



Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Medicina
Departamento de Estudios Avanzados
Maestría en Ciencias de la Salud

**“Identificación de actinobacterias halófilas con capacidad
para degradar hidrocarburos policíclicos aromáticos”**

TESIS

Que para Obtener el Grado de
Maestra en Ciencias de la Salud

Presenta:

Q.F.B. Lorna Catalina Can Ubando

Comité de Tutores

Dra. Ninfa Ramírez Durán

Tutora Académica

Dr. Martín Pablo Antonio Moreno Pérez

Tutor Interno

Dr. Ángel Horacio Sandoval Trujillo

Tutor externo

INDICE

	No. página
Resumen	4
Summary	5
1. Antecedentes	
1.1 Actinobacterias.	6
1.1.1 Actinobacterias extremófilas.	6
1.1.2 Actinobacterias halófilas.	7
1.2 Ambientes extremos	7
1.2.1 Ex lago de Texcoco	8
1.3 Hidrocarburos.	9
1.3.1 Generalidades.	9
1.3.2 Contaminación con hidrocarburos.	10
