

**10.5.1.c. Bioaumentación Autóctona:** es una técnica relativamente nueva que consiste en incorporar al sistema sólo organismos autóctonos o nativos, es decir, que pertenezcan a la misma zona donde se ha generado la contaminación, se debe haber comprobado la eficiencia de los mismos para la función o actividad que se espera que realicen. Estos organismos son multiplicados en laboratorios experimentales y luego son incorporados a su hábitat natural. PANAMERICAN ENERGY, SWACO y GEOciencia han empleado esta última

concepción de la bioaumentación para la realización trabajos de biorremediación en la provincia de Salta, Argentina.

**10.5.2. Consorcio Microbiano:** Un Consorcio Microbiano es una asociación natural de dos o más poblaciones microbianas, de diferentes especies, que actúan conjuntamente como una comunidad en un sistema complejo, donde todos se benefician de las actividades de los demás. La asociación refleja estilos de vida sinérgicos o sintróficos (que significa “comiendo juntos”) en el que el crecimiento y el flujo cíclico de nutrientes se conduce más efectiva y eficientemente que en poblaciones individuales (López, Domínguez & García, 2007). Funcionalmente, un consorcio microbiano supera la suma de sus partes; sus miembros mantienen la compatibilidad metabólica y ecológica siempre y cuando las transformaciones ambientales que se generan permitan que ellos coexistan cercanamente.

**10.6. Biosurfactantes:**

Se dice que un soluto es un agente tensoactivo o surfactante cuando da lugar a un descenso significativo de la tensión superficial. El descenso de la tensión facilita la eliminación de las partículas de la suciedad de las superficies sólidas. Son moléculas que contienen un segmento liposoluble (soluble en aceite) y otro hidrosoluble (soluble en agua o disolventes polares). La solubilidad parcial tanto en agua como en aceite permite al surfactante ocupar la interfase. Así pues, reducen la tensión superficial y las tensiones interfaciales entre moléculas individuales en la superficie y la interfase, respectivamente. Tienen propiedades emulsionantes (Gentry TJ, Rensing C, Pepper IL 2004).

Atendiendo a estos criterios un biosurfactante sería una molécula biológica (orgánica) con propiedades surfactantes o tensoactivas producidas sobre

superficies vivas, mayormente superficies de células microbianas, o excretados al medio extracelular.

Con excepción del poder bactericida de ciertos surfactantes, fenómeno del cual no hay una explicación absolutamente segura, se puede decir que todas las propiedades y usos de los surfactantes provienen de dos propiedades fundamentales de estas sustancias: su *capacidad de adsorberse a las interfases* y de otra parte su *tendencia a asociarse para formar estructuras organizadas* (Gentry TJ, Rensing C, Pepper IL 2004).

**10.6.1. Clasificación de los biosurfactantes:** Los surfactantes microbianos son moléculas complejas que cubren un amplio rango de estructuras químicas incluyendo péptidos, ácidos grasos, fosfolípidos, glicolípidos, antibióticos, lipopéptidos, etc. Los microorganismos también producen en algunos casos, surfactantes que son combinaciones de muchas estructuras químicas como los surfactantes microbianos poliméricos. Muchos surfactantes microbianos han sido purificados y sus estructuras químicas son conocidas. Mientras que los de alto peso molecular son generalmente heteropolisacáridos polianiónicos que contienen tanto polisacáridos como proteínas, los de bajo peso molecular suelen ser glicolípidos (Singh et al., 2007).

Podemos clasificar los biosurfactantes atendiendo a tres criterios: naturaleza química, peso molecular y carga iónica de la parte superficialmente activa de la molécula.

**10.6.1.a. Naturaleza química:**

- Lípidos
- Hidratos de carbono
- Aminoácidos
- Glucolípidos
- Lipopéptidos

#### 10.6.1.b. **Peso molecular:**

**10.6.1.b.i. Bajo peso molecular:** Suelen ser glicolípidos. El más estudiado es el rhamnolípido, producido por diversas especies como *Pseudomonas*. La función principal de estos biosurfactantes es reducir la tensión superficial entre fases (agua-roca por ejemplo) (Supaphol et al., 2011).

**10.6.1.b.ii. Alto peso molecular:** Suelen ser polisacáridos, proteínas, lipoproteínas, lipopolisacáridos o mezclas de estos polímeros. Estos biosurfactantes no son tan eficaces en cuanto a la reducción de la tensión superficial entre fases, pero si son buenos emulsionantes. Además se ha demostrado que son muy eficaces a bajas concentraciones y poseen una considerable afinidad por el sustrato. Un ejemplo sería Alasan producido por *Acinetobacter radioresistens* (Supaphol et al., 2011).

#### 10.6.1.c. **Carga iónica:**

**10.6.1.c.i. Agentes aniónicos:** Contiene generalmente uno de cuatro grupos polares solubles-carboxilato, sulfonato, sulfato o fosfato-combinado con una cadena hidrocarbonada hidrófoba. Si esa cadena es corta son muy hidrosolubles y en el caso contrario tendrán baja hidrosolubilidad y actuarán en sistemas no acuosos como aceites lubricantes. Se usan principalmente en la industria de jabones y detergentes (Supaphol et al., 2011).

**10.6.1.c.ii. Agentes catiónicos:** Están compuestos por una molécula lipofílica y otra hidrofílica, consistente de uno o varios grupos amonio terciarios o cuaternarios. Son utilizados comúnmente en detergentes, agentes limpiadores, líquido de lavaplatos,

tratamiento de textiles, como sustancias activas antimicrobianas y en cosmética (Supaphol et al., 2011).

**10.6.1.c.iii. Agentes no iónicos:** No se disocian en iones hidratados en medio acuoso. Las propiedades hidrofílicas son provistas por hidratación de grupos amido, amino, éter o hidroxilo (Supaphol et al., 2011).

**10.6.2. Utilización de los Biosurfactantes:** Se le ha dado una atención considerable a la producción de moléculas tensoactivas de origen biológico por sus aplicaciones en el procesado de alimentos, aromatización de bebidas alcohólicas, reciclaje de papel, fabricación de pulpa de papel, en farmacología, y la industria del aceite. En relación a esa última aplicación, los accidentes que llevan a vertidos de aceite han llegado a ser numerosos y han causado catástrofes tanto sociales como ecológicas. La habilidad de los biosurfactantes para emulsionar hidrocarburos mezclados con agua ha sido ampliamente divulgada. Estas propiedades emulsionantes también se ha demostrado que favorecen la degradación de los hidrocarburos en el medio ambiente, por tanto los hacen muy útiles para el control de la contaminación por vertidos de aceites (Singh et al., 2007).

En la biorremediación en vertidos de petróleo, estudios recientes han mostrado que se puede utilizar el poder solubilizante de las micelas para extraer ciertas sustancias contaminantes aun cuando su concentración sea extremadamente baja.

Las funciones que harían estos biosurfactantes a la hora de aumentar la biodisponibilidad serían:

- Dispersar el petróleo aumentando la superficie de contacto.
- Aumenta la biodisponibilidad de compuestos hidrofóbicos. Serían en este caso sobre todo los de bajo peso molecular.

- Poseen también funciones evolutivas para los propios microorganismos. Pueden ayudar a los microorganismos productores a desprenderse de las gotas de petróleo una vez se ha agotado la fuente de hidrocarburo que utilizaba. Hay que tener en cuenta que un microorganismos suele utilizar un solo tipo de hidrocarburo entre la mezcla que existe. Por eso les sería útil poderse desprender de estas interacciones hidrofóbicas que mantiene la membrana con la gota de petróleo, para así ir en busca de nuevas fuentes de carbono. Además deja una microcápsula alrededor de la gota para marcarla como usada, favoreciendo así a toda la población (Singh et al., 2007).

Una propiedad de los biosurfactantes curiosa es su actividad bactericida. Dicha actividad se debe a su capacidad detergente.

**10.6.3. Surfactantes Microbianos:** En algunos casos, los propios surfactantes juegan un papel natural en el crecimiento de las células microbianas sobre sustratos insolubles en agua. Los surfactantes extracelulares están implicados en la adhesión celular, emulsión, dispersión, floculación, agregación celular y fenómenos de desorción. Aunque el tipo y cantidad de surfactante microbiana producido depende primeramente del organismo productor, factores como el carbono y el nitrógeno, elementos traza, temperatura, y aireación, también afectan a su producción por el organismo (Makkar et al., 2011).

Existen varios biosurfactantes producidos por bacterias, entre ellos tenemos:

*Tabla 1. Microorganismos productores de surfactantes*

<b>MICROORGANISMO</b>	<b>BIOSURFACTANTE</b>
<i>Arthobacter RAG-1</i>	Hetropolisacáridos
<i>Arthobacter MIS38</i>	Lipopéptidos
<i>Arthobacter sp.</i>	Trehalosa, sacarosa, fructosa, lípidos
<i>Azotobacter chroococcum</i>	Lipopeptido
<i>Bacillus licheniformis JF-2</i>	Lipopéptidos
<i>Bacillus licheniformis 86</i>	Lipopéptidos
<i>Bacillus subtilis</i>	Surfactina
<i>Bacillus pumilus A1</i>	Surfactina
<i>Bacillus sp. C14</i>	Hidrocarbono-lípido-proteína
<i>Candida antarctica</i>	Manosilertritol lípidos
<i>Candida bombicola</i>	Soforolípidos
<i>Candida tropicalis</i>	Manan-ácido graso
<i>Candida lipolytica Y-917</i>	Sophorolípidos
<i>Clostridium pasteurianum</i>	Lípidos neutros
<i>Corynebacterium insidiosum</i>	Fosfolípidos
<i>Corynebacterium lepus</i>	Ácidos grasos
<b>Strain MMI</b>	Glucosa, lípidos y ácidos hidroxidecanoicos
<i>Nocardia erythropolis</i>	Lípidos neutros
<i>Ochrobactrum anthropii</i>	Proteínas
<i>Penicillium spiculisporum</i>	Ácido espiculospórico
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Ramnolípidos
<i>Pseudomona fluorescens</i>	Lipopéptidos
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Carbohidrato-lípido
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Trehalosa dicorinomicolato
<i>Rhodococcus sp. ST-5</i>	Glicolípidos
<i>Rhodococcus sp. H13-A</i>	Glicolípidos
<i>Rhodococcus sp. 33</i>	Polisacáridos

Fuente: Makkar et al. 2011, Kitamoto et al. 2002.

**10.6.4. Elaboración de formulados bacterianos:** A partir de un programa de aislamiento, selección y conservación de bacterias hidrocarbonoclastas (capaces de generar energía a partir de hidrocarburos y ejercen simbiosis con plantas) y productoras de sustancias tensoactivas se han formulado diferentes bioproductos para su aplicación en derrames de hidrocarburos, teniendo en cuenta que la extensión y diversidad taxonómica de los microorganismos representan un potencial para obtener productos naturales bioactivos que garanticen la conservación del medio ambiente (Makkar et al. 2011).

## **10.7. Identificación Bacteriana:**

**10.7.1. Aislamiento Bacteriano:** es la separación de un determinado microorganismo del resto que le acompañan. Este emplea técnicas microbiológicas para la transferencia de un microorganismo desde un ambiente a otro con la finalidad de inducir su crecimiento para su identificación (Madigan; 2004).

### **10.7.1.a. Técnicas de aislamiento:**

- Siembra por estría en placa de Petri
- Vaciado en placa
- Cultivo por dilución y agitación
- Aislamiento con varilla angular de vidrio (Drigalsky)
- Siembra por picadura

**10.7.1.b. Medios de cultivo:** En los medios de cultivo las bacterias se multiplican y es necesario esperar al menos 18-24 horas para visualizarlas. En términos generales todas las bacterias tienen unos requerimientos nutricionales imprescindibles para su crecimiento. Necesitan una fuente de energía, una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, algunas sales, oligoelementos y agua. Todos los medios de cultivo han de cumplir como mínimo con estos requisitos pero en

muchas ocasiones se necesitan además otras sustancias adicionales como vitaminas, factores o aminoácidos esenciales (Banwart; 1982).

#### **10.7.1.b.i. Requisitos de crecimiento:**

**10.7.1.b.i.1. Atmósfera:** las bacterias se clasifican en función de sus requerimientos atmosféricos:

- Aerobias estrictas, que crecen solo en presencia de oxígeno.
- Anaerobias estrictas, que solo crecen en ausencia de oxígeno.
- Facultativas, que crecen tanto en aerobiosis como en anaerobiosis.

**10.7.1.b.i.2. Temperatura:** Se clasifican además en función de la temperatura necesaria para su crecimiento:

- Psicofílicas, pueden crecer a bajas temperaturas entre 2-5°C (óptimo 10-30°C).
  - Mesofílicas, crecen a temperaturas entre 10- 45°C (óptimo 30-40°C).
  - Termofílicas, crecen muy poco a 37°C (óptimo 50-60°C).
- La mayoría de las bacterias encontradas en muestras clínicas son Mesofílicas.

**10.7.1.b.i.3. Nutrición:** El estudio de los requerimientos nutricionales de un microorganismo se usa en la identificación. Tal es el caso de la capacidad para crecer en medios ordinarios, o con la adicción de sangre, suero o glucosa (Banwart; 1982).

### 10.7.2. Características macroscópicas y microscópicas

**10.7.2.a. Microscópicas:** El estudio microscópico en fresco y tras tinción revela la forma, la manera de agruparse, la estructura de las células y su tamaño. Las tinciones son el primer paso para la identificación bacteriana.

Las tinciones más utilizadas e imprescindibles son la del azul de metileno y la de Gram. La tinción de Gram es, a menudo, la primera y única herramienta de la que nos servimos para hacer un diagnóstico provisional en el proceso de identificación de la mayoría de las bacterias teniendo en cuenta también el tipo de muestra y el diagnóstico presuntivo del proceso infeccioso (Bourgeois; 1994).

Estos son algunos de los términos utilizados para preparaciones teñidas:

- Tinción: uniforme, irregular, unipolar, bipolar, etc.
- Forma: cocos, bacilos, cocobacilos, filamentosos, bacilos curvos, etc.
- Cápsula: presente o ausente
- Tamaño: cortos, largos, etc.
- Bordes laterales: abultados, paralelos, cóncavos, irregulares
- Extremos: redondeados, puntiagudos
- Disposición: parejas, cadenas, tétradas, racimos, etc.

**10.7.2.b. Macroscópicas:** En este paso de la identificación es muy importante el aislamiento de las bacterias en cultivo puro ya que esta debería estar compuesta por un solo tipo de microorganismos y procedería de una única célula. Las colonias de una única especie, cuando crecen en medios específicos y bajo condiciones idóneas se describen por sus características de tamaño, forma, consistencia, y a veces por su color. La forma está determinada por los bordes y el

grosor de la colonia. El borde puede ser liso o rugoso e irregular; la colonia, abultada o plana. La textura de la colonia es también importante. Puede variar desde seca a viscosa, con superficie lisa o granular. Algunos microorganismos producen una colonia pigmentada, lo que puede ser de ayuda en el proceso de identificación (ejemplo: *Pseudomonas aeruginosa* (pigmento verde), *Serratia marcescens* (pigmento rojo) aunque en una misma especie puede haber cepas no pigmentadas (Bourgeois; 1994).

**10.7.3. Pruebas bioquímicas:** Las pruebas bioquímicas permiten determinar las características metabólicas de las bacterias objeto de identificación. Algunas de estas pruebas son técnicas rápidas, ya que evalúan la presencia de una enzima preformada y su lectura varía entre unos segundos hasta unas pocas horas. Otras pruebas requieren para su lectura el crecimiento del microorganismo con una incubación previa de 18 a 48h; a este grupo pertenecen la mayoría de las pruebas que detectan componentes metabólicos o aquellas que determinan la sensibilidad de un microorganismo a una sustancia dada tras cultivo en medios de identificación que contienen el sustrato a metabolizar (Wistreich; 1983).

**10.7.4. Métodos moleculares de identificación bacteriana:** Dados los problemas inherentes que presentan los sistemas de identificación fenotípicos (no todas las cepas de una misma especie muestran características homogéneas, una misma cepa puede generar diferentes patrones en ensayos repetidos y también las limitaciones en las bases de datos, entre otros), los métodos moleculares se han erigido como procedimientos complementarios, alternativos o incluso de referencia a los fenotípicos.

En la taxonomía bacteriana, el análisis de la secuencia génica del ARNr 16S es la herramienta más ampliamente utilizada. Este marcador *housekeeping* está presente en todas las bacterias.

El ARNr 16S además de ser útil para la detección de bacterias, proporciona información útil y rápida sobre su identificación y filogenia mediante la comparación con bases de datos públicos que contienen un amplio número de secuencias bacterianas. Así pues, la identificación mediante el ARNr 16S se fundamenta en su secuencia (Clarridge III JE. 2004).

**10.7.4.a. Extracción de DNA cromosómico:** El ADN genómico se extraerá a partir de las células totales mediante diferentes métodos estándar o sistemas comerciales con versatilidad sobre el tipo de muestra clínica o de matrices, en el caso de tratarse de una muestra alimentaria o ambiental. Dependiendo del tipo de bacteria se pueden aplicar modificaciones que simplifiquen u optimicen la extracción cromosómica (Clarridge III JE. 2004).

**10.7.4.b. PCR:** la reacción en cadena de la polimerasa - PCR (Polymerase Chain Reaction) es un técnica que permite mediante la amplificación (copiar muchas veces) identificar secuencias de ADN obtenido a partir de una región seleccionada del genoma, siempre y cuando se conozca una parte de su secuencia de nucleótidos (Kary B. Mullis 1983).

Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a ser duplicadas (Clarridge III JE. 2004).

**10.7.4.c. Amplificación:** En un termociclador, este ADN se utilizará como molde para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de una secuencia del ARNr 16S con un rango de tamaño entre 500-1.500 pb (o de otro tamaño si se analizan otros genes). Con cebadores universales o de amplio espectro complementarios a las regiones conservadas, se amplificaría teóricamente el gen del ARNr 16S en todas las bacterias. Ninguno de los cebadores utilizados en la actualidad se considera totalmente universal, por lo que no se puede realizar una recomendación específica de cebadores que garantice la amplificación de todos los procariotas (Clarridge III JE. 2004).

*(Figura 1) - Anexos*

**10.7.4.c.i. Ciclos de amplificación:** la PCR básica consta de un primer paso de calentamiento (94-95°C) durante 5-10 minutos, en el cuál se activa la ADN polimerasa, posteriormente tiene tres pasos que se repiten, la unión de esos tres pasos se denomina Ciclos de Amplificación, un ciclo consiste de:

- **Desnaturalización**, en primer lugar, se **desnaturaliza** el ADN (se separan las dos hebras de las cuales está constituido). Este paso puede realizarse de diferentes modos, siendo el calentamiento (94-95°C) de la muestra la forma más habitual. Otros métodos, raramente empleados, serían la adición de sales o agentes químicos capaces de realizar la desnaturalización.
- **Alineamiento - Unión del cebador**, a continuación se producirá la **hibridación del cebador**, es decir, el cebador se unirá a su secuencia complementaria en el ADN molde. Para esto es necesario que la temperatura descienda (generalmente, a 55°C, aunque se puede variar según sea el caso entre 45°C y

65°C). Estos cebadores actuarán como límites de la región de la molécula que va a ser amplificada.

- **Extensión de la cadena**, por último actúa la ADN polimerasa, tomando el ADN molde para **sintetizar la cadena complementaria** y partiendo del cebador como soporte inicial necesario para la síntesis de nuevo ADN. Se aumenta la temperatura hasta 72°C, temperatura a la cual la ADN polimerasa presenta su máximo de actividad, produciéndose una copia del fragmento que se desea amplificar (Janda JM 2007).

Este ciclo (desnaturalización-alineamiento-extensión) se repetirá un número de veces dependiente de la cantidad de fragmentos amplificados que se desee. Generalmente son 30 ciclos, ya que un número mucho mayor de ciclos no implica un mayor rendimiento.

**10.7.4.d. Electroforesis:** Para confirmar una amplificación óptima, es imprescindible la electroforesis del producto de PCR en gel de agarosa. Los amplicones suelen purificarse con sistemas comerciales, ya sea el producto de PCR o la banda de electroforesis incluida en el gel. Aunque estos sistemas eliminan el exceso de cebadores y nucleótidos, debe someterse a una nueva electroforesis de confirmación (Janda JM 2007).

**10.7.4.e. Análisis de secuencias:** La observación del electroferograma (secuencias de bases ofrecidas por los secuenciadores) constituye el primer paso del análisis de las secuencias. Algunas veces se producen errores entre el electroferograma y la secuencia; por ejemplo, asignación de dos T existiendo 3, o posiciones ambiguas (N).

Para resolver estas situaciones se reedita visualmente el electroferograma y se corrige, y/o se alinean y ensamblan las secuencias directa y reversa en una secuencia consenso. Solamente aquellas secuencias que presentan <1% de indeterminaciones (~15 posiciones N, purinas R, pirimidinas Y) se consideran para el análisis. En ocasiones se hace necesaria la repetición del ensayo debido a que el microorganismo inicial no se encontraba en cultivo puro, por baja concentración del extracto cromosómico o del producto de PCR, etc (Janda JM 2007).

A continuación, la secuencia consenso se introduce en bases de datos online de acceso público o privado, con el objetivo de identificar la cepa problema mediante la comparación con otras secuencias depositadas en estas bases. Actualmente, la base de datos que presenta mayor número de consultas por su mayor versatilidad en organismos, orígenes, genes, y tipo y número de secuencias depositadas es la base pública GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

**10.7.4.e.i. FASTA:** El formato FASTA es el formato más común de secuencia de ADN, ARN y Proteínas. Es un formato de sólo texto (se puede escribir o leer en un bloc de notas).

Hay unas líneas de descripción y unas líneas donde esta nuestra secuencia. La secuencia máxima de las líneas del formato FASTA es de 80 caracteres de longitud, es decir que cuando llegamos a 80 se empieza una nueva línea.

Sí la secuencia es de nucleótidos el formato permite los siguientes símbolos:

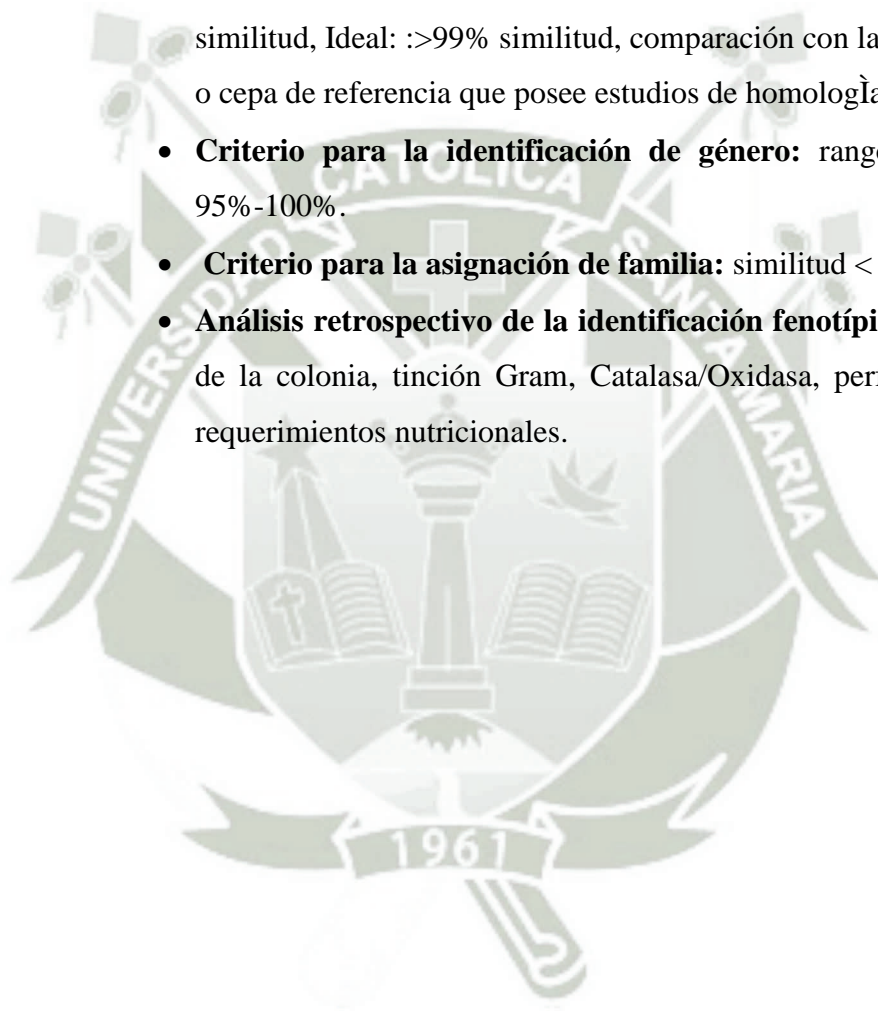
Símbolo	Significado
• A	Adenina
• C	Citosina
• G	Guanina
• T	Timina
• U	Uracilo
• R	Purina
• Y	Pirimidina
• K	G o T
• N	A, C, G o T
• -	Hueco

**10.7.4.e.ii. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool):** es un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN, ARN o de proteínas. El programa es capaz de comparar una secuencia problema (también denominada en la literatura secuencia query) contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren en una base de datos.

En la primera sección aparece un gráfico que indica el nivel y el tamaño de los fragmentos alineados, seguido de un listado en orden decreciente de las secuencias de microorganismos con los que se muestra la identidad (% de coincidencia). En la siguiente sección, aparece cada alineamiento de la secuencia problema o query frente a cada secuencia de otro microorganismo, indicando el número y porcentaje de bases idénticas (identity).

Se debe seguir las siguientes recomendaciones para el análisis:

- **Cepas a secuenciar:** cepas con escasa descripción, cepas con baja frecuencia de aislamiento, cepas con fenotipos atípicos, cepas de difícil identificación fenotípica, bacterias de difícil cultivo.
- **Análisis del ARNr 16S:** Mínimo: >98,5% similitud, Ideal: 1.300 a 1.500 pb secuenciadas.
- **Criterio para la identificación de especie:** mínimo: >98,5% similitud, Ideal: >99% similitud, comparación con la secuencia tipo o cepa de referencia que posee estudios de homología de ADN.
- **Criterio para la identificación de género:** rango de similitud 95%-100%.
- **Criterio para la asignación de familia:** similitud < 95%.
- **Análisis retrospectivo de la identificación fenotípica:** morfología de la colonia, tinción Gram, Catalasa/Oxidasa, perfil bioquímico, requerimientos nutricionales.



## CAPÍTULO III

### 11. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 11.1. MATERIALES

Materiales de vidrio:

- Tubos de ensayo
- Matraces Erlenmeyer (250, 500ml)
- Pipetas (1, 5, 10ml)
- Probetas (10, 20, 200ml)

Equipos:

- Microscopio
- Incubadora
- Centrifuga
- Agitador Magnético
- Revelador de Geles
- Termociclador
- Espectrofotómetro
- Vortex

Otros:

- Mortero
- Mecheros Bunsen
- Tubos Falcon (20ml)
- Placas Petri
- Cámara de electroforesis
- Autoclave
- Tips

Materiales Químicos:

- Medio Agar Nutritivo
- Medio Agar Pseudomona

- Medio Caldo Nutritivo
- MEDIO MINERAL
- Medio Caldo MSM (Extracto de levadura 0.4%)
- Agarosa
- Buffer TE 0.5X
- Kit para extracción de DNA
- Kit de PCR

## 11.2. MÉTODOS

Para esta investigación se llevó a cabo el método científico-experimental, habiendo seguido el procedimiento que se detalla a continuación:

### 11.2.1. Toma de muestra:

Para la toma de muestra se siguió el protocolo de muestreo del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA-Argentina).

Primeramente se ejecutó un reconocimiento de la zona denominada “Laguna La Escondida, Reynosa Tamaulipas”, ubicada a la salida de Reynosa con dirección a Matamoros, esto se efectuó gracias a los antecedentes a los cuales hacen referencia los reportes informativos sobre derrames de petróleo de la empresa PEMEX en esta zona. Debido a las condiciones climáticas con una elevada temperatura con un máximo de 45°C, y un mínimo de 25°C el suelo presentaba grandes agrietaciones en su superficie, se dispuso exactamente de esta zona debido a sus condiciones y la clara coloración del suelo la cual se mostró más oscura con características arcillosas, se tomaron muestras dentro de un sistema de diagonales con 5X5 para cada línea trazada, gracias a la homogeneidad topográfica en toda esta zona los puntos tomados fueron dos, el central y el diagonal con respecto a la laguna, donde es que se señala la mayor cantidad de vertimiento.

Como referencia central al Parque Cultural de Reynosa, ejecutándose el muestreo en 2 puntos diferentes dentro del área ya señalada:

- Central (cruce de líneas diagonales)
- Diagonal derecha (frente a la laguna)

Las muestras colectadas fueron simples, ya que no existía variaciones entre las zonas de muestreo, este se efectuó en los tres niveles respectivos: superficie, medio y profundidad, a 5 cm, 10 cm y 20 cm respectivamente para cada uno de los puntos de muestreo señalados (IAPAR, 1996). **(Figura 2)- Anexos**

Los tubos de colección de muestra fueron rotulados como: 1A, 2A, 3A, 1B, 2B, 3B; en base a las profundidades, siendo 1 para el nivel superficial, 2 para el nivel medio y 3 referente al nivel profundo; en donde A corresponde a la zona central del muestreo y B corresponde a la esquina derecha de la diagonal frente a la laguna.

#### **11.2.2. Procesamiento de la muestra:**

Contando ya con las muestras completamente secas, se procedió a triturarlas en un mortero hasta obtener una completa homogeneidad en las mismas.

Se pesó 1 g de cada una de las muestras debidamente rotuladas. **(Figura 3)- Anexos**

#### **11.2.3. Primera inoculación:**

Se preparó 600 ml de medio MSM (Medio Mineral Salino) descrito por Volpon (1992), y se llevó el pH hasta 7.0 empleando NaOH teniendo en cuenta que se debe esterilizar a 121°C por 15' y no se debe exceder en el tiempo de esterilización debido a la degradación de las sales que contiene.

**Tabla2. Composición de medio MSM (Medio Mineral Salino)**

<b>Composición medio MSM</b>	
NaCl	14.4g/l
KCl	0.42g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2g/l
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.6g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.8g/l
CaCl . 2H <sub>2</sub> O	0.12/l
H <sub>2</sub> O Destilada	600ml
pH final	7.0

A este medio (MSM) no se le agregó concentraciones de Diesel, y se distribuyó 100 ml del medio a cada matraz Erlenmeyer de 250 ml. Se procedió a inocular 1g de la muestra previamente pesada y triturada, llevando las 6 muestras a incubación en shaker a 37°C a 200 rpm por 72 h (Seldin et al. 1983).

Al cabo de las 72 h, se retiraron los inóculos para evaluar el posible crecimiento, en esta primera inoculación se emplearon tinciones como azul de coomassie y gram para poder determinar la presencia bacteriana y la morfología que presentaron estas bacterias.

Paralelamente se hizo una siembra adicional en placa en dos medios distintos los cuales fueron agar Nutritivo y Pseudomona como una prueba adicional de crecimiento, para lo cual se preparó una dilución  $1 \times 10^3$  en agua destilada previamente esterilizada, a partir de las muestras trituradas. De estas diluciones, se efectuó siembras en placas con agar Nutritivo y Pseudomona, empleando el primer medio debido a su capacidad para facilitar el crecimiento bacteriano y poder ir aislando las colonias presentes, el segundo medio se empleó como una guía directa de la posible existencia de *Pseudomona*, ya que es ésta la bacteria con mayor referencia bibliográfica en actividad biodegradadora de hidrocarburos (Mackey A, Hodgkinson M. 1996).

#### **11.2.4. Segunda inoculación, primera siembra:**

De la primera inoculación se tomó 1ml para ser nuevamente incubados en medio caldo nutritivo para facilitar el crecimiento y se llevó al shaker por 72 h a 150 rpm a 30°C.

De estos mismos inóculos al cabo de las 72 h de incubación se tomó 100 ul para sembrar con asa de Drigalsky en placas con Agar Pseudomona y de igual manera efectuar tinciones para relacionar morfología en las mismas, siendo estas placas debidamente rotuladas con el nombre correspondiente a las zonas de muestreo (1A, 2A, 3A, 1B, 2B, 3B).

Habiendo ya, una relación morfológica según tamaño, forma, y tinción de gram; se procedió al aislamiento de cada una de las colonias presentes en las placas, para el respectivo repique bacteriano y completo aislamiento, de modo que no se obtuviese colonias contaminadas entre sí sino colonias puras, es a partir de esto que se genera una nueva disposición en la rotulación de las mismas con la terminología “C”, referente a cepa (lo cual indica la pureza de la colonia), y la numeración respectiva desde 1 al 14 en base a como se las fue aislando.

#### **11.2.5. Caracterización Molecular de la secuencia rRNA16s a partir de DNA genómico bacteriano:**

##### **11.2.5.a. Extracción y cuantificación de DNA genómico bacteriano:**

Para la extracción de DNA se utilizó el protocolo del Kit Promega Extracción de DNA, (la suspensión final fue en 25 ul) (*Tabla 3 - Anexos*). Se cargó y corrió las muestras en gel de agarosa 1% por 45' a 80v en cámara electroforética horizontal, posterior a esto se reveló el gel (Thompson et al. 1997).

Habiendo determinado la presencia de bandas de DNA, se procedió a ejecutar una cuantificación del DNA empleando el espectrofotómetro NanoDrop2000, el cual permite medir la concentración y pureza de las muestras de DNA, requiriendo únicamente 0.5 ul de la muestra.

A partir de esto se determinó los volúmenes que se emplearían en la PCR para la caracterización.

#### 11.2.5.b. Preparación del Mix de PCR:

Se trabajó con la PCR básica, para esto se preparó el Mix para PCR en cámara de flujo laminar a condiciones estériles para evitar contaminaciones, para esta preparación se empleó los cálculos de concentración en base a la  $ABS_{260}$  de las muestras de DNA, se usaron primers generales rRNA16S descrito por Massol-Deya et al. (1995) para bacterias. Llevando cada muestra un volumen final de 25 ul, y generando un stock final para facilitar la mezcla de los reactivos y la homogénea distribución para cada muestra.

*Tabla4. Preparación del mix para PCR.*

	Concentración PCR	1X Conc. final	Volumen final por cada muestra	Vol. Final (14 muestras, C(-), B)
<b>Buffer</b>	5 X	1 X	5 ul	80 ul
<b>Dntp's</b>	10 mM	0.2 mM	0.5 ul	8 ul
<b>Primer F</b>	5 uM	0.2 uM	1 ul	16 ul
<b>Primer R</b>	5 uM	0.2 uM	1 ul	16 ul
<b>Go taq</b>	5 ug/ml	1.25 ug/ml	0.25 ul	4 ul
<b>H<sub>2</sub>O</b>	-	-	16.25 ul	260 ul
<b>DNA</b>	-	-	1 ul	-
			<b>25 ul</b>	

Se llevó las muestras al Termociclador con el siguiente programa de tiempos y temperatura:

- 94°C 5' → 1 ciclo
- 94°C 1:25' } 35 ciclos
- 55°C 1:30' }
- 72°C 1' }
- 72°C 7' → 1 ciclo
- 10°C ∞ → 1 ciclo

Culminado el tiempo estimado, se corrió las muestras en gel de agarosa al 2% en voltaje de 80v por 1:30' para detectar una correcta presencia de producto de PCR.

#### 11.2.5.c. Secuenciación:

Se purificó el producto de PCR, para esto se utilizó el kit de purificación EXO-SAP® clean up, que permite eliminar todo aquello que no se amplificó como dNTP's, primers, etc.

Se agregó 2 ul del EXO-SAP + 5 ul del producto obtenido de la PCR, esto se llevó nuevamente al termociclador con el programa EXO-SAP a 37°C por 15', 80°C por 15' y finalmente 10°C/∞.

*\*El protocolo del Kit, señala emplear 5 ul del producto de PCR (templado) para la reacción de secuenciación; sin embargo nos guiamos del protocolo estándar del laboratorio y se empleó 1ul del producto de PCR. Cada muestra se llevó a un volumen final de 20 ul, y de igual manera se generó un stock tanto para los primers de F y R 16S.*

**Tabla5. Preparación del mix para secuenciación bajo el protocolo del Kit Exo-Sap**

Reacción de secuenciación	1X	Vol. final (stock)	1X	Vol. Final (stock)
<b>Concentración</b>	1 X	14 X	1 X	14 X
<b>Buffer BD</b>	4 ul	56 ul	4 ul	56 ul
<b>H<sub>2</sub>O</b>	10 ul	140 ul	10 ul	140 ul
<b>Primer F 16S</b>	1 ul	14 ul	-	-
<b>Primer R 16S</b>	-	-	1 ul	14 ul
<b>Big Dye</b>	4 ul	56 ul	4 ul	56 ul
<b>Templado (producto de Exo-sap)</b>	1 ul	-	1 ul	-
	20ul	19 ul/ tubo	20 ul	19 ul/tubo

Se llevó las muestras al Termociclador con el siguiente programa de tiempos y temperatura:

- 96°C    1' → 1 ciclo
- 96°C    10''
- 55°C    5''
- 62°C    4'    } 25 ciclos

Pasado el tiempo indicado por el termociclador se purificó el producto con el Kit BigDye X-terminator®, con el cual se prepara una reacción empleando los siguientes volúmenes:

- SAM'S:                    45 ul
- X-Term:                    10 ul
- Producto de termociclador: 10 ul

*\* Se debe tener en cuenta que el uso de 10 ul de cada tubo con producto del Kit Exo-Sap, debe ser distinto para los nuevos tubos rotulados con Forward y Reverse, ya que en el equipo de secuenciación deben ingresarse como muestras separadas.*

Se incubó a 25°C por 30' y se centrifugó a 13000 rpm por 2', finalmente se tomó el sobrenadante y se llevó las muestras para la secuenciación en el Laboratorio de Secuenciación y Cromatografía del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, Reynosa- México.

#### **11.2.5.d. Identificación:**

De la secuenciación realizada se obtuvo diferentes secuencias según las muestras; para ejecutar el análisis de las secuencias se empleó el programa para alineamiento de secuencias Chromas Lite 2.0.1, en este es posible aperturar la secuencia proveída por parte del Laboratorio de Secuenciación y Cromatografía del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, Reynosa- México.

Este programa al aperturar el cromatograma de DNA, nos permitió en primer lugar efectuar algunas correcciones de posibles interferencias en la secuenciación en donde se hayan suplantado aminoácidos por N o K, posterior a esto se exportó a un cuadro de texto la secuencia FASTA obtenida tanto para Foward y Reverse.

Al ya haber generado ambas secuencias complementarias de cadena, se ingresa al portal de NCBI, para dirigirnos a la opción de BLAST donde este programa generó el alineamiento de las secuencias y la respectiva comparación con la base de datos presentes en GenBank del NCBI.

BLAST, directamente ejecutó la comparación filogenética en su banco de datos de lo cual obtuvimos el porcentaje de homología e identidad a partir del cual se elaboró una tabla señalando los nombres de cada una de nuestras muestras.

#### **11.2.6. Amplificación del Gen AlkB con primers 27F y 519R:**

Se preparó un nuevo Mix para PCR de las muestras de DNA ya identificadas y refrigeradas, para evitar la presencia de inhibidores propios del DNA se ejecutó una dilución 1/10 para cada una, adicionalmente se tomó en cuenta el control negativo y el blanco para la preparación del stock en el Mix. Este nuevo Mix se preparó utilizando los primers específicos 27F y 519R reportados por Akio Ueno, 2007, que codifican al gen AlkB en bacterias que no son del género *Pseudomona*.

#### **11.2.7. Amplificación del Gen AlkB con primers PPalKBF y PPalKBR:**

Adicionalmente se preparó otro juego de MIX para PCR, empleando los primers PPalKBF y PPalKBR, específicos para *Pseudomona aeruginosa* (Akio Ueno, 2007) que también codifican para este gen (AlkB); sin embargo, estos primers únicamente se amplifican en presencia de esta especie bacteriana dentro del

género de *Pseudomonas sp.*, de lo cual permitió descartar la presencia o ausencia de este género bacteriano.

En ambos casos de la amplificación, los volúmenes finales fueron de 25 ul.

**Tabla6. Preparación del mix para PCR con Primers específicos**

	<b>Conc. PCR</b>	<b>1X Conc. Final</b>	<b>Volumen final</b>	<b>Vol. Final (14 muestras, C(-), B)</b>
<b>Buffer</b>	5 X	1 X	5 ul	80 ul
<b>Dntp's</b>	10 mM	0.2 mM	0.5 ul	8 ul
<b>Primer 27F</b>	5 uM	0.2 uM	1 ul	16 ul
<b>Primer 519R</b>	5 uM	0.2 uM	1 ul	16 ul
<b>Go taq</b>	5 ug/ml	1.25 ug/ml	0.25 ul	4 ul
<b>H<sub>2</sub>O</b>	-	-	16.25 ul	264 ul
<b>DNA</b>	-	-	1 ul	-
			25 ul	

Se llevó las muestras al Termociclador con el siguiente programa de tiempos y temperatura, diseñado y reportado por Nippon Gene, Tokyo, Japan para estos primers:

- 94°C    1' → 1 ciclo
- 94°C    1'    } 30 ciclos
- 60°C    1'    }
- 72°C    1'    }
- 72°C    3' → 1 ciclo

Posterior a la identificación y la corroboración de la presencia de nuestro gen de interés se procedió a seleccionar aquellos aislados con mayor cantidad de reportes publicados señalando su capacidad biodegradadora con respecto a los hidrocarburos, para comenzar la etapa de pruebas en distintas concentraciones de Diesel.

### 11.2.8. Selección de cepas identificadas:

A partir de los resultados obtenidos desde la primera inoculación, siembra en placa, capacidad de crecimiento, identificación, respuesta ante los primers específicos para el gen AlkB y la bibliografía reportada por algunos autores, se decidió seleccionar 5 cepas (C1, C4, C7, C13, C14), para ejecutar las pruebas de crecimiento en distintas concentraciones de aceite diesel.

#### 11.2.8.a. Pruebas de crecimiento en medio MSM a diferentes concentraciones de aceite diesel:

Para conocer si las cepas ya aisladas, identificadas y seleccionadas poseían capacidad de crecer en un medio con presencia de hidrocarburos como única fuente de carbono, se probó el crecimiento en agar MSM con aceite Diesel al 1%, glicerol al 2% y medio MSM sin glicerol (Alexander, M. 1999), en placas Petri a 37°C dispuestas de la siguiente manera:

- **Las cepas C1, C4, C7, C13, C14**, sembradas en placa con agar MSM al cual se le agregó aceite Diesel al 1%, efectuando estría simple para la siembra.
- **Las cepas C1, C4, C7, C13, C14**, sembradas en placa con agar MSM al cual se le agregó glicerol al 2%, efectuando estría simple para la siembra.
- **Las cepas C1, C4, C7, C13, C14**, sembradas en placa con agar MSM sin adición de aceite diesel ni glicerol, efectuando estría simple para la siembra.

Bibliografía reportada señala una composición diferida del medio MSM, al cual según ésta se le agrega extracto de levadura al 0.4% para potenciar el crecimiento bacteriano y facilitar la adaptación a este medio salino (AL-Saleh E, Drobiova H, Obuekwe C. 2009).

Se preparó 500 ml de medio MSM ALTERNATIVO (0.4% de extracto de levadura) sin Diesel, los cuales fueron distribuidos en 5 matraces de 250 ml, se esterilizaron y se inocularon con las diferentes cepas, se incubaron a 200 rpm a 37°C, para evaluarlos a las 48 h posteriores.

Nuevamente se preparó 500 ml de caldo MSM (NO ALTERNATIVO) sin adición de extracto de levadura con una concentración de aceite diesel de 1%, los que se distribuyeron en 5 matraces de 250 ml, a estos mismos matraces se les adicionó 1 ml del inóculo anterior (MSM ALTERNATIVO) el cual como se mencionó ya había sido incubado por 48hrs a 200 rpm a 37°C y se llevó estos medios nuevamente al shaker por 72 h para una nueva incubación.

Recordando que antes de esta nueva inoculación, se tomó una alícuota de 1ml del medio esterilizado para un control de blanco al momento de leer las absorbancias.

A partir de esto, es que se generó la siguiente distribución de matraces de 250 ml con 100 ml de medio MSM, pre-inóculo de 48 h y 1% en concentraciones de aceite Diesel para cada una de las cepas (C1, C4, C7, C13, C14).

- **Para C1:** caldo MSM + pre-inóculo de 48 h (correspondiente a C1) + 1% en concentraciones de aceite Diesel.
- **Para C4:** caldo MSM + pre-inóculo de 48 h (correspondiente a C4) + 1% en concentraciones de aceite Diesel.
- **Para C7:** caldo MSM + pre-inóculo de 48 h (correspondiente a C7) + 1% en concentraciones de aceite Diesel.
- **Para C13:** caldo MSM + pre-inóculo de 48 h (correspondiente a C13) + 1% en concentraciones de aceite Diesel.
- **Para C14:** caldo MSM + pre-inóculo de 48 h (correspondiente a C14) + 1% en concentraciones de aceite Diesel.

Paralelamente se optó por preparar inóculos con 20 ml de medio de cultivo cada uno, empleando medio MSM ALTERNATIVO (suplementado con extracto de levadura al 0.4%) a diferentes concentraciones de aceite diesel (1%, 2% y 4%), se tomó 1 ml de los inóculos previamente activados por 48hrs (en MSM ALTERNATIVO) y se dispuso a incubar los mismos en el shaker a 200 rpm a 37°C, de los cuales se leyó las absorbancias a partir de las 72 h posteriores a la inoculación. Así mismo se tomó 1 ml de cada medio MSM ALTERNATIVO ya esterilizado a diferente concentración de diesel antes de inocular, para contar con el respectivo blanco para la posterior lectura de absorbancias.

Por tanto se tuvo una disposición de la siguiente manera, en la cual se ha obviado emplear a la cepa C1, esto se debió a la ausencia de crecimiento en la incubación anterior y en la siembra en placa:

**Tabla7. Distribución de tubos de ensayo con 20 ml de medio MSM Alternativo  
(extracto de levadura 0.4%)**

<b>Cepa</b>	<b>Medio de cultivo</b>	<b>Concentraciones de aceite Diesel</b>		
<b>C4</b>	Caldo MSM + Extracto de levadura 0.4% + 1 ml (inóculo pre-incubado)	1%	2%	4%
<b>C7</b>	Caldo MSM + Extracto de levadura 0.4% + 1 ml (inóculo pre-incubado)	1%	2%	4%
<b>C13</b>	Caldo MSM + Extracto de levadura 0.4% + 1 ml (inóculo pre-incubado)	1%	2%	4%
<b>C14</b>	Caldo MSM + Extracto de levadura 0.4% + 1 ml (inóculo pre-incubado)	1%	2%	4%

Como se aprecia claramente en la tabla, para esta prueba de crecimiento con diferentes concentraciones se empleó el pre-inóculo de 48 h respectivo para cada cepa bacteriana y se adicionó 1%, 2%, 4% de aceite Diesel.

Al quinto día de incubación de estos medios, debido a las concentraciones de absorbancia y las variaciones en las curvas de crecimiento, se generó una nueva disposición para evaluar crecimiento bacteriano a mayores concentraciones de aceite diesel, para lo cual se tomó nuevamente 1 ml de los mismos inóculos activados a 48 h (en MSM ALTERNATIVO) para ser nuevamente inoculado en medio caldo MSM + Extracto de levadura 0.4% a concentraciones de 6% y 8%, llevando estos nuevos medios a incubación a 200 rpm a 37°C, para lo cual se monitorizó el crecimiento desde el día cero. Por lo tanto se obtuvo una tabla adicional:

*Tabla 8. Distribución de tubos de ensayo con 20 ml de medio MSM Alternativo (extracto de levadura 0.4%)*

Cepa	Medio de cultivo	Concentración de aceite Diesel	
		6%	8%
<b>C4</b>	Caldo MSM + Extracto de levadura 0.4% + 1 ml (inóculo pre-incubado)	6%	8%
<b>C7</b>	Caldo MSM + Extracto de levadura 0.4% + 1 ml (inóculo pre-incubado)	6%	8%
<b>C13</b>	Caldo MSM + Extracto de levadura 0.4% + 1 ml (inóculo pre-incubado)	6%	8%
<b>C14</b>	Caldo MSM + Extracto de levadura 0.4% + 1 ml (inóculo pre-incubado)	6%	8%

Como se aprecia claramente en la tabla, para esta prueba de crecimiento con mayores concentraciones se empleó el pre-inóculo de 48 h respectivo para cada cepa bacteriana y se adicionó 6% y 8%, de aceite Diesel.

Las ABS fueron tomadas por días continuamente, a partir de las cuales se generó gráficos para evaluar las curvas de crecimiento según las diferentes concentraciones de aceite diesel, hasta 10 días de incubación.

Como se apreció variaciones en el crecimiento, de cada cepa, se tomó una alícuota de 1 ml/ tubo/ día, la cual fue rotulada y refrigerada a 4°C para conservar el cultivo que presentase una lectura más elevada en crecimiento bacteriano (ABS), de tal forma que esto permitiera emplear esta alícuota en una posterior inoculación, ya que la bibliografía señala que mientras mayor adaptación al medio se ejerza por parte de las bacterias, es mayor su eficiencia biodegradadora (Bacosa H, Suto K, Inoue C., 2010).

Así mismo se optó por evaluar la capacidad de crecimiento en caldo MSM alternativo, al cual se le disminuyó la concentración de extracto de levadura hasta el 0.1%, esto con la finalidad de hacer más efectivo el uso de los carbonos del hidrocarburo como fuente de energía para el crecimiento celular y de limitar a la bacteria en el uso de otras fuentes de energía como venía siendo el extracto de levadura brindado en pequeñas concentraciones.

Se preparó, en tanto, **caldo MSM alternativo** (*únicamente con 0.1% de extracto de levadura*), el cual se distribuyó en 4 matraces de 250 ml, en cada uno se agregó aceite diesel al 1% y se inoculó con 1 ml de los pre-inóculos refrigerados que señalaban la más alta absorbancia en diferidos días para cada cepa respectiva, es a partir de esto que se generó la siguiente disposición:

*Tabla9. Distribución de matraces de 250 ml con 100 ml de medio MSM Alternativo  
(extracto de levadura 0.1%)*

<b>Cepa</b>	<b>Medio de cultivo</b>	<b>Concentración de aceite Diesel</b>
<b>C4</b>	Caldo MSM + Extracto de levadura 0.1% + 1 ml (inóculo pre-incubado 8%)	1%
<b>C7</b>	Caldo MSM + Extracto de levadura 0.1% + 1 ml (inóculo pre-incubado 6%)	1%
<b>C13</b>	Caldo MSM + Extracto de levadura 0.1% + 1 ml (inóculo pre-incubado 6%)	1%
<b>C14</b>	Caldo MSM + Extracto de levadura 0.1% + 1 ml (inóculo pre-incubado 4%)	1%

Como se aprecia claramente en la tabla, para esta prueba de crecimiento se agregó el pre-inóculo con más alta ABS registrada con anterioridad y 1% en concentraciones de aceite Diesel.

#### **11.2.9. Determinación de actividad emulsificante de las bacterias identificadas:**

Se realizó según la metodología propuesta por Goldman y col. (1982). Se procesó las 4 cepas con notable crecimiento de los cultivos efectuados con anterioridad, esto para evaluar la capacidad que tienen estas bacterias de producir emulsificantes de petróleo, en nuestro caso lo que vendría a ser el aceite diesel derivado de petróleo.

Para esto se empleó el Medio Mínimo Goldman, al cual se le adiciona 3% de extracto de levadura P/V, se utilizó aceite diesel derivado de petróleo. Se esterilizó el medio a 121°C por 15', excepto el etanol, el cual fue agregado posteriormente en condiciones de esterilidad.

*Tabla10. Composición de Medio Mínimo Goldman, suplementado con extracto de levadura 3%*

<b>Medio Mínimo Goldman</b>	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	18 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6 g
MgSO <sub>4</sub>	0.02 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4 g
Etanol	20 ml
Agua destilada	980 ml
Extracto de levadura	3%

Los aislados bacterianos se reactivaron en 5 ml de caldo nutritivo y se les incubó a 37°C por 24 h.

En matraces de 100 ml se agregó 18 ml de Medio Mínimo Goldman con extracto de levadura al 3%. Posteriormente se agregó 2 ml de los inóculos activados a las 24 h a cada matraz, estos fueron incubados a 30°C por 72 h a 150 rpm.

Se procedió a centrifugar el cultivo a 5000 rpm por 30 minutos. Para esto se tomó 10 ml del sobrenadante en tubos Falcon de 20 ml, a cada tubo con el sobrenadante se le adicionó 0.2 ml de aceite diesel derivado de petróleo y se agitó por 5 minutos con ayuda de un vortex a fin de facilitar la producción de una emulsión.

Se leyó las absorbancias a 540 nm en el espectrofotómetro, tomando medio mínimo sin inoculación como blanco. La absorbancia leídas se convirtieron en unidades de actividad emulsificante por mililitro (UAE/ml), siendo 0.816 de absorbancia equivalente a una unidad de actividad emulsificante por mililitro.



## CAPÍTULO IV

### 12. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 12.1. Toma de muestra:

De la toma de muestra determinada por zonas se procesó la muestra homogéneamente, para lo cual el resultado de homogeneidad para emplearlo en la inoculación posterior coincide con el muestreo y procesamiento de muestra referido por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA-Argentina).

#### 12.2. Primera inoculación:

Como un primer resultado visual, claramente se apreció el crecimiento debido a la presencia de turbidez en el medio de cultivo MSM.

Al ejecutar la tinción con azul de Coomassie se apreció cristales los cuales podían ser propios del medio debido a la gran cantidad de sales que lo componían, esto no permitió una clara visión en las muestras 1A, 2A, 1B.

A diferencia de las muestras ya mencionadas, en el caso de 3A, 2B, 3B, fueron muestras donde además de los cristales de las sales propias del medio se apreció cúmulos bacterianos teñidos, con forma bacilar. (*Figura 4)- Anexos*

Estos resultados coinciden con lo dicho por *Ueno et al. (2006a, b)*, quien en su investigación señala de igual forma una pequeña obstrucción visual en el microscopio de sus muestras en fresco.

Para descartar que existiese únicamente la presencia de cristales se procedió a efectuar tinción de gram, coincidiendo así con la bibliografía previamente revisada y sugerida por *Gómez et al., (2006)*. En la tinción de gram se aprecia microorganismos los cuales estuvieron poco señalizados debido a la gran presencia de las sales del medio, pero pudo divisarse claramente microorganismos gram (-) como gram (+).

Los resultados de esta investigación señalan importante considerar que se asemejan a lo expuesto por *Ruberto et al.*, (2003) y *Narváez*, (2006), quienes reportaron que el grupo predominante en los aislamientos fueron los bacilos Gram negativos.

### 12.3. Segunda Inoculación, primera Siembra:

De la segunda inoculación efectuada las muestras 1A y 1B no generaron crecimiento alguno ni mostraron una notoria tinción de gram, por lo cual se pudo elaborar la siguiente tabla:

**Tabla 11. Comparación de crecimiento bacteriano a partir de caldo MSM**

<b>Colonias</b>	<b>Agar Pseudomona</b>		<b>Agar Nutritivo</b>
1A	-	-	-
2A	-	-	✓
3A	✓	-	✓
1B	-	-	-
2B	✓	-	✓
3B	✓	-	✓
<b>Colonias</b>	<b>Gram (+)</b>	<b>Gram (-)</b>	<b>Forma</b>
1A	-	-	-
2A	✓	-	BACILOS (mediano)
3A	✓	-	BACILOS (borde circular)
1B	-	-	-
2B	-	✓	BACILOS (cortos y pequeños)
3B	-	✓	BACILOS (cortos y pequeños)

La tabla mostrada señala únicamente resultados en 2A, 3A, 2B, 3B, puesto que como ya se mencionó, en las muestras de superficie (1A y 1B) no existió crecimiento, de modo que se puede inferir que tanto a nivel medio como profundidad, se puede encontrar aislados bacterianos capaces de vivir en un medio contaminado con hidrocarburos. Como señalan *S. Barathi*, *N. Vasudevan*, (2001), la población bacteriana se define en base a las condiciones climatológicas

y la buena adaptación al mismo, adicionalmente que coinciden con la presente, en resaltar que su capacidad de crecimiento es en base a los hidrocarburos presentes en el suelo.

Del mismo modo sabemos que no todas las bacterias son capaces de desarrollarse en medios con altas temperaturas (hasta 45°C) o cambios climáticos extremos, como una baja hasta 2°C, siendo estas características una de las cuales razones se encuentra mayor población bacteriana en profundidad, siendo el suelo un factor que les permita tener mayor estabilidad, además de brindarles sustratos.

### **12.3.1. Crecimiento:**

De las placas sembradas con muestras 1A, 2A, 1B, no hubo crecimiento en agar Pseudomona, lo cual hizo especular con respecto a que no se contaría con bacterias capaces de crecer en un medio oleoso, sin embargo en el agar nutritivo se muestra notoriamente la presencia de levaduras.

A diferencia de las 3 primeras muestras, tanto 3A, 2B y 3B, presentaron crecimiento en ambos medios. Las colonias apreciadas a simple vista parecen uniformes, por lo cual se procedió a marcar las placas para efectuar tinción de gram a cada una de ellas. Coincidiendo con *Y.J. Chang, J.R. Stephen, (2000)*, se encuentra gran similitud con el método de aislamiento e identificación, para lo cual ellos emplearon un medio salino (BH) con una composición similar al usado en esta investigación para su crecimiento, posterior a esto para su identificación no emplearon medios sólidos para evaluar crecimiento, por el contrario se limitaron a emplear PCR e identificar mediante oligos 16S rRNA.

Se marcó 14 colonias presuntamente diferentes entre las placas, marcadas como C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14.

- Las cepas C1, C2, C3 provienen de la zona de muestreo 2A, la cual representa al punto central medio con respecto a la profundidad.

- Las cepas C4, C5, C6, C7 se aislaron de la zona de muestra 3A, la cual representa el punto central en profundidad.
- Las cepas C8 y C9, se aislaron de la zona de muestreo 2B, correspondiente a la diagonal derecha, con una profundidad media.
- Finalmente las cepas C10, C11, C12, C13 y C14, se aislaron de la zona 3B, perteneciente a la diagonal derecha a profundidad.

A partir de este aislamiento se obtuvo los siguientes resultados:

- C6, C10, mostraron estructura globular encapsulada, gram (-), sin definición morfológica clara. (**Figura 5**) – *Anexo*
- C2, C4, C8, C12, C13, a la vista microscópica, se muestra colonias gram (+), bacilares, hinchadas con formación de esporas. (**Figura 6**) – *Anexo*
- C1, C3, C5, C7, C9, C10, C11, C14 bacilos cortos y medianos gram (-), los cuales podrían especularse con una estructura similar a *Pseudomona*. (**Figura 7**) - *Anexo*

En este resultado según la evaluación morfológica, notamos una existencia mayoritaria de bacterias gram negativas, y se conoce según reportes bibliográficos que éstas, tienen una ventaja frente a las bacterias Gram positivas, debido a que son consideradas importantes degradadoras de hidrocarburos por la presencia de lipopolisacáridos en su membrana, que facilitan la formación y estabilización de emulsiones de hidrocarburos en sistemas acuosos y contribuyen al incremento en la superficie de ataque del contaminante (Ueno A, Hasanuzzaman H, 2006). Pérez *et al.*, (2008), sustenta que las comunidades microbianas en áreas contaminadas son dominadas por los organismos capaces de utilizar o sobrevivir a compuestos tóxicos, como los ambientes contaminados con hidrocarburos.

Habiendo evaluado a nuestras colonias puras (cepas) se preparó nuevamente placas con agar Pseudomona, agar MSM, agar nutritivo. Esto permitiría descartar algunas colonias por crecimiento en medios específicos.

Así mismo se generó una comparación del crecimiento bacteriano a partir de dilución  $1 \times 10^3$  en diferentes medios sólidos, con sus respectivas tinciones. La misma que se dispuso en la siguiente tabla:

*Tabla12. Comparación de crecimiento bacteriano*

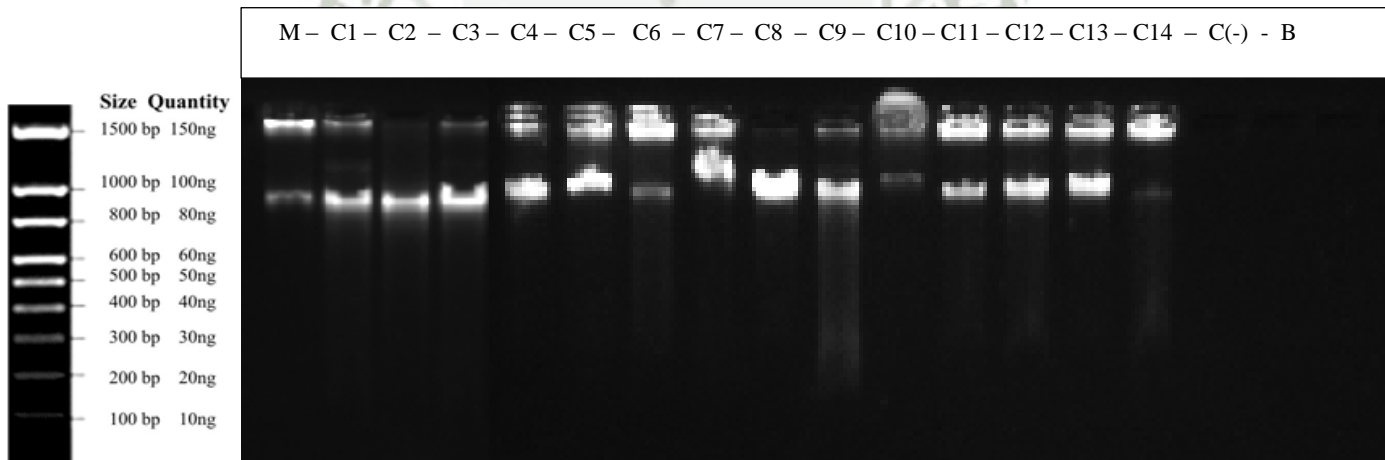
<b>Cepa</b>	<b>Agar Pseudomona</b>	<b>Agar MSM</b>	<b>Agar Nutritivo</b>	<b>Gram (+)</b>	<b>Gram (-)</b>	<b>Forma</b>
<i>C1</i>	-	-	✓	-	✓	BACILOS (pequeños)
<i>C2</i>	✓	-	✓	✓	-	BACILOS (esporas)
<i>C3</i>	✓	✓	✓	-	✓	BACILOS
<i>C4</i>	✓	✓	✓	✓	-	BACILOS (esporas)
<i>C5</i>	✓	✓	✓	-	✓	BACILOS (sin cristales)
<i>C6</i>	-	-	✓	-	✓	COCOS (regulares)
<i>C7</i>	✓	-	✓	-	✓	BACILOS (menudos)
<i>C8</i>	✓	✓	✓	✓	-	COCOS
<i>C9</i>	✓	✓	✓	-	✓	BACILOS (sin cristales)
<i>C10</i>	-	✓	✓	-	✓	COCOS (pequeños)
<i>C11</i>	✓	-	✓	-	✓	BACILOS (menudos)
<i>C12</i>	✓	✓	✓	✓	-	BACILOS (esporas)
<i>C13</i>	✓	✓	✓	✓	-	BACILOS (regulares)
<i>C14</i>	✓	✓	✓	-	✓	BACILOS (sin cristales)

A partir de la siguiente tabla se pudo denotar algunas semejanzas entre facilidad de crecimiento, tinción y estructura de las bacterias, lo cual nos dio un indicio de repetitividad en algunos aislados, lo cual se corroboraría con la identificación por secuenciación.

*Y.J. Chang, J.R. Stephen, (2000)*, señalan en su investigación que, las bacterias que pueden degradar hidrocarburos se encuentran ampliamente distribuidas en el suelo contaminado y agua, y la investigación ha demostrado que la aplicación de hidrocarburos aumenta el número de bacterias, por lo cual esto nos sirvió para efectuar y corroborar nuestras pruebas adicionales.

### 12.3.2. Extracción de DNA bacteriano para identificación molecular:

De la extracción efectuada con el Kit Promega para extracción de DNA empleando el marcador de peso molecular DNA Lambda y Sybr Green, se obtuvo el siguiente gel:



*Figura 8. Captura de gel corrido para DNA en cámara electroforética.*

Del gel se puede inferir que en todas las muestras existe presencia de DNA, señaladas claramente con el marcador (M) en el primer carril, la muestra C10 se denota no muy clara, lo cual puede deberse a la manipulación al momento de ubicar la muestra de DNA en el pozo del gel, sin embargo también existe una banda que señala presencia de DNA, como era de esperarse tanto el control

negativo (C-) y blanco, muestran una ausencia de bandas y no se denota contaminación de carriles en ningún pocillo.

Wilson K., (1987) indica que fallas de corrida electroforética pueden deberse claramente a la mala manipulación o de lo contrario a problemas con la agarosa, en donde no permita un adecuado desplazamiento de la muestra a través de los carriles.

### 12.3.3. Cuantificación de DNA con NadoDrop, (concentración mínima >50 ng/ul)

Como es de conocimiento para poder ejecutar una correcta preparación de un MIX de Secuenciación se procedió a efectuar los cálculos según las concentraciones de DNA, a partir de las cuales se generó una tabla conteniendo los cálculos posterior a la aplicación de la fórmula estandarizada de concentración, en donde se señala que la mínima concentración de DNA en la muestra debe ser 50 ng/ul para una correcta secuenciación.

Aplicamos:

$$\text{Abs}_{260} \times 50 \text{ ng/ul} = 20 \text{ ul} \times C_2$$

$$C_2 = (\text{Abs}_{260} \times 50 \text{ ug/ml}) \times 0.02 \text{ ul}$$

$$V_1 \times C_2 = 10 \text{ ul} \times 0.05 \text{ ug}$$

$$V_1 = Z / C_2$$

$$V_2 = 10 \text{ ul} - V_1; *Nota: 10 \text{ ul} \rightarrow \text{Volumen final al que se llevó.}$$

*Fuente: Kit promega de extracción y cuantificación de DNA.*

$\text{Abs}_{260}$  = Absorbancia a 260nm

$C_2$  = Concentración deseada

$Z$  = Volumen final x concentración en ug

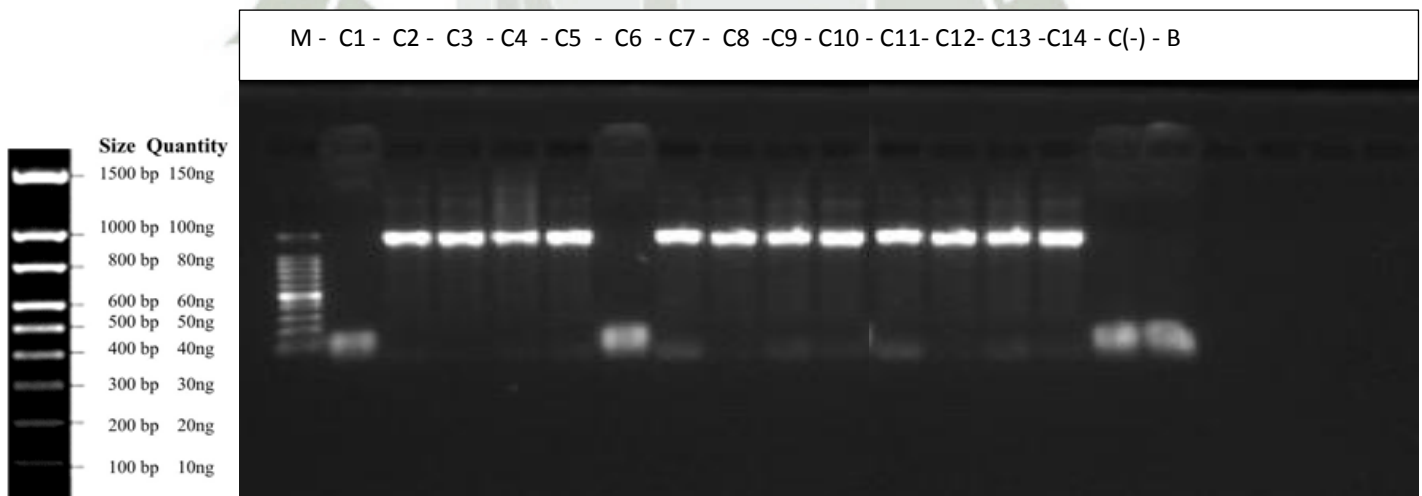
$V_1$  = Volumen que se toma de la muestra de DNA.

$V_2$  = Volumen de H<sub>2</sub>O miliequivalente para enrase.

Estas fórmulas se señalan en los kits de secuenciación para la correcta preparación del Mix, puesto que la adición de algunos reactivos en exceso o en menores cantidades, alterarían una correcta reacción, gracias a esto se obtuvo una tabla de resultados para los adecuados volúmenes de DNA a emplear por cada muestra.

A partir de los resultados de la  $ABS_{260}$  se señala que se cuenta con las cantidades necesarias de DNA para efectuar una secuenciación, esto gracias a la aplicación de la fórmula ya mencionada anteriormente, empleando esta fue que se encontró la concentración deseada ( $C_2$ ), y a partir de ello se determinó el volumen de DNA a emplear en la preparación del Mix de PCR (columna en negrita), por ende al calcular el volumen que vamos a tomar de nuestros DNA enrasamos hasta el volumen final (10 ul), únicamente con la diferencia de volúmenes (columna sin negrita). (*Tabla 13*) – *Anexos*

Posterior a la preparación del Mix, y corrida en gel se llevó el mismo para ser revelado, obteniendo las siguientes bandas:



*Figura 9. Captura de gel corrido en cámara electroforética a 80v con primers 16S rRNA.*

El resultado para el gel señala bandas a la altura de 1500pb, empleando primers generales de identificación rRNA16S, a excepción de la muestra C1 y C6, en las

cuales no hubo amplificación para lo cual se pensó en la existencia de inhibidores de primers como una primera opción para esta nulidad en las bandas, por ende se repitió una corrida de gel empleando únicamente estas muestras de DNA en menor concentración y resuspendiendo en mayor tiempo para permitir una buena mezcla de primers, sin embargo el resultado fue el mismo y no se obtuvo amplificación de bandas. *Wongsa et al. (2004)*, señala que en muchas ocasiones la inhibición en la amplificación se debe a dNTP's o a la propia secuencia de DNA, y sugiere una modificación en las concentraciones al momento de preparar el Mix para PCR.

Habiendo inferido las posibles causas de la ausencia de bandas en el gel para nuestras dos muestras (C1, C6), se pensó preparar un Mix con una nueva concentración de primers, pues como se mencionó podría ser la conformación del DNA en las muestras lo que no facilitó la adhesión de los oligos, sin embargo como un resultado negativo a la investigación no se pudo lograr amplificar dichas muestras.

#### **12.3.4. Identificación:**

Posterior a la secuenciación se llevó el producto para la respectiva identificación empleando softwares, y según las secuencias visualizadas en los electroferogramas (*Figura 10 – Anexos*), se ejecutó la comparación de homología en GenBank de NCBI que nos muestran los siguientes resultados:

**Tabla14. Resultados obtenidos a partir del análisis de BLAST en NCBI**

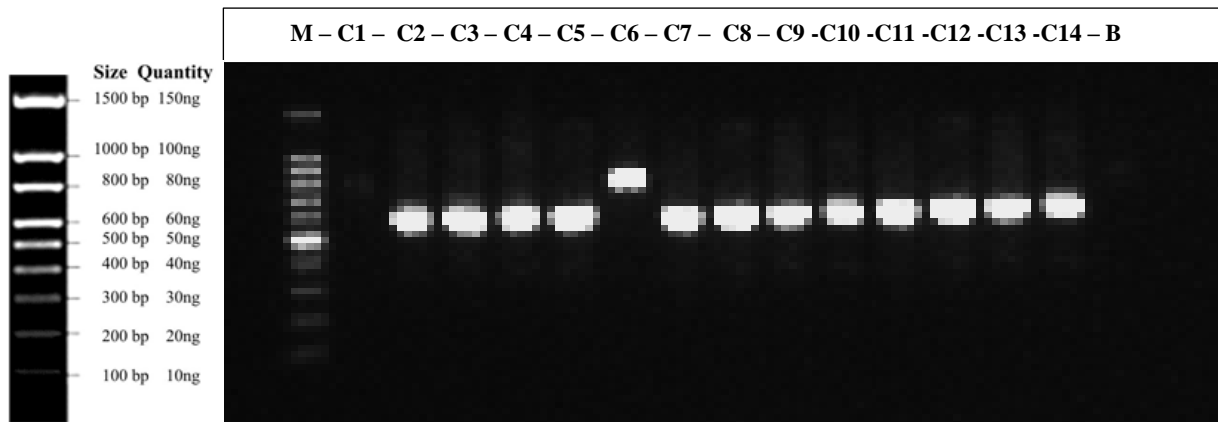
<b>Muestra</b>	<b>Gram</b>	<b>Forma</b>	<b>Nombre</b>
<b>C1</b>	-	Bacilos cortos, de borde circular.	<i>NO AMPLIFICÓ EN PCR, pero si hay banda de DNA.</i>
<b>C2</b>	+	Bacilo de tamaño mediano.	<i>Bacillus cereus P83</i>
<b>C3</b>	-	Forma bacilar de tamaño medio.	<i>Bacillus sp. EW06</i>
<b>C4</b>	+	Bacilos alargados, borde circular, esporas.	<i>Bacillus cereus LD22</i>
<b>C5</b>	-	Bacilos de tamaño pequeño.	<i>Stenotrophomonas maltophilia 149A</i>
<b>C6</b>	-	Forma globular de tamaño mediano	<i>NO AMPLIFICÓ EN PCR, pero si hay banda de DNA.</i>
<b>C7</b>	-	Bacilos ligeramente hinchados.	<i>Paenibacillus sp.</i>
<b>C8</b>	+	Bacilos grandes, presencia de esporas.	<i>Bacillus anthracis IHB B 15126</i>
<b>C9</b>	-	Bacilos medianos a pequeños, presencia de esporas.	<i>Stenotrophomonas maltophilia sp.</i>
<b>C10</b>	-	Cocos de tamaño pequeño.	<i>Arthrobacter globiformis A2S3</i>
<b>C11</b>	-	Bacilos ligeramente hinchados.	<i>Paenibacillus illinoisensis YZ29</i>
<b>C12</b>	+	Bacilo de borde circular.	<i>Bacillus cereus LD22</i>
<b>C13</b>	+	Bacilos mediano, borde circular.	<i>Bacillus toyonensis BCT-7112</i>
<b>C14</b>	-	Bacilos menudos y pequeños.	<i>Stenotrophomonas maltophila 149A</i>

Como se puede apreciar a partir de la tabla desarrollada, existen aislados que se repiten, lo cual nos confirma las similitudes en la evaluación morfológica, siendo éste un factor para recalcar la evaluación de bibliografía donde verificamos se reportan algunas de las bacterias identificadas.

*Sambrook y Russell., (2001)*, reportan su amplificación de muestras de suelos contaminados con hidrocarburos empleando primers rRNA16S, con esto pudieron comprobar que en sus muestras contenían cincuenta cultivos aislados, los cuales fueron agrupados según la filogenia, de lo cual señalan una presencia mayor del género *Bacillus*, lo cual coincide con nuestros resultados de

identificación puesto que también logramos hallar distintas especies del género *Bacillus* como se aprecia en la tabla anterior.

Así mismo del revelado del gel para el cual se empleó PRIMERS ESPECÍFICOS, se obtuvo:



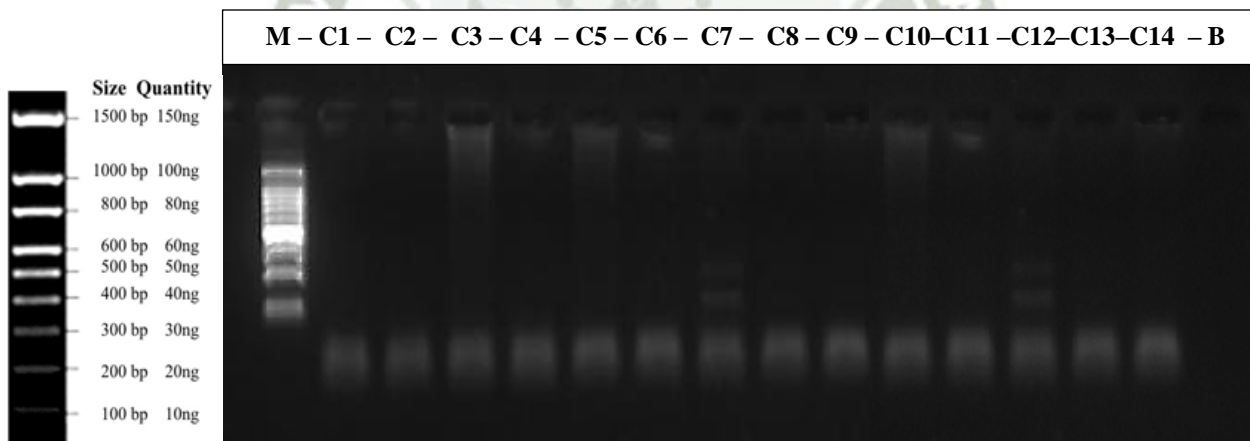
**Figura 11. Captura de gel corrido en cámara electroforética con primers 27F y 519R**

De la corrida de gel para la cual se empleó primers 27F y 519R se puede apreciar claramente la presencia del *alkB* en todas las muestras excepto en la muestra C1; sin embargo la mayor parte de bibliografía reporta bandas a la altura de 400, 600, y 800pb (Wongsa et al. 2004), para lo cual todas las muestras que amplificaron exceptuando la muestra C6 reflejan bandas entre 500 y 600 pb, la muestra C6 señala una banda entre 800 y 900pb.

De acuerdo con *D'Annibale et al. (2006)*, y su investigación realizada en realizada en Osaka, Japón, buscaban señalar que la presencia del gen de interés (*AlkB*) que fuese capaz de actuar frente a altas concentraciones de hidrocarburos podría estar presente en bacterias relacionadas con la filogenia de *Pseudomona*, para esto en sus muestras lograron identificar microorganismos tales como *Stenotrophomonas maltophilia VUN10*, *Stenotrophomonas sp*, *Ochrobactrum anthropi*, y *O. intermedium*, los cuales fueron evaluados y comparados con respecto al gen presente en *Pseudomona aeruginosa* WatG (aislada del mismo lugar), para lo cual emplearon los siguientes primers:

27F(5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3) y 1541R(5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'), los cuales son los mismos que se empleó ya que codifican para las mismas secuencias, de lo cual hallaron bandas a la altura de 550pb que señalan la presencia del gen en *Stenotrophomonas maltophilia*, lo que de igual manera nos permitió identificar bandas según la PCR realizada, ya que logramos identificar la misma especie relacionada directamente con la filogenia de *Pseudomona sp.*

Así mismo C. Calvo, F.L. Toledo, J. González-López., (2004), reporta la existencia del gen AlkB que codifica para la enzima alcanos monooxigenasa en algunos microorganismos como *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* y *Bacillus*, y los señala como bacterias capaces de trabajar en presencia de hidrocarburos, referencia que facilita nuestra selección de cepas para el posterior trabajo con concentraciones de diesel.



**Figura 12. Captura de gel corrido en cámara electroforética con primers PPalkBF y PPalkBR**

La imagen de la corrida del gel empleando primers PPalkBF, y PPalkBR, claramente señalan que no existió amplificación de los mismos en ninguna muestra, esto debido a como se nos mostró en la identificación bacteriana no se encontró ninguna bacteria señalada como *Pseudomona*, siendo éstos primers

específicos para detección del gen *alkB* en *Pseudomona*, con esto corroboramos que lo que nuestra identificación señala, ausencia de *Pseudomona* en las muestra de suelo tomadas.

Por ende, tomando de referencia estos resultados fue que nos permitimos seleccionar las bacterias con las cuales trabajar para determinar su capacidad para utilizar los hidrocarburos como fuente de energía.

### 12.3.5. Selección de aislados bacterianos:

De todos los aislados bacterianos obtenidos, se contrastó aquellos que presentaron mayor cantidad de reportes en artículos científicos (Quesada et al. y Scheibenbogen et al.), y se seleccionó 5 aislados, dentro de los cuales están: C1, C4, C7, C13 y C14, cabe mencionar que se adicionó al listado a C1 debido a que no se pudo identificar a la misma mediante secuenciación y gracias a estas pruebas se nos haría factible descartar del todo alguna actividad para trabajar en medios con presencia de hidrocarburos.

Fue gracias a esto que se elaboró la siguiente tabla:

*Tabla15. Selección de colonias a partir de la identificación y facilidad de crecimiento.*

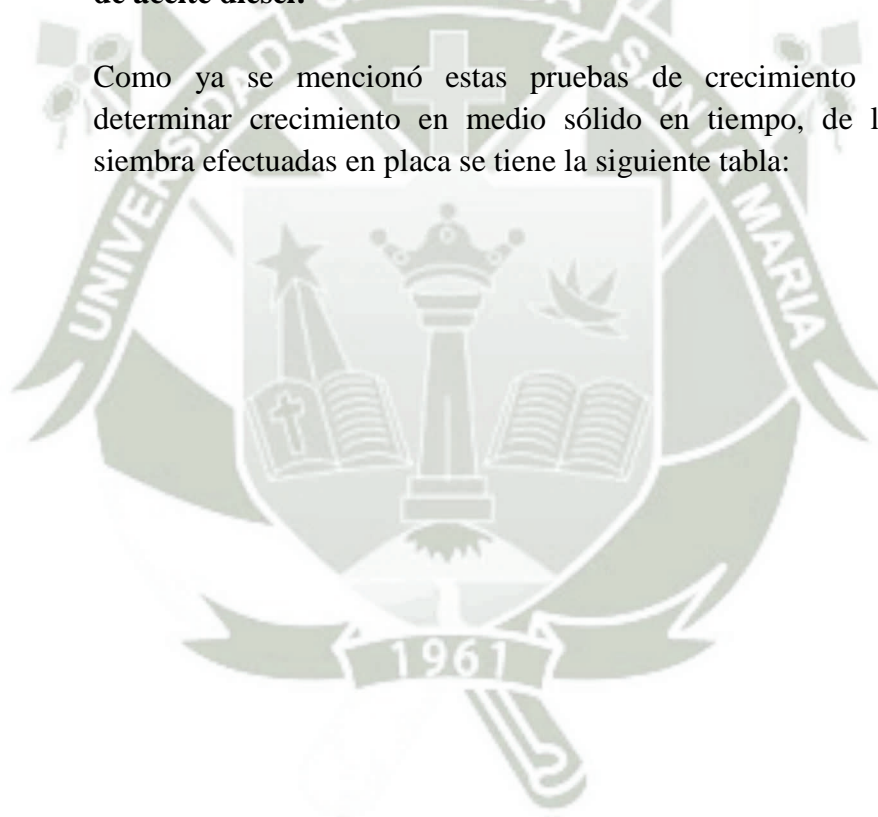
Cepa	C1	C4	C7	C13	C14
Características	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Crecimiento lento</li> <li>• Creció en agar nutritivo</li> <li>• Bacilos gram (-)</li> <li>• Colonias de tamaño medio, casi translúcidas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Crecimiento regular</li> <li>• Crece en agar <i>Pseudomona</i> y MSM.</li> <li>• Bacilos alargados gram (+)</li> <li>• Muestra presencia de esporas, borde circular.</li> <li>• Colonias blanquecinas similares a Bt.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Crecimiento lento.</li> <li>• Colonia cremosa casi transparente.</li> <li>• Bacilos gram (-)</li> <li>• Crece en agar <i>pseudomona</i>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Crecimiento rápido.</li> <li>• Colonia blanquecina.</li> <li>• Bacilos gram (+) de tamaño regular.</li> <li>• Crece en agar <i>Pseudomona</i> y MSM.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Colonia de tamaño pequeño a las 24hrs, casi blanquecina.</li> <li>• Bacilos menudos de menor tamaño gram (-).</li> <li>• Crece en agar <i>Pseudomona</i> y MSM.</li> </ul>

Según Zhengzhi Z, Zhaowei H., (2011), en su investigación señala que otros autores han demostrado que especies de *Acinetobacter* y *Stenotrophomona* están involucradas en la biorremediación de hidrocarburos aromáticos, así como en la producción de heteropolisacáridos de alto peso molecular que actúan como emulsionantes de gran alcance.

Dentro de este grupo se contó con una cepa ya seleccionada (C14, *Stenotrophomonas maltophila* 149A) para el trabajo en las pruebas de crecimiento en concentraciones de aceite diesel.

#### **12.3.6. Pruebas de crecimiento en medio MSM a diferentes concentraciones de aceite diesel:**

Como ya se mencionó estas pruebas de crecimiento sirvieron para determinar crecimiento en medio sólido en tiempo, de las pruebas de siembra efectuadas en placa se tiene la siguiente tabla:



*Tabla16. Resultados obtenidos a partir de diferentes siembras en placa*

<b>Cepa</b>	<b>Medio agar</b>	<b>Tipo de siembra</b>	<b>Crecimiento</b>
<b>C1</b>	MSM + aceite Diesel 1%	Estría simple	Sin crecimiento
<b>C4</b>	MSM + aceite Diesel 1%	Estría simple	Crecimiento al 5to día
<b>C7</b>	MSM + aceite Diesel 1%	Estría simple	Crecimiento al 6to día
<b>C13</b>	MSM + aceite Diesel 1%	Estría simple	Crecimiento al 5to día
<b>C14</b>	MSM + aceite Diesel 1%	Estría simple	Crecimiento al 5to día
<b>C1</b>	MSM + glicerol 2%	Estría simple	Sin crecimiento
<b>C4</b>	MSM + glicerol 2%	Estría simple	Sin crecimiento
<b>C7</b>	MSM + glicerol 2%	Estría simple	Sin crecimiento
<b>C13</b>	MSM + glicerol 2%	Estría simple	Sin crecimiento
<b>C14</b>	MSM + glicerol 2%	Estría simple	Sin crecimiento
<b>C1</b>	MSM	Estría simple	Sin crecimiento
<b>C4</b>	MSM	Estría simple	Crecimiento al 5to día
<b>C7</b>	MSM	Estría simple	Sin crecimiento
<b>C13</b>	MSM	Estría simple	Crecimiento al 5to día
<b>C14</b>	MSM	Estría simple	Crecimiento al 4to día

Las cepas en las que se mostró crecimiento, generaron colonias blanquecinas bastante menudas, lo que nos lleva a sugerir un crecimiento lento. A partir de la siguiente tabla elaborada podemos decir que:

- C1: Bacilos sin amplificación en 16S, mostraban estructura morfológica sugerente a Pseudomona, sin embargo no es capaz de crecer en medio Pseudomona, ni MSM, únicamente es capaz de crecer en agar nutritivo con un crecimiento lento a 37°C.

- C4 (*Bacillus cereus* LD22): existen varios reportes bibliográficos que señalan a *Bacillus Cereus* en trabajo de consorcio con *Pseudomona* para degradar hidrocarburos presentes en suelos, mostró crecimiento en agar *Pseudomona*, MSM, MSM + aceite diesel 1%, sin embargo no hubo crecimiento en MSM + glicerol 2%.
- C7 (*Paenibacillus sp.*): algunos reportes señalan a esta bacteria como una capaz de trabajar en medios contaminados con hidrocarburos, ya sea en bioaumentación o en consorcio microbiano, presenta una estructura similar al *Bacillus*, y según las pruebas en placa mostró crecimiento en agar *Pseudomona* y MSM + aceite diesel 1%.
- C13 (*Bacillus toyonensis* BCT-7112): no existen mucha referencia bibliográfica referida a este aislado bacteriano, sin embargo de la poca que se señala la catalogan como bacteria derivada para poder trabajar en medios con presencia de hidrocarburos, según las siembras en placa muestra crecimiento al 5to día, en agar *Pseudomona*, MSM y MSM + aceite diesel 1%.
- C14 (*Stenotrophomonas maltophila* 149A): La bibliografía señalan anteriormente a estas bacterias como una especie de *Pseudomona*, sin embargo a la fecha se le considera dentro de la familia, existen varios reportes que la mencionan en trabajo de consorcio con *Pseudomona aeruginosa*, y *Bacillus cereus*, con crecimiento en agar *Pseudomona*, MSM, y MSM + aceite diesel 1%.

De los matraces inoculados en medio MSM Alternativo sin aceite diesel e incubados por 48 h a 37°C, se apreció clara turbidez en los medios en todas las cepas, lo cual nos lleva a identificar a simple vista que existió crecimiento bacteriano al cabo de este periodo, esto pudo deberse claramente a la presencia de extracto de levadura al 0.4%, que aun así siendo una cantidad reducida facilita a los microorganismos el crecimiento en un medio salino, sin embargo la cepa C1 no mostró turbidez alguna posterior a estas 48 h, por lo cual se puede suponer

que esta cepa no es capaz de crecer en este tipo de medio al igual como se sugirió con las pruebas de placa. En tanto se tendría la siguiente tabla modificada:

*Tabla17. Resultados obtenidos de la inoculación en medio MSM Alternativo + extracto de levadura 0.4%*

Cepa	Medio de cultivo	Concentración de aceite Diesel	Crecimiento
<b>C1</b>	Caldo MSM + Extracto de levadura 0.4%	0%	Sin crecimiento
<b>C4</b>	Caldo MSM + Extracto de levadura 0.4%	0%	Crecimiento
<b>C7</b>	Caldo MSM + Extracto de levadura 0.4%	0%	Crecimiento
<b>C13</b>	Caldo MSM + Extracto de levadura 0.4%	0%	Crecimiento
<b>C14</b>	Caldo MSM + Extracto de levadura 0.4%	0%	Crecimiento

De los matraces conteniendo caldo MSM (NO ALTERNATIVO), sin adición de extracto de levadura inoculados con las cepas previamente incubadas por 48 h, no se apreció turbidez en los medios, lo cual nos sugiere la inexistencia de crecimiento, para lo cual fue se corroboró esto con las lecturas de ABS a 600 nm en el espectrofotómetro NanoDrop2000, las cuales fueron iguales a la absorbancia inicial al momento de la inoculación. Teniendo la siguiente tabla con las absorbancias respecto al blanco:

*Tabla18. Comparación de crecimiento de las diferentes cepas bacterianas*

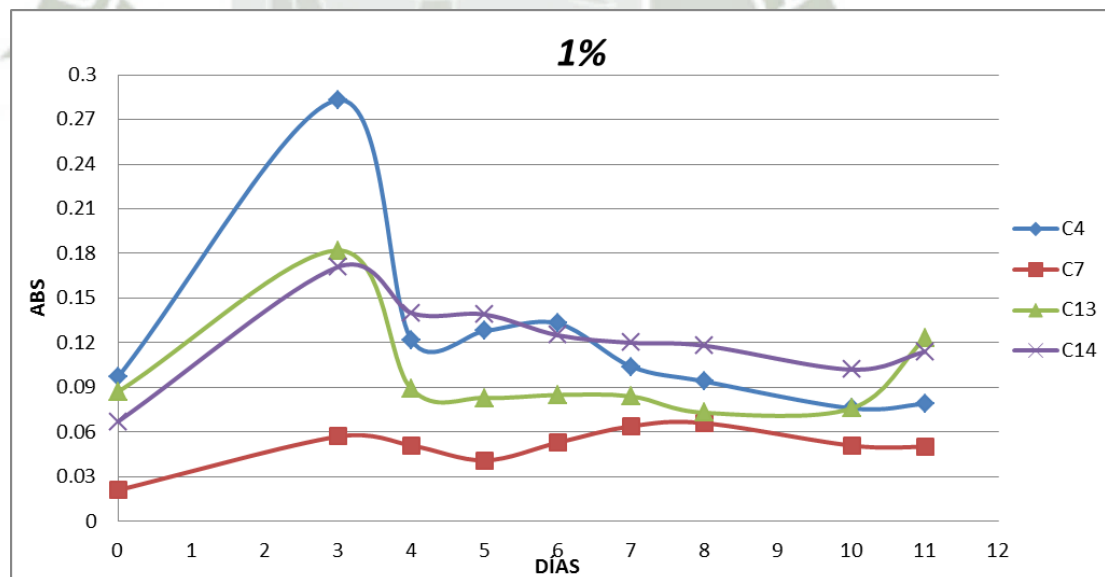
Cepa	Medio de cultivo	Concentración de aceite Diesel	Absorbancias
<b>C1</b>	Caldo MSM + 1 ml (inóculo pre-incubado)	1%	0.000
<b>C4</b>	Caldo MSM + 1 ml (inóculo pre-incubado)	1%	0.003
<b>C7</b>	Caldo MSM + 1 ml (inóculo pre-incubado)	1%	0.007
<b>C13</b>	Caldo MSM + 1 ml (inóculo pre-incubado)	1%	0.006
<b>C14</b>	Caldo MSM + 1 ml (inóculo pre-incubado)	1%	0.003
<b>BCO</b>	Caldo MSM	1%	0.000

Como se aprecia se efectuó una comparación de crecimiento y se evaluó la inexistencia del crecimiento en medio MSM no alternativo con aceite diesel al 1%. Al igual que en el anterior medio, la cepa C1 no muestra turbidez, ni es capaz de crecer medio MSM con aceite Diesel.

Mostradas ya algunas facultades de mínimo crecimiento bacteriano en las cepas C4, C7, C13 y C14, se decidió eliminar a la bacteria C1 de las pruebas de crecimiento en medio líquido contiendo un porcentaje definido de aceite diesel, puesto no generó ninguna respuesta positiva de crecimiento.

Los inóculos preparados en simultáneo conteniendo caldo MSM alternativo suplementado con extracto de levadura, a diferentes concentraciones de aceite diesel mostraron una clara turbidez transcurridas las 72 h, de los cuales se pudo obtener las siguientes gráficas para mostrar su crecimiento bacteriano, relacionando las absorbancias registradas versus los días.

- **Crecimiento a partir de las 72 h a concentración 1% de aceite diesel**



**Figura 13. Curva de crecimiento de las cepas C4, C7, C13 y C14, aceite diesel 1% y extracto de levadura 0.4%**

La cepa C4, para el día 3 mostró su mayor concentración de absorbancia con 0.283, después decayó y volvió a incrementarse para el día 6 con 0.133, lo cual podría sugerir que la bacteria estaría consumiendo los minerales y el aceite diesel proporcionados en el medio posterior al consumo del extracto de levadura. **(Tabla 19) – Anexos**

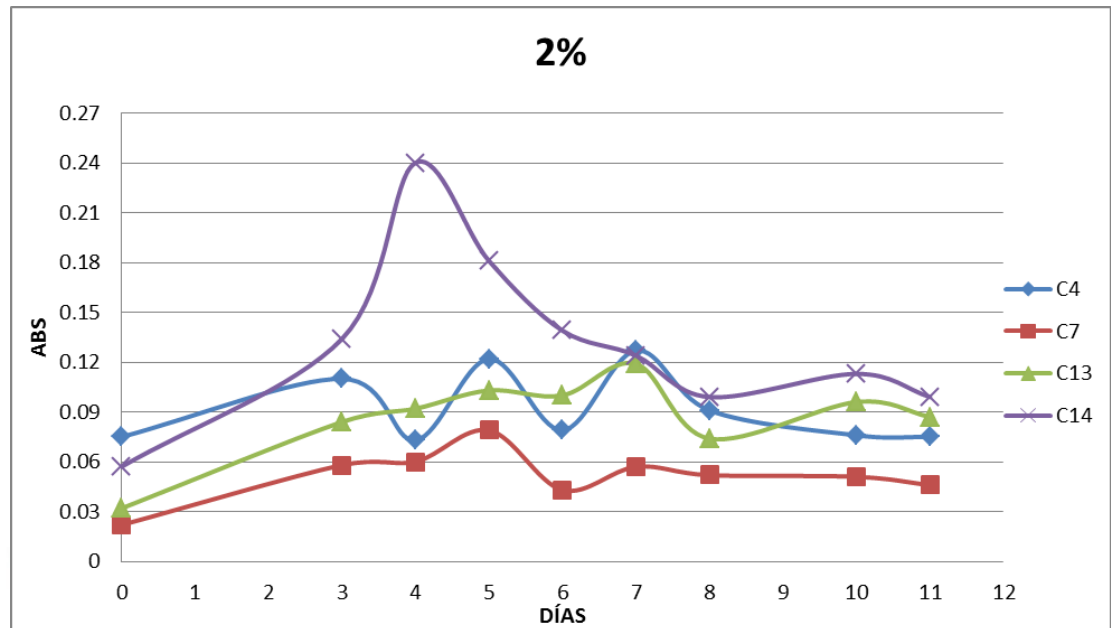
La cepa C7, Para el día 7 mostró un gran incremento de concentración respecto a días anteriores con 0.064 de ABS, el día 8 se muestra como el día con mayor concentración con una absorbancia de 0.066, después decayó nuevamente, lo cual podría sugerir que la bacteria estaría consumiendo minerales y diesel del medio posterior al descenso del porcentaje de extracto de levadura. **(Tabla 20) – Anexos**

La cepa C13, para el día 3 mostró un gran incremento de concentración respecto al día cero con 0.182 de ABS, volvió a decaer posterior a esto, manteniendo valores oscilatorios hasta el día 10, para el día 11 incrementarse notoriamente con 0.123 de ABS, lo cual nos sugiere para este día posterior a la inoculación una cantidad nula o imperceptible de extracto de levadura y el uso del hidrocarburo proporcionado en el medio como fuente de energía. **(Tabla 21) – Anexos**

La cepa C14, muestra su mayor concentración el día 3 con 0.171 de ABS, posterior a esto decae los días siguientes manteniendo valores relativamente oscilatorios hasta el día 11 que vuelve a incrementarse, por tanto se puede suponer que terminado de sustrato de extracto de levadura no decae directamente pues podría estar empleando el hidrocarburo como fuente de carbono. **(Tabla 22) – Anexos**

Claramente la comparación referida a las cuatro cepas a concentración de 1% de aceite diesel, señalan un notorio incremento para la cepa C4 (*Bacillus Cereus* LD22), con respecto a las demás.

• Crecimiento a partir de las 72 h a concentración 2% de aceite diesel



**Figura 14.** Curva de crecimiento de la cepa C4, C7, C13, y C14, aceite diesel 2% y extracto de levadura 0.4%

C4, muestra un claro crecimiento aleatorio con concentraciones altas para los días 3 y 5 con ABS de 0.110 y 0.122 respectivamente, el día 6 desciende y para el día 7 muestra su mayor incremento con 0.127 de ABS, para cual se debe tener en cuenta la improbabilidad de que exista extracto de levadura para tal día, limitando su crecimiento al uso del hidrocarburo. *(Tabla 23) - Anexos*

La cepa C7, para el día 5 mostró su mayor concentración de absorbancia con 0.079, después decayó y volvió a incrementarse para el día 7 con 0.057, lo cual podría sugerir que la bacteria estaría consumiendo los minerales y el aceite diesel proporcionados en el medio posterior al consumo del extracto de levadura. *(Tabla 24) – Anexos*

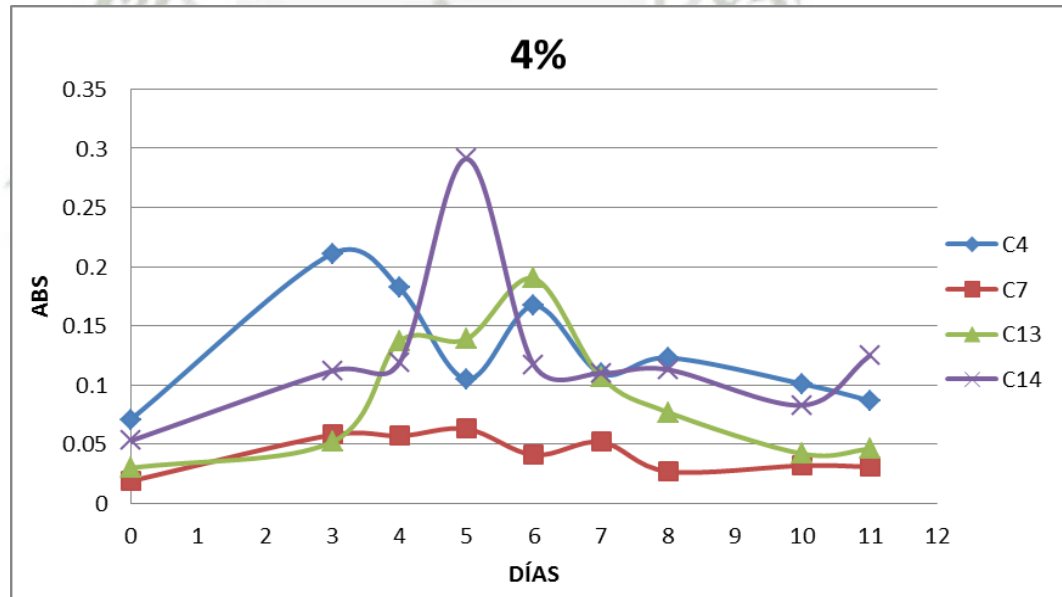
C13, muestra crecimiento continuo desde el día 3 hasta el día 7 en cual se registra su mayor concentración con 0.119 de ABS, posterior a esto decae los dos

días siguientes y el décimo día vuelve a mostrar un ligero incremento con 0.096 de ABS. *(Tabla 25) - Anexos*

C14, registra su mayor pico de ABS en el día 4 con 0.240, posterior a esto tuvo un descenso constante hasta un ligero incremento el día 10 con 0.113 de ABS. *(Tabla 26) – Anexos*

Para lo cual, de una inferencia comparativa se denota a la cepa C14 (*Stenotrophomonas maltophilia* 149A), como aquella que generó un mayor crecimiento a concentración de 2%, resultado que comparado con 1% puede asociarse a una adhesión bacteriana en el caso de las otras 3 cepas a las paredes del tubo de inoculación, generando un mayor despunte por una sola cepa.

- **Crecimiento a partir de las 72 h a concentración 4% de aceite diesel**



**Figura 15.** Curva de crecimiento de la cepa C4, C7, C13, y C14, aceite diesel 4% y extracto de levadura 0.4%

C4, denota su mayor crecimiento el día 3 mostrando una ABS de 0.211, para lo cual se tuvo descensos de concentración hasta el día 6 en el cual la ABS vuelve a

incrementarse hasta 0.167 y posterior a esto continuó el descenso de la concentración. (*Tabla 27*) – *Anexos*

La cepa C7, muestra un crecimiento continuo desde el día 3 hasta el día 5, en el cual se registra el más alto crecimiento con una ABS de 0.063, posterior a esto decae y vuelve a ascender el día 7 con 0.052 de ABS, pasado el día 7 la concentración fue disminuyendo. (*Tabla 28*) - *Anexos*

En el caso de la cepa C13, se denota un crecimiento acelerado en el día 4 incrementando las ABS desde 0.052 hasta 0.137, y el crecimiento fue continuo hasta el día 6 en el que se calcula una ABS de 0.190, posterior a este día la ABS fue disminuyendo continuamente. (*Tabla 29*) - *Anexos*

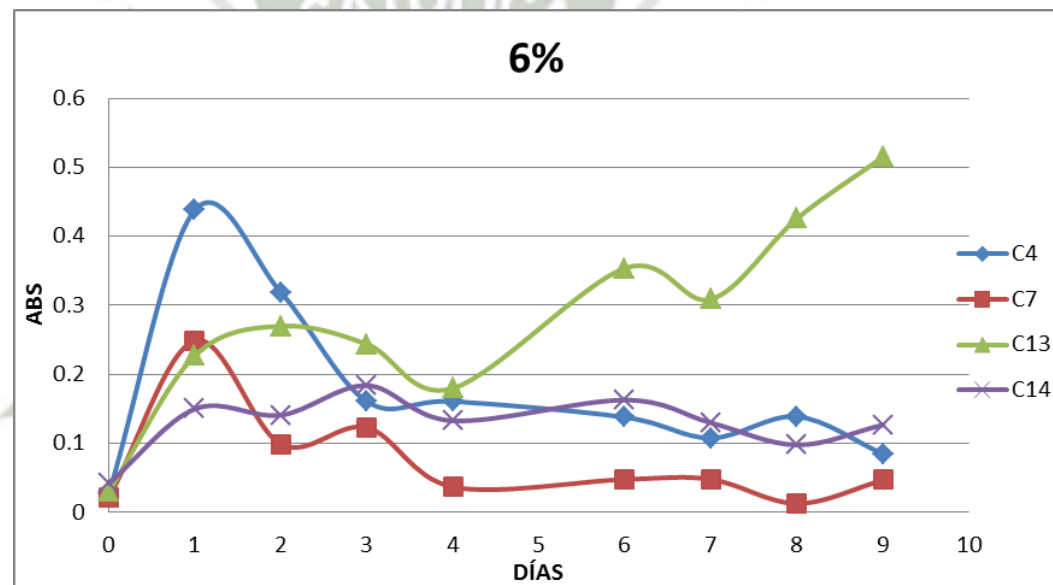
C14, registró su pico más alto el día 5 con una ABS de 0.291 para posterior a este día tener una caída bastante acelerada hasta 0.117 en el día 6, tuvo fluctuación de concentraciones hasta el día 11 en el cual vuelve a incrementarse con una ABS de 0.125. (*Tabla 30*) – *Anexos*

De modo que C14 (*Stenotrophomonas maltophilia 149A*), sigue manteniendo la ABS más elevada con respecto a las demás y generando un gran contraste con respecto a C7 (*Paenibacillus sp.*), quien muestra continuamente un crecimiento pobre respecto a las demás.

De acuerdo con *M. Shimura, G., (1999)*, en su investigación realizada para pruebas únicamente con el género *Bacillus*, para determinar su capacidad de crecer en medio MSM enriquecido con fenantreno y pireno, determinó un gran crecimiento en sus curvas al segundo y tercer día de incubación, en nuestro caso se aprecian similitudes en las absorbancias, sin embargo el control se he llevado a cabo de las 72 h siguiendo la referencia de *Frick et al., (1999)*.

Los resultados mostrados en las gráficas ya evaluadas (1%, 2% y 4%), permiten inferir la capacidad de crecimiento bacteriano en diferentes concentraciones de aceite diesel, a esto debemos adicionar el hecho de que se logró apreciar una licuefacción y disrupción de la fase apolar o hidrofóbica la misma que se generó al adicionar aceite diesel al medio líquido el cual contenía el inóculo bacteriano pre-incubado por 48 horas (*Figura 16*) - *Anexos*, por tanto al incrementar las concentraciones de aceite diesel al medio, se evaluó el crecimiento desde el día 1 teniendo los siguientes resultados:

- **Crecimiento a partir de las 72 h a concentración 6% de aceite diesel**



**Figura 17.** Curva de crecimiento de la cepa C4, C7, C13 y C14, aceite diesel 6% y extracto de levadura 0.4%

En la gráfica la cepa C4, muestra su mayor concentración para el día 1, con una ABS de 0.438, los días posteriores tuvo una tendencia a disminuir hasta el día 8, en el que vuelve a incrementarse con una ABS de 0.139, posterior a esto disminuyó nuevamente, lo cual podría permitir inferir que el día 1 se ejecutó el consumo completo del extracto de levadura, y posterior a esto empleó el hidrocarburo presente en el medio. (*Tabla 31*) – *Anexos*

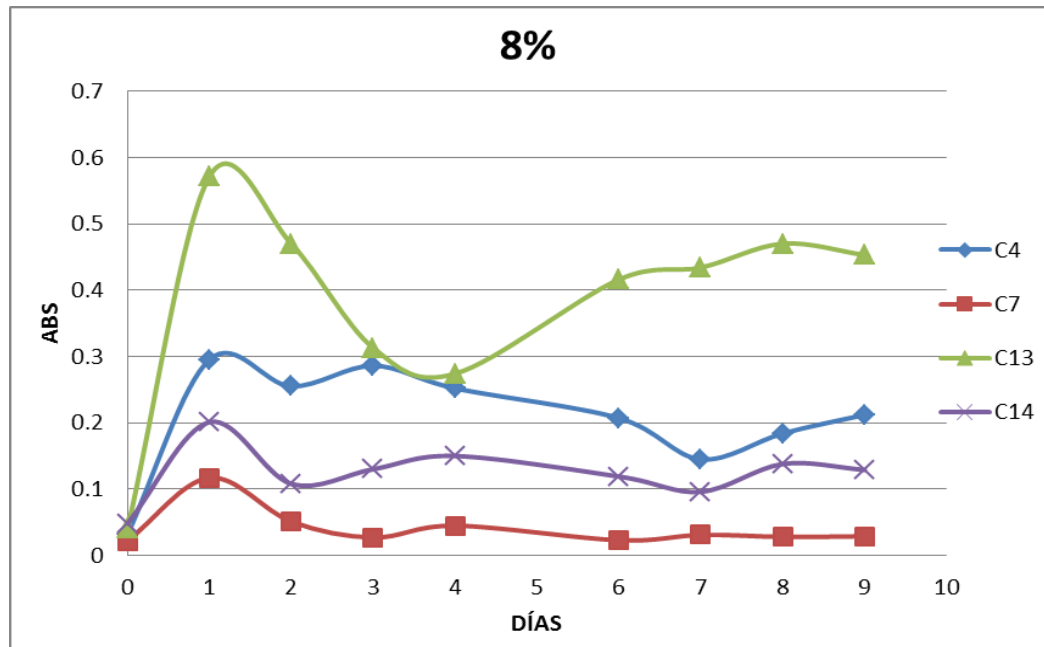
La cepa C7, claramente se muestra un importante descenso entre el día 1 y 2, de 0.249 a 0.099 de ABS, posterior a esto su concentración bacteriana continuó incrementándose y decayendo, hasta el día 9 en el que se aprecia un ligero incremento de la concentración. (**Tabla 32**) - *Anexos*

En el caso de C13 (*Bacillus Toyonensis* BCT-77112), se apreció un crecimiento continuo con una ligera caída en la ABS para el día 4, posterior a esto su crecimiento continuó incrementándose, ésta grafica claramente refleja que la bacteria pudo haber empleado el extracto de levadura hasta el día 4 en el que decae, para posterior a esto empezar a emplear el hidrocarburo como la fuente de energía base, y esto llevó a incrementar la ABS hasta el día 9 con 0.515. (**Tabla 33**) - *Anexos*

En el caso de C14, el crecimiento fue variable iniciando con un crecimiento el día 3, posterior a esto su más alta ABS se registra el día 6 con 0.184 y la menor se registra el día 8 con 0.098. (**Tabla 34**) - *Anexos*

En esta prueba es la cepa C13 (*Bacillus Toyonensis* BCT-77112), quien registra una mayor concentración en ABS, con respecto a las demás, posteriores al día 4, contrariamente a la cepa C7 (*Paenibacillus* sp.), la cual sigue registrándose como aquella con menores concentraciones.

• Crecimiento a partir de las 72 h a concentración 8% de aceite diesel



**Figura 18.** Curva de crecimiento de la cepa C4, C7, C13, C14, aceite diesel 8% y extracto de levadura 0.4%

En este caso, C4 muestra valores ligeramente variables entre el día 1 y el día 3 con unas ABS de 0.295 y 0.286 respectivamente, posterior a estos días la concentración disminuyó hasta el día 8 en el que vuelve a incrementarse ligeramente. (*Tabla 35*) – *Anexos*

La cepa C7, muestra una clara disminución de ABS respecto al día 1, en el que se registra 0.117, en los días posteriores los valores de ABS no superan a 0.051, lo cual nos hace referencia a que se genera el consumo total de levadura el primer día y los días posteriores a este se hace más dificultoso para la bacteria generar energía a partir del hidrocarburo proporcionado en el medio. (*Tabla 36*) - *Anexos*

En el caso de C13, se apreció una alta concentración el día 1 siendo 0.571, pudiendo deberse al consumo del extracto de levadura, seguida de la cual la ABS comenzó a descender hasta el día 4, posterior a este día se registra un incremento de la concentración hasta el día 8 con una ABS de 0.470, para lo cual nos puede

indicar que a partir de este día se genera el consumo del hidrocarburo por la bacteria. (*Tabla 37*) – *Anexos*

Para la cepa C14, el día 1 se registra la más alta concentración con una ABS de 0.201, posterior decae y vuelve a incrementarse ligeramente el día 3, a partir de este día mantiene un crecimiento regularmente constante hasta el día 9. (*Tabla 38*) – *Anexos*

De donde se infiere que de igual modo como se dio para 6% de aceite diesel, cepa C13, es la que generó un mayor crecimiento con respecto a las demás.

Si bien es cierto, *Daane et al., (2001)*, señala pruebas para el género *Paenibacillus* el cual aisló en mayor porcentaje, compara que el crecimiento e incremento de concentración en un medio mineral al cual se le agrega distintos hidrocarburos se va elevando conforme la bacteria puede ir segregando enzimas que le faciliten el consumo del carbono presente en el hidrocarburo, esto puede deberse a condiciones de incubación y cadenas compuestas de hidrocarburos, mientras más simple sea la cadena es más fácil para la bacteria romperla y tomar el carbono como su fuente energética, por ende con ello confirmamos la variación presente en nuestras pruebas, ya que se trabajó con distintas especies bacterianas, y cada una genera su metabolismo en un determinado tiempo y a una determinada concentración.

*Viñas, M.; (2008)*, sustenta la teoría ya expuesta por *Daane et al., (2001)*, ya que señala su prueba de crecimiento y adaptación bacteriana, desde su aislamiento, en donde ha ido sometiendo a las bacterias a cambios de medio en el que se les fue limitando las fuentes energéticas alternas, hasta reducirlas únicamente al hidrocarburo, y demostró así mismo la factibilidad de crecimiento en estos medios en donde la única fuente energética fue el petróleo que le agregaron (*Figura 19*) - *Anexos* , con este reporte se permitió validar los resultados de nuestras pruebas de adaptación bacteriana.

Los resultados muestran un crecimiento notorio en cada una de las cepas inoculadas, claramente se puede apreciar licuefacción del hidrocarburo en todos los medios lo cual según bibliografía señala un correcto uso del carbono presente en el aceite diesel proporcionado en el medio, sin embargo al no existir una clara fase de muerte, se optó por tomar aquella muestra refrigerada correspondiente al día en que se mostrase la absorbancia más elevada, se tuvo en cuenta que al suplementar el medio MSM con 0.4% de extracto de levadura para los inóculos anteriores se le estuvo brindando a las bacterias una fuente adicional de energía, por ende según la bibliografía, se señala óptimo limitar a la bacteria de distintas fuentes de energía alternas, de modo que esta misma emplee al hidrocarburo como única fuente de carbono, este alcance adicional nos llevó a utilizar la siguiente tabla para una nueva prueba en donde se utilizó medio MSM alternativo suplementado con extracto de levadura al 0.1% lo cual convierte a nuestro medio en uno donde prácticamente la única fuente de carbono será el hidrocarburo que se le proporcione.

De tal modo que se desarrolló la siguiente tabla y gráficas de crecimiento bacteriano:

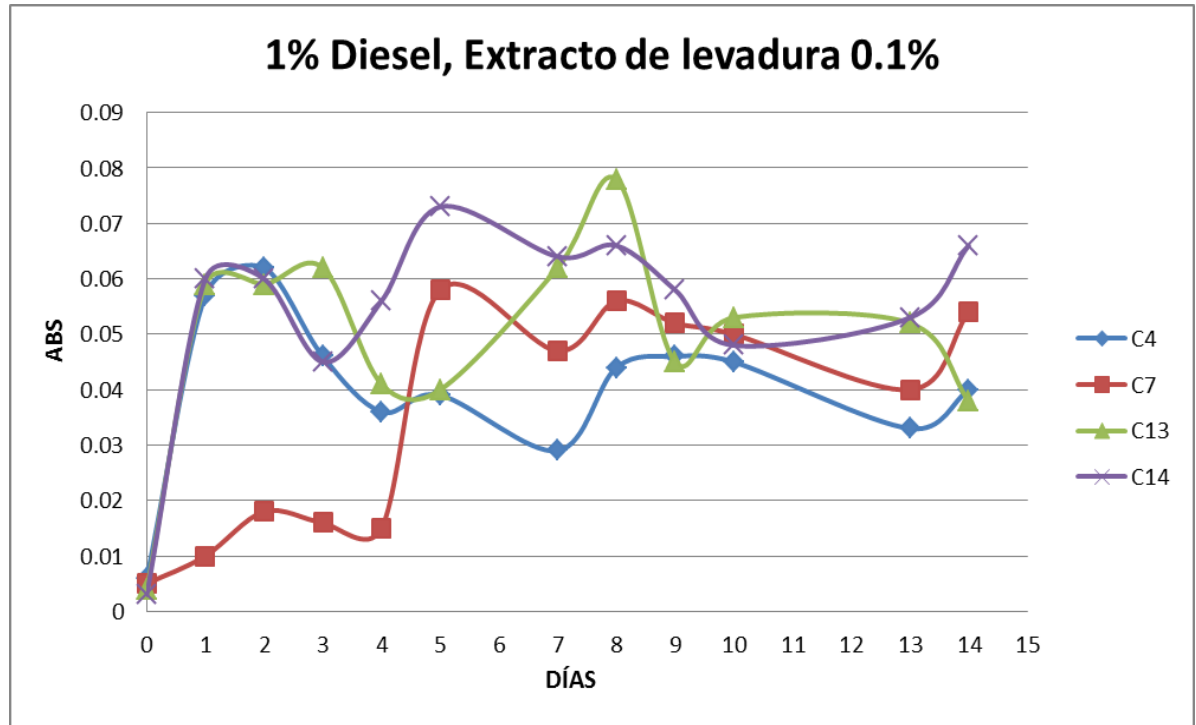
*Tabla39. Distribución de matraces de 250 ml con 100 ml de medio MSM Alternativo (Extracto de levadura 0.1%)*

<b>Cepa</b>	<b>Medio de cultivo</b>	<b>Inóculo empleado y ABS</b>
<b>C4</b>	Caldo MSM + Extracto de levadura 0.1% + 1 ml (inóculo pre-incubado)	8% día 3, ABS: 0.286
<b>C7</b>	Caldo MSM + Extracto de levadura 0.1% + 1 ml (inóculo pre-incubado)	6% día 3, ABS: 0.123
<b>C13</b>	Caldo MSM + Extracto de levadura 0.1% + 1 ml (inóculo pre-incubado)	6% día 9, ABS: 0.515
<b>C14</b>	Caldo MSM + Extracto de levadura 0.1% + 1 ml (inóculo pre-incubado)	4% día 5, ABS: 0.291

Como se ha mencionado ya, en esta última prueba de crecimiento se tomó el pre-inóculo refrigerado según el día que registrase la más alta ABS indistintamente

de la concentración de aceite diesel y se adicionó 1% en concentraciones de aceite Diesel, para evaluar el crecimiento.

**12.3.7. Crecimiento a partir de las 0 h a concentración 1% de aceite diesel,  
EXTRACTO DE LEVADURA 0.1%**



**Figura 20. Curva de crecimiento de la cepa C4, C7, C13, C14, aceite diesel 1% y extracto de levadura 0.1%**

De la siguiente gráfica se puede inferir un crecimiento neto a partir del día 1, mostrando su máximo crecimiento el día 2 con una ABS de 0.062, en descendente hasta el día 5 que vuelve a incrementarse ligeramente manteniendo estabilidad en los días 8, 9 y 10, para decaer nuevamente, este tipo de crecimiento en ascendencia y descendencia de la concentración está muy direccionado a que una bacteria no posee una alimentación exacta por día, adicionalmente se puede inferir directamente el uso del hidrocarburo como única fuente de carbono, dado que nuestro medio está prácticamente libre de otros sustratos directos como el extracto de levadura. (Tabla 40) – Anexos

En la siguiente gráfica se aprecia un crecimiento relativamente bajo hasta el día 4, posterior a este el día 5 el crecimiento se dispara con una ABS de 0.058, siendo este crecimiento lo que permite a la bacteria mantener una fluctuación relativa de crecimiento, la cual se mantuvo hasta el día 14. Notoriamente se aprecia una fase de adaptación al medio hasta el día cuarto, y se denota que para el quinto día bacteria emplea el hidrocarburo como fuente de energía. **(Tabla 41)** – *Anexos*

Claramente se percibe un crecimiento desde el día 1, hasta un descenso en el día 4; sin embargo como se aprecia según la gráfica el octavo día la ABS vuelve a incrementarse, mostrando una concentración de ABS 0.078. Claramente lo que revela el gráfico es un uso primordial del hidrocarburo brindado en el medio. **(Tabla 42)** - *Anexos*

La imagen permite denotar crecimiento elevado desde el día 1, con una concentración fluctuante para los días posteriores, a diferencia del día 5 en donde la ABS registrada fue de 0.073, notoriamente también se aprecia crecimiento bacteriano hasta el día 14, lo cual nos indica nuevamente el uso de hidrocarburo por parte de la bacteria inoculada. **(Tabla 43)** - *Anexos*

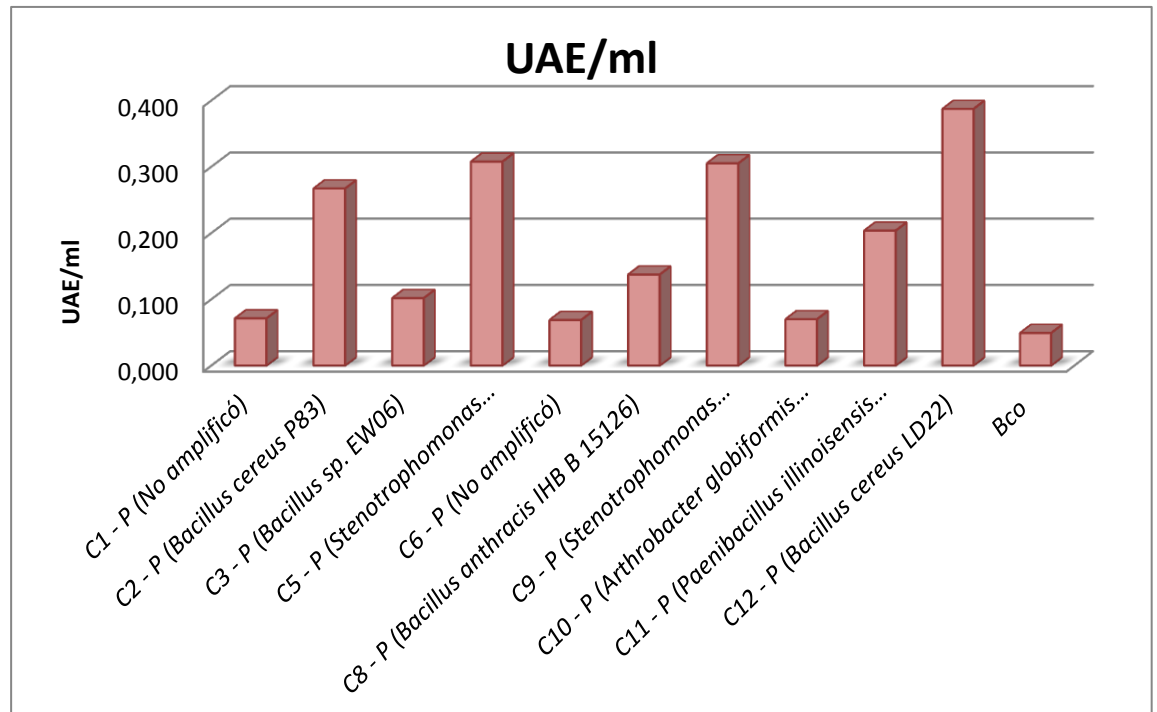
Como se pudo apreciar en nuestra última prueba de crecimiento en la que se sometió a las bacterias ya adaptadas al medio mineral salino, conteniendo únicamente un porcentaje de 0.1 de extracto de levadura, y las cuales respondieron de manera positiva generando todas un determinado crecimiento que se elevó desde el primer día, nos indica que nuestras bacterias habiendo sido sometidas a un crecimiento similar previamente se muestran mejor adaptadas para poder utilizar el hidrocarburo brindado en el medio como su única fuente de carbono, por ende de energía. Adicionalmente a la prueba de concentración generamos un resultado visual el cual engloba a la directa licuefacción del

hidrocarburo en el medio, permitiendo apreciar el mecanismo que tendría un surfactante en un medio oleoso. **(Figura 24)- Anexos**

*Viñas, M.; (2008)*, ha descrito una gran variedad de géneros bacterianos degradadores de HAPs, que incluyen: *Achromobacter*, *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Neptunomonas*, *Nocardia*, *Paenibacillus*, *Porphyrobacter*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Streptomyces*, *Vibrio* y *Xanthomonas*, según la base de datos publicada por la Universidad de Michigan, que reúne cepas degradadoras de moléculas orgánicas como géneros capaces de segregar la enzima alcano monooxigenasa para la degradación de hidrocarburos, con una previa etapa de potenciamiento bacteriano. Así mismo, en nuestros resultados se puede notar coincidencia de algunos géneros y de igual manera la respuesta positiva para crecer en un medio donde la única fuente de carbono ha sido un hidrocarburo, de igual manera el autor señala el trabajo en consorcio de estas bacterias.

#### **12.3.8. Prueba para medir la Actividad Emulsificante generada por cada ml:**

De la prueba efectuada de emulsión se efectuó dos gráficas distintas, en donde se aprecia una clara diferencia entre las bacterias previamente crecidas en medio MSM al 1% de aceite Diesel, y las que fueron activadas directamente de placa.

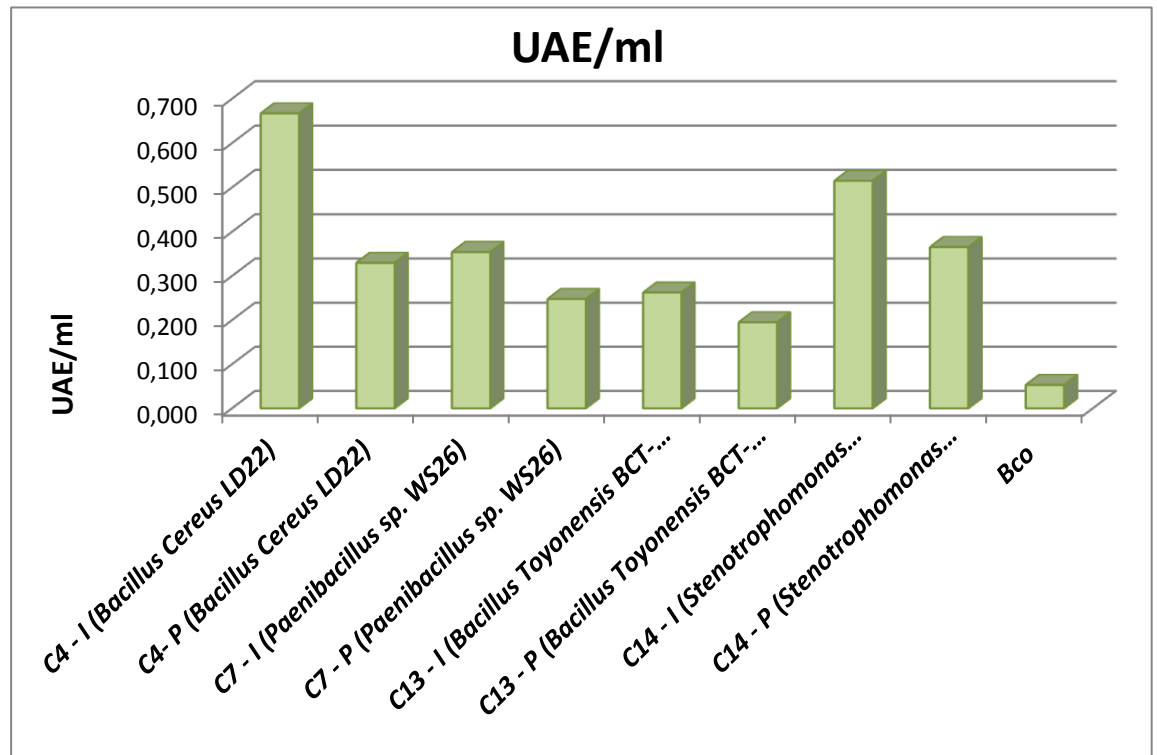


**Figura 22. Actividad Emulsificante de placa**

El gráfico de barras claramente muestra la capacidad de emulsión generada por cada una de las bacterias aisladas; sin embargo se aprecia que aquí no se ha incluido aquellas bacterias con las cuales se trabajó la capacidad de crecimiento a distintas concentraciones de aceite diesel, recortando claramente otras fuentes de energía a parte del hidrocarburo. (*Tabla 44*) – *Anexos*

Lo que se infiere es una baja capacidad de emulsión de aquellas bacterias que fueron reactivadas directamente de placa, en caldo nutritivo por 48 h, por ende se decidió comparar la capacidad de emulsión de bacterias que se encontraron en estado latente, sin ser expuestas al crecimiento en un medio mineral conteniendo hidrocarburos como su única fuente de energía, con respecto a aquellas se encontraron en actividad.

De lo cual se obtuvo una siguiente gráfica de barras:



**Figura 23. Actividad Emulsificante de inóculo vs placa**

En este gráfico, se busca comparar directamente las unidades de actividad emulsificante que se generan a partir de aislados bacterianos que ya han sido expuestos a un medio específico brindándoseles aceite diesel como única fuente de carbono, en el gráfico se aprecia ambos aislados seguidos de la letra I y P, lo cual va a representarse como I= inóculo previamente trabajado, P= inóculo activado directamente de placa, como se aprecia en todos los casos sin excepción existe un mayor índice de UAE/ml en aquellas bacterias que se encontraron en continua actividad, por ende podemos decir que estas bacterias poseen mejor capacidad de emulsión. *(Tabla 45) - Anexos*

L. Tian, P. Ma, (2002), señala una clara evaluación de la presencia del gen que codifica para la enzima alcano monooxigenasa responsable de la producción de un biosurfactante en el género *Bacillus*, resultado que afirmamos con nuestro índice de UAE/ml generadas por nuestra cepa C4.

Nuestros resultados con respecto a la actividad emulsificante de las bacterias identificadas, reflejan un 99.9% de capacidad productiva de unidades emulsificantes, corroboramos estos resultados con la tesis “*Biodegradación de crudo de petróleo en terrarios-UNMSM*”, en donde aislaron microorganismos del género *Pseudomona*, *Serratia* y *Bacillus*, obteniendo una actividad emulsificante fluctuante entre 0.75 UAE/ml y 3.66 UAE/ml, para *Enterobacter agglomerans* 4K-4, y *Pseudomona aeruginosa* 4K-1 respectivamente, lo cual con respecto a nuestros resultados reflejaría una fluctuación mayor con *Bacillus sp. 6Bh-1* con 1.67 UAE/ml, teniendo nosotros a *Bacillus cereus* LD22 con 0.667 UAE/ml, seguido por *Stenotrophomonas maltophilia* 149A con 0.515 UAE/ml, teniendo en cuenta que los factores locales influyeron en ambos trabajos, así mismo el factor tiempo es básico para poder analizar mejor los resultados, puesto que un mayor tiempo de incubación incrementaría nuestros valores; sin embargo se demuestra así que nuestros los aislados bacterianos son capaces de generar un biosurfactante.

## CAPÍTULO V

### 13. CONCLUSIONES

Se puede concluir que:

1. Empleando primers específicos (27F y 519R) para la secuencia que codifica el gen AlkB responsable de la presencia de la enzima alcano monooxigenasa, es posible determinar su existencia en aislados bacterianos de suelos contaminados con hidrocarburos.
2. Es posible aislar microorganismos nativos con capacidad biodegradadora en zonas previamente contaminada con hidrocarburos, para generar consorcios microbianos nativos con fácil adaptación al medio.
3. Se puede llevar a cabo una adecuada identificación y caracterización bacteriana empleando una evaluación morfológica y la identificación molecular gracias a la filogenia de cada microorganismo aislado.
4. Gracias a la técnica de PCR y al uso de cebadores o primers específicos es factible amplificar la secuencia del gen AlkB a la altura de 600pb, en microorganismos con una filogenia relacionada a claros biodegradadores de hidrocarburos.
5. La capacidad biodegradadora de los microorganismos nativos de zonas contaminadas con hidrocarburos, varía con respecto a las concentraciones del hidrocarburo, así mismo, la constante manipulación de estos aislados les permite adaptarse a un medio donde su principal fuente energética es el hidrocarburo presente en el medio.

## CAPÍTULO VI

### 14. RECOMENDACIONES

Como recomendaciones se puede tener los siguientes alcances:

1. Efectuar pruebas para recombinar el gen AlkB en E.coli, facilitaría la reproducción microbiana, sin embargo sería necesario evaluar la capacidad de adaptación de la bacteria para trabajar en campo.
2. Realizar pruebas adicionales para determinar la capacidad emulsificante bacteriana, como se señala existen pruebas de sonicación, y el ensayo de 2,6 DCPIP (Diclorofenol-indofenol), para detectar la presencia de la enzima alcano monooxigenasa.
3. Así mismo se recomienda evaluar la capacidad biodegradadora en muestras directas de suelo, gracias a técnicas como cromatografía de gases o cromatografía en placa, como señalan algunos autores.
4. Aplicar esta investigación en nuestra región, en los lugares donde se conozca que se ha generado derrames continuos de hidrocarburos en el suelo, para poder identificar las bacterias presentes, las cuales probablemente posean gran actividad biodegradadora.
5. Existen publicaciones que hacen referencia a efectividad de degradación con hidrocarburos específicos, lo cual da pie para sugerir pruebas similares con hidrocarburos de cadena más compleja, a un mayor tiempo de trabajo bacteriano.

## CAPÍTULO VII

### 15. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

- Boopathy R (2000) Formation of aniline as a transient metabolite during the metabolism of tetryl by a sulfate-reducing bacterial consortium. *Curr Microbiol* 40:190–193.
- Briones AM, Okabe S, Umemiya Y, Ramsing N-B, Reichardt W, Okuyama H (2003) Ammonia-oxidizing bacteria on root biofilms and their possible contribution to N use efficiency of different rice cultivars. *Plant Soil* 250:335–348
- Chang JI, Lin C-C (2006) A study of storage tank accidents. *J Loss Prevent* 19:51–59
- D’Annibale A, Rosetto F, Leonardi V, Federici F, Petruccioli M (2006) Role of autochthonous filamentous fungi in bioremediation of a soil historically contaminated with aromatic hydro-carbons. *Appl Environ Microbiol* 72:28–36
- Daniel R (2005) The metagenomics of soil. *Nat Rev Microbiol* 3: 470–478
- Dean SM, Jin Y, Cha DK, Wilson SV, Radosevich M (2001) Phenanthrene degradation in soils co-inoculated with phenanthrene-degrading and biosurfactant-producing bacteria. *J Environ Qual* 30:1126–1133
- Gentry TJ, Rensing C, Pepper IL (2004) New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. *Crit Rev Environ Sci Technol* 34:447–494
- Margesin R, Schinner F (2001) Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl Microbiol Bio-technol* 56:650–663
- Rahman KSM, Rahman TJ, Kourkoutas Y, Petsas I, Marchant R, Banat IM (2003) Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresour Technol* 90:159–168
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edn, vol 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press,

- Cold Spring Harbor, N. Y., pp 1.31–1.42. ISBN 0-87969-577-3
- Singer AC, van der Gast CJ, Thompson IP (2005) Perspectives and vision for strain selection in bioaugmentation. *Trends Biotechnol* 23:74–77
- Ueno A (2006) Studies on petroleum degradation in *Pseudomonas aeruginosa* strain WatG-added soil microcosms and their bacterial community change analysis by molecular biological approach. Doctoral thesis of Hokkaido University. Sapporo, Japan
- Ueno A, Hasanuzzaman M, Yumoto I, Okuyama H (2006)
- Verification of degradation of n-alkane in diesel oil by *Pseudo-monas aeruginosa* strain WatG in soil microcosms. *Curr Microbiol* 52:182–185
- Ueno A, Ito Y, Yamamoto Y, Yumoto I, Okuyama H (2006b) Bacterial community changes in diesel-oil-contaminated soil microcosms biostimulated with Luria–Bertani medium or bio-augmented with a petroleum-degrading bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* strain WatG. *J Basic Microbiol* 46:310–317
- Van Hamme JD, Singh A, Ward OP (2003) Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:503–549
- Vogel TM (1996) Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Curr Opin Biotechnol* 7:311–316
- Wongsu P, Tanaka M, Ueno A, Hasanuzzaman M, Yumoto I, Okuyama H (2004) Isolation and characterization of novel strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* possessing high efficiency to degrade gasoline, kerosene, diesel oil, and lubricating oil. *Curr Microbiol* 49:415–422
- Ueno A (2006) Studies on petroleum degradation in *Pseudomonas aeruginosa* strain WatG-added soil microcosms and their bacterial community change analysis by molecular biological approach. Doctoral thesis of Hokkaido University. Sapporo, Japan
- Ueno A, Hasanuzzaman M, Yumoto I, Okuyama H (2006a)
- Verification of degradation of n-alkane in diesel oil by *Pseudo-monas aeruginosa* strain WatG in soil microcosms. *Curr Microbiol* 52:182–185

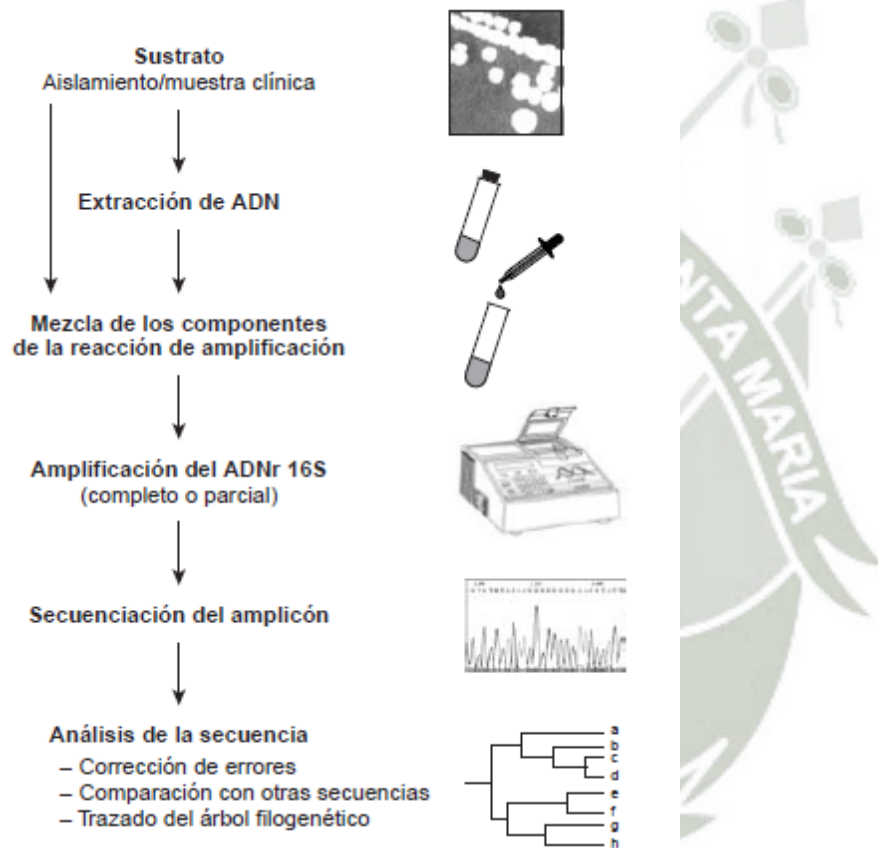
- Dean SM, Jin Y, Cha DK, Wilson SV, Radosevich M (2001) Phenanthrene degradation in soils co-inoculated with phenanthrene-degrading and biosurfactant-producing bacteria. *J Environ Qual* 30:1126–1133
- Gentry TJ, Rensing C, Pepper IL (2004) New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. *Crit Rev Environ Sci Technol* 34:447–494
- Margesin R, Schinner F (2001) Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl Microbiol Bio-technol* 56:650–663
- Rahman KSM, Rahman TJ, Kourkoutas Y, Petsas I, Marchant R, Banat IM (2003) Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresour Technol* 90:159–168
- Singer AC, van der Gast CJ, Thompson IP (2005) Perspectives and vision for strain selection in bioaugmentation. *Trends Biotechnol* 23:74–77
- Makkar R, Cameotra S & Banat I (2011) Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express* 1:5.
- MADIGAN, M. T. (2004) *Biología de los Microorganismos*, 10ª edición, Pearson-Prentice Hall, Madrid (España).
- BANWART, G. (1982). *Microbiología básica* Ed. Bellaterra, primera edición, Barcelona, España.
- BOURGEOIS, C. (1994). *Microbiología alimentaria. Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad*. Ed. Acribia, Zaragoza, España
- WISTREICH, G.A. (1983). *Prácticas de laboratorio en Microbiología*. Primera edición. Editorial Limusa. México. 54-55p.
- Clarridge III JE. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 840-862.
- Janda JM, Abbott SL. ARNr 16S gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2761-2764.

## CAPÍTULO VIII

### 16. ANEXOS

#### 16.1. Figuras

*Figura 1. Etapas del proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S*



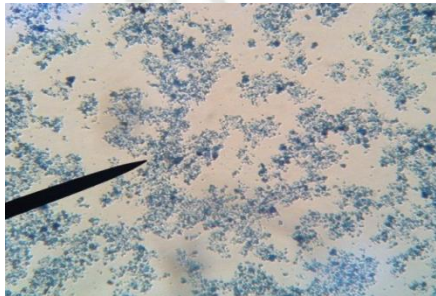
*Figura 2. Zona de muestreo (Parque Cultural)*



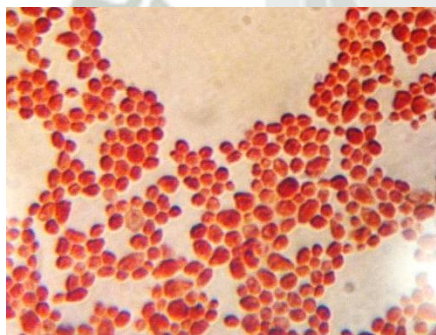
*Figura 3. Secado, y procesamiento de la muestra*



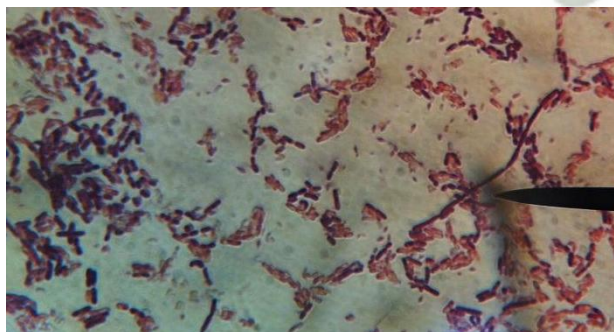
*Figura 4. Capturas de colonia crecida en caldo MSM, teñida con colorante azul de coomassie.*



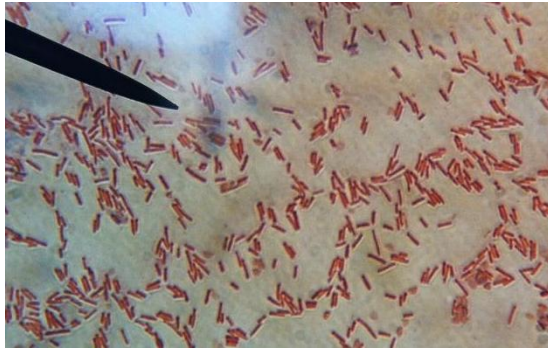
*Figura 5. Captura de colonias globulares con tinción de gram (-)*



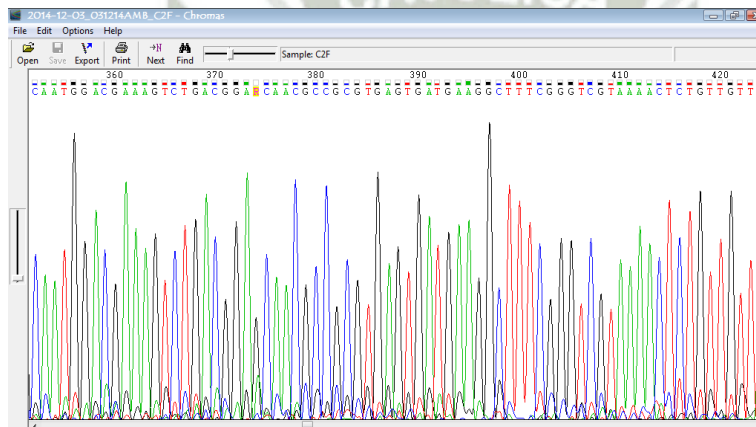
*Figura 6. Captura de colonias bacilares gram (+)*



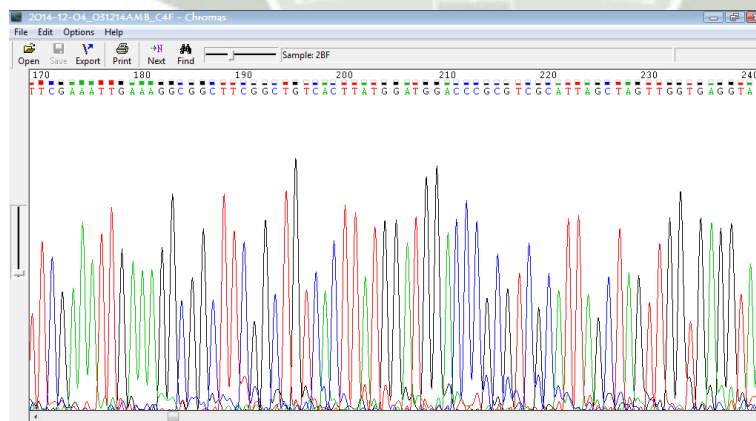
**Figura 7. Captura de colonias bacilares gram (-)**



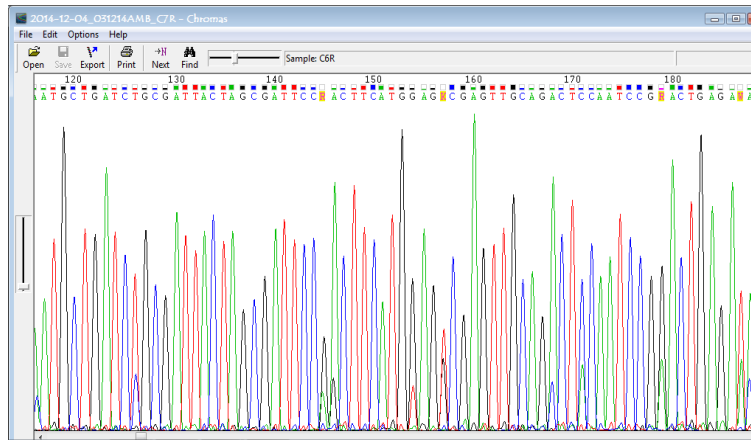
**Figura 10. Captura de los electroferogramas a partir de la secuenciación del DNA bacteriano.**



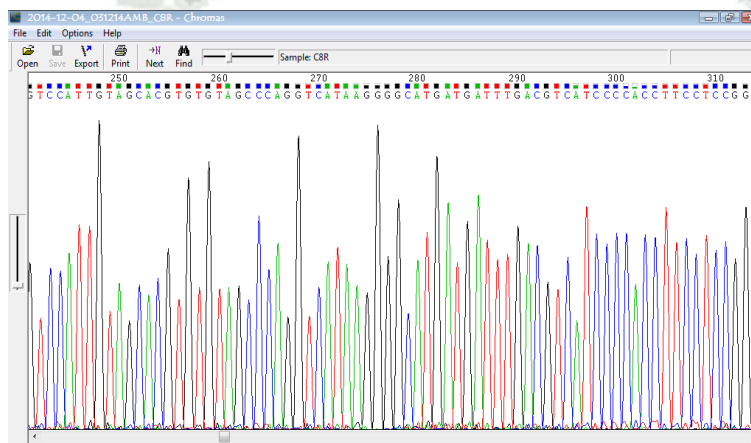
*C2 - Bacillus cereus P83*



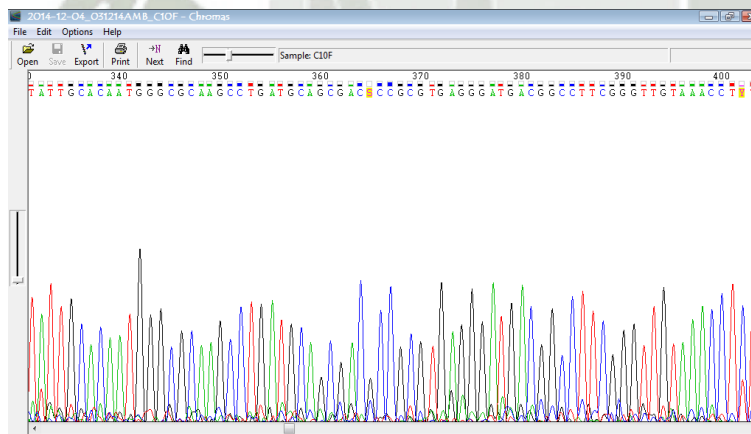
*C4 - Bacillus cereus LD22*



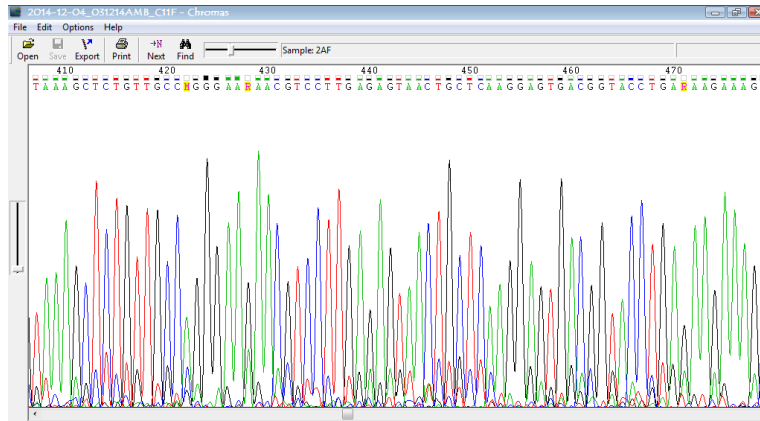
*C7 - Paenibacillus sp.*



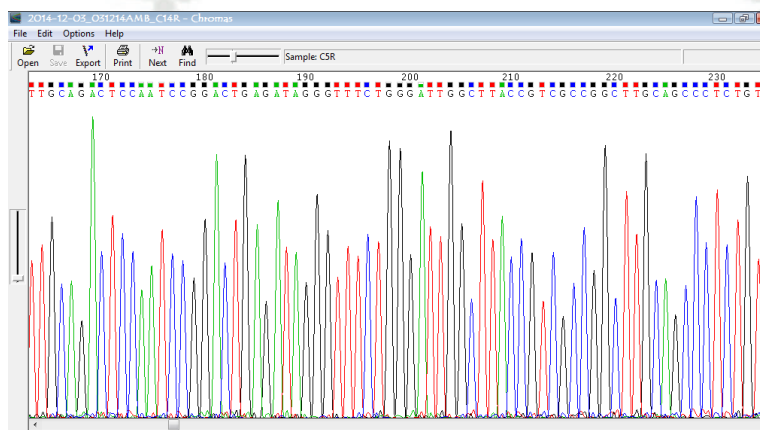
*C8 - Bacillus anthracis  
IHB B 15126*



*C10 - Arthrobacter  
globiformis A2S3*

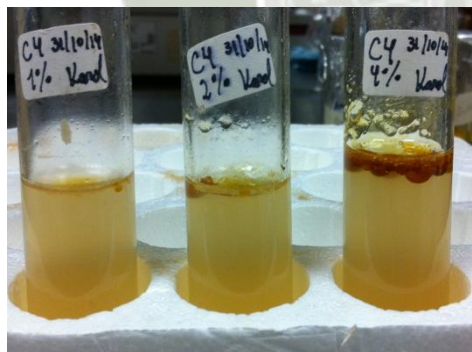


*C11 - Paenibacillus  
illinoisensis YZ29*

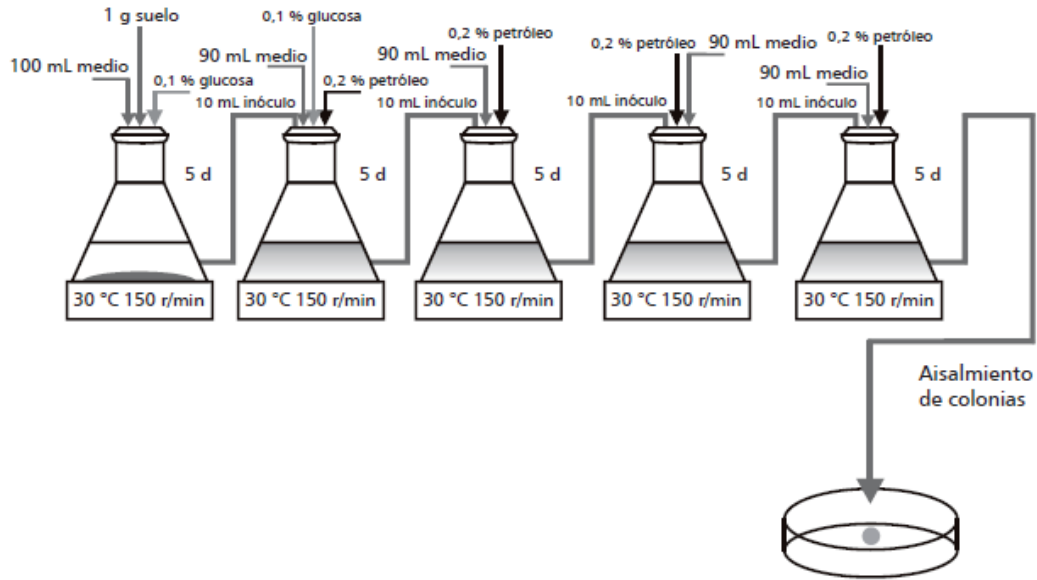


*C14 - Stenotrophomonas  
maltophilia 149A*

**Figura 16. Crecimiento bacteriano en MSM alternativo, a distintas concentraciones de aceite diesel**



*Figura 19. Esquema del sistema de enriquecimiento secuencial para el aislamiento de cepas bacterianas degradadoras de petróleo a partir de suelos contaminados con crudo.*



*Figura 21. Crecimiento bacteriano en MSM NO ALTERNATIVO, demostrando propiedad emulsificante*



## 16.2. Tablas

• **Tabla 3. Protocolo KIT PROMEGA de extracción de ADN**

<b>Aislamiento de ADN genómico de bacterias Gram positivas y bacterias gram negativas</b>	
<i>Materiales a ser suministrados por el usuario</i>	<i>Procedimiento</i>
• Tubos de microcentrífuga de 1,5 ml	1. Añadir 1 ml de un cultivo de una noche a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
• Baño de agua, 80 ° C	2. Centrifugar a 13,000-16,000 × g durante 2 minutos para sedimentar las células. Eliminar el sobrenadante. <b>Para las bacterias Gram positivas, continúe en el paso 3. Para las bacterias Gram negativas van directamente al Paso 6.</b>
• Baño de agua, 37 ° C	3. Resuspender las células a fondo en 480µl de 50 mM EDTA.
• Isopropanol, temperatura ambiente	4. Añadir la lisozima al sedimento celular resuspendido en un volumen total de 120µl, y pipetear suavemente para mezclar.
• 70% de etanol, la temperatura ambiente	5. Incubar la muestra a 37 ° C durante 30-60 minutos. Centrifugar durante 2 minutos a 13,000-16,000 × g y retirar el sobrenadante.
• Baño de agua, 65 ° C (opcional; para la rehidratación rápida de ADN)	6. Agregar 600µl de Solución de lisis de Nucleótidos. Pipetear suavemente hasta resuspender las células.
• 50 mM EDTA (pH 8,0) (para las bacterias gram positivas)	7. Incubar a 80 ° C durante 5 minutos para lisar las células; a continuación, enfriar a temperatura ambiente.
• 10 mg/ml de lisozima (Sigma Cat. # L7651) (para las bacterias gram positivas)	8. Añadir 3µl de RNasa a la solución de lisado celular. Invierta el tubo 2-5 veces para mezclar.
	9. Incubar a 37 ° C durante 15-60 minutos. Enfriar la muestra a temperatura ambiente.
	10. Agregar 200µl de Solución precipitación de proteínas al lisado celular tratado con RNasa. Vortex vigorosamente a alta velocidad durante 20 segundos para mezclar la solución precipitación de proteínas con el lisado celular.
	11. Incubar la muestra en hielo durante 5 minutos.
	12. Centrifugar a 13,000-16,000 × g durante 3 minutos.
	13. Transferir el sobrenadante que contiene el ADN a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml que contiene 600µl isopropanol temperatura ambiente.
	14. mezclar suavemente por inversión hasta que las hebras de hilo de ADN forman una masa visible.
	15. Centrifugar a 13,000-16,000 × g durante 2 minutos.
	16. Vierta cuidadosamente el sobrenadante y escurrir el tubo sobre papel absorbente limpio. Añadir 600µl de Etanol 70% temperatura ambiente e invertir suavemente varias veces para lavar el pellet de ADN.
	17. Centrifugar a 13,000-16,000 × g durante 2 minutos. Aspirar con cuidado el etanol.
	18. Vacíe el tubo sobre papel absorbente limpio y permitir que el precipitado se seque al aire durante 10-15 minutos.
	19. Añadir 100 µl de solución rehidratante de ADN e incubar a 65°C durante 1 hora. Periódicamente mezclar la solución golpeando suavemente el tubo.

- **Tabla 13. Resultados de cuantificación de muestras y concentración a emplear.**

<i>Muestra</i>	<i>ABS<sub>260</sub></i>	<i>Vol. Final (ul)</i>	<i>C<sub>2</sub> (ug)</i>	<i>Vol de muestra (ul)</i>	
<b>C1</b>	0.681	10	0.681	<b>0.73421439</b>	9.26578561
<b>C2</b>	2.978	10	2.978	<b>0.16789792</b>	9.83210208
<b>C3</b>	0.524	10	0.524	<b>0.95419847</b>	9.04580153
<b>C4</b>	0.558	10	0.558	<b>0.89605735</b>	9.10394265
<b>C5</b>	17.293	10	17.293	<b>0.02891343</b>	9.97108657
<b>C6</b>	2.713	10	2.713	<b>0.18429783</b>	9.81570217
<b>C7</b>	6.59	10	6.59	<b>0.07587253</b>	9.92412747
<b>C8</b>	1.79	10	1.79	<b>0.27932961</b>	9.72067039
<b>C9</b>	0.334	10	0.334	<b>1.49700599</b>	8.50299401
<b>C10</b>	12.292	10	12.292	<b>0.04067686</b>	9.95932314
<b>C11</b>	3.224	10	3.224	<b>0.15508685</b>	9.84491315
<b>C12</b>	3.75	10	3.75	<b>0.13333333</b>	9.86666667
<b>C13</b>	0.308	10	0.308	<b>1.62337662</b>	8.37662338
<b>C14</b>	21.827	10	21.827	<b>0.02290741</b>	9.97709259

*Cuadro de resultados de concentración gracias a la ABS<sub>260</sub> para el volumen de DNA a tomar de cada muestra (en negrita), y el volumen de enrase (costado derecho), hasta llegar a 10ul como volumen final.*

- **Tabla 19**

<b>C4-1%</b>			
<b>Día</b>	<b>Abs</b>	<b>Abs-Bco</b>	
0	0.099	<b>0.097</b>	
3	0.285	<b>0.283</b>	
4	0.124	<b>0.122</b>	
5	0.13	<b>0.128</b>	
6	0.135	<b>0.133</b>	
7	0.106	<b>0.104</b>	
8	0.096	<b>0.094</b>	
10	0.078	<b>0.076</b>	
11	0.081	<b>0.079</b>	

• **Tabla 20**

<b>C7-1%</b>		
Día	Abs	<b>Abs-Bco</b>
0	0.023	<b>0.021</b>
3	0.059	<b>0.057</b>
4	0.053	<b>0.051</b>
5	0.043	<b>0.041</b>
6	0.055	<b>0.053</b>
7	0.066	<b>0.064</b>
8	0.068	<b>0.066</b>
10	0.053	<b>0.051</b>
11	0.052	<b>0.05</b>

• **Tabla 21**

<b>C13-1%</b>		
Día	Abs	<b>Abs-Bco</b>
0	0.089	<b>0.087</b>
3	0.184	<b>0.182</b>
4	0.091	<b>0.089</b>
5	0.085	<b>0.083</b>
6	0.087	<b>0.085</b>
7	0.086	<b>0.084</b>
8	0.075	<b>0.073</b>
10	0.078	<b>0.076</b>
11	0.125	<b>0.123</b>
<b>BCO-1%</b>		

• **Tabla 22**

<b>C14-1%</b>		
Día	Abs	<b>Abs-Bco</b>
0	0.069	<b>0.067</b>
3	0.173	<b>0.171</b>
4	0.142	<b>0.14</b>
5	0.141	<b>0.139</b>
6	0.127	<b>0.125</b>
7	0.122	<b>0.12</b>
8	0.12	<b>0.118</b>
10	0.104	<b>0.102</b>
11	0.116	<b>0.114</b>

• **Tabla 23**

<b>C4-2%</b>		
Día	Abs	<b>Abs-Bco</b>
0	0.076	<b>0.075</b>
3	0.111	<b>0.11</b>
4	0.074	<b>0.073</b>
5	0.123	<b>0.122</b>
6	0.08	<b>0.079</b>
7	0.128	<b>0.127</b>
8	0.092	<b>0.091</b>
10	0.077	<b>0.076</b>
11	0.076	<b>0.075</b>

• **Tabla 24**

<b>C7-2%</b>		
Día	Abs	<b>Abs-Bco</b>
0	0.023	<b>0.022</b>
3	0.059	<b>0.058</b>
4	0.061	<b>0.06</b>
5	0.08	<b>0.079</b>
6	0.044	<b>0.043</b>
7	0.058	<b>0.057</b>
8	0.053	<b>0.052</b>
10	0.052	<b>0.051</b>
11	0.047	<b>0.046</b>

• **Tabla 25**

<b>C13-2%</b>		
Día	Abs	<b>Abs-Bco</b>
0	0.033	<b>0.032</b>
3	0.085	<b>0.084</b>
4	0.093	<b>0.092</b>
5	0.104	<b>0.103</b>
6	0.101	<b>0.1</b>
7	0.12	<b>0.119</b>
8	0.075	<b>0.074</b>
10	0.097	<b>0.096</b>
11	0.088	<b>0.087</b>

• **Tabla 26**

<b>C14-2%</b>		
Día	Abs	<b>Abs-Bco</b>
0	0.058	<b>0.057</b>
3	0.135	<b>0.134</b>
4	0.241	<b>0.24</b>
5	0.182	<b>0.181</b>
6	0.14	<b>0.139</b>
7	0.125	<b>0.124</b>
8	0.1	<b>0.099</b>
10	0.114	<b>0.113</b>
11	0.1	<b>0.099</b>

• **Tabla 27**

<b>C4-4%</b>		
Día	Abs	<b>Abs-Bco</b>
0	0.073	<b>0.071</b>
3	0.213	<b>0.211</b>
4	0.184	<b>0.182</b>
5	0.107	<b>0.105</b>
6	0.169	<b>0.167</b>
7	0.112	<b>0.11</b>
8	0.125	<b>0.123</b>
10	0.103	<b>0.101</b>
11	0.089	<b>0.087</b>

• **Tabla 28**

<b>C7-4%</b>		
Día	Abs	<b>Abs-Bco</b>
0	0.021	<b>0.019</b>
3	0.06	<b>0.058</b>
4	0.059	<b>0.057</b>
5	0.065	<b>0.063</b>
6	0.043	<b>0.041</b>
7	0.054	<b>0.052</b>
8	0.029	<b>0.027</b>
10	0.034	<b>0.032</b>
11	0.033	<b>0.031</b>

• **Tabla 29**

<b>C13-4%</b>		
Día	Abs	<b>Abs-Bco</b>
0	0.032	<b>0.03</b>
3	0.054	<b>0.052</b>
4	0.139	<b>0.137</b>
5	0.141	<b>0.139</b>
6	0.192	<b>0.19</b>
7	0.109	<b>0.107</b>
8	0.079	<b>0.077</b>
10	0.044	<b>0.042</b>
11	0.048	<b>0.046</b>

• **Tabla 30**

<b>C14-4%</b>		
Día	Abs	<b>Abs-Bco</b>
0	0.055	<b>0.053</b>
3	0.114	<b>0.112</b>
4	0.121	<b>0.119</b>
5	0.293	<b>0.291</b>
6	0.119	<b>0.117</b>
7	0.112	<b>0.11</b>
8	0.115	<b>0.113</b>
10	0.085	<b>0.083</b>
11	0.127	<b>0.125</b>

• **Tabla 31**

<b>C4-6%</b>		
Día	Abs	<b>Abs-Bco</b>
0	0.029	<b>0.027</b>
1	0.44	<b>0.438</b>
2	0.321	<b>0.319</b>
3	0.163	<b>0.161</b>
4	0.163	<b>0.161</b>
6	0.14	<b>0.138</b>
7	0.11	<b>0.108</b>
8	0.141	<b>0.139</b>
9	0.087	<b>0.085</b>

• **Tabla 32**

<b>C7-6%</b>		
Día	Abs	<b>Abs-Bco</b>
0	0.023	<b>0.021</b>
1	0.251	<b>0.249</b>
2	0.101	<b>0.099</b>
3	0.125	<b>0.123</b>
4	0.039	<b>0.037</b>
6	0.05	<b>0.048</b>
7	0.05	<b>0.048</b>
8	0.015	<b>0.013</b>
9	0.049	<b>0.047</b>

• **Tabla 33**

<b>C13-6%</b>		
Día	Abs	<b>Abs-Bco</b>
0	0.032	<b>0.03</b>
1	0.229	<b>0.227</b>
2	0.272	<b>0.27</b>
3	0.246	<b>0.244</b>
4	0.182	<b>0.18</b>
6	0.356	<b>0.354</b>
7	0.311	<b>0.309</b>
8	0.428	<b>0.426</b>
9	0.517	<b>0.515</b>

• **Tabla 34**

<b>C14-6%</b>		
Día	Abs	<b>Abs-Bco</b>
0	0.044	<b>0.042</b>
1	0.152	<b>0.15</b>
2	0.143	<b>0.141</b>
3	0.186	<b>0.184</b>
4	0.135	<b>0.133</b>
6	0.165	<b>0.163</b>
7	0.132	<b>0.13</b>
8	0.1	<b>0.098</b>
9	0.129	<b>0.127</b>

• **Tabla 35**

<b>C4-8%</b>		
Día	Abs	<b>Abs-Bco</b>
0	0.033	<b>0.032</b>
1	0.296	<b>0.295</b>
2	0.256	<b>0.255</b>
3	0.287	<b>0.286</b>
4	0.253	<b>0.252</b>
6	0.208	<b>0.207</b>
7	0.146	<b>0.145</b>
8	0.185	<b>0.184</b>
9	0.213	<b>0.212</b>

• **Tabla 36**

<b>C7-8%</b>		
Día	Abs	<b>Abs-Bco</b>
0	0.023	<b>0.022</b>
1	0.118	<b>0.117</b>
2	0.052	<b>0.051</b>
3	0.028	<b>0.027</b>
4	0.046	<b>0.045</b>
6	0.024	<b>0.023</b>
7	0.032	<b>0.031</b>
8	0.029	<b>0.028</b>
9	0.03	<b>0.029</b>

• **Tabla 37**

<b>C13-8%</b>		
Día	Abs	<b>Abs-Bco</b>
0	0.041	<b>0.04</b>
1	0.572	<b>0.571</b>
2	0.471	<b>0.47</b>
3	0.314	<b>0.313</b>
4	0.275	<b>0.274</b>
6	0.417	<b>0.416</b>
7	0.435	<b>0.434</b>
8	0.471	<b>0.47</b>
9	0.454	<b>0.453</b>

• **Tabla 38**

<b>C14-8%</b>		
<b>Día</b>	<b>Abs</b>	<b>Abs-Bco</b>
0	0.049	<b>0.048</b>
1	0.202	<b>0.201</b>
2	0.109	<b>0.108</b>
3	0.131	<b>0.13</b>
4	0.151	<b>0.15</b>
6	0.12	<b>0.119</b>
7	0.097	<b>0.096</b>
8	0.139	<b>0.138</b>
9	0.13	<b>0.129</b>

• **Tabla 40**

<b>C4</b>		
<b>Día</b>	<b>ABS</b>	<b>ABS-ABS0</b>
0	0.006	0.006
1	0.059	0.057
2	0.064	0.062
3	0.048	0.046
4	0.038	0.036
5	0.041	0.039
7	0.031	0.029
8	0.046	0.044
9	0.048	0.046
10	0.047	0.045
13	0.035	0.033
14	0.042	0.04

• **Tabla 41**

<b>C7</b>		
<b>Día</b>	<b>ABS</b>	<b>ABS-ABS0</b>
0	0.005	0.005
1	0.012	0.01
2	0.02	0.018
3	0.018	0.016
4	0.017	0.015
5	0.06	0.058
7	0.049	0.047
8	0.058	0.056
9	0.054	0.052
10	0.052	0.05
13	0.042	0.04
14	0.056	0.054

• **Tabla 42**

C13		
Día	ABS	ABS-ABS <sub>0</sub>
0	0.004	0.004
1	0.061	0.059
2	0.061	0.059
3	0.064	0.062
4	0.043	0.041
5	0.042	0.04
7	0.064	0.062
8	0.08	0.078
9	0.047	0.045
10	0.055	0.053
13	0.054	0.052
14	0.04	0.038

• **Tabla 43**

C14		
Día	ABS	ABS-ABS <sub>0</sub>
0	0.003	0.003
1	0.062	0.06
2	0.062	0.06
3	0.047	0.045
4	0.058	0.056
5	0.075	0.073
7	0.066	0.064
8	0.068	0.066
9	0.06	0.058
10	0.05	0.048
13	0.055	0.053
14	0.068	0.066

• **Tabla 44**

Actividad Emulsificante		
Muestra	ABS 540nm	UAE/ml
C1 - P (No amplificó)	0.058	0.071
C2 - P ( <i>Bacillus cereus</i> P83)	0.218	0.267
C3 - P ( <i>Bacillus</i> sp. EW06)	0.083	0.102
C5 - P ( <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 149A)	0.251	0.308
C6 - P (No amplificó)	0.056	0.069
C8 - P ( <i>Bacillus anthracis</i> IHB B 15126)	0.112	0.137
C9 - P ( <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> sp.)	0.249	0.305
C10 - P ( <i>Arthrobacter globiformis</i> A2S3)	0.057	0.070
C11 - P ( <i>Paenibacillus illinoisensis</i> YZ29)	0.166	0.203
C12 - P ( <i>Bacillus cereus</i> LD22)	0.316	0.387
<b>Bco</b>	<b>0.03</b>	0.037

• **Tabla 45**

<b>Actividad Emulsificante</b>		
<b>Muestra</b>	<b>ABS 540nm</b>	<b>UAE/ml</b>
<b>C4 - I</b> ( <i>Bacillus Cereus LD22</i> )	0.544	0.667
<b>C4 - P</b> ( <i>Bacillus Cereus LD22</i> )	0.269	0.330
<b>C7 - I</b> ( <i>Paenibacillus sp. WS26</i> )	0.289	0.354
<b>C7 - P</b> ( <i>Paenibacillus sp. WS26</i> )	0.202	0.248
<b>C13 - I</b> ( <i>Bacillus Toyonensis BCT-7112</i> )	0.214	0.262
<b>C13 - P</b> ( <i>Bacillus Toyonensis BCT-7112</i> )	0.159	0.195
<b>C14 - I</b> ( <i>Stenotrophomonas maltophilia 149A</i> )	0.420	0.515
<b>C14 - P</b> ( <i>Stenotrophomonas maltophilia 149A</i> )	0.298	0.365
<b>Bco</b>	<b>0.043</b>	0.053

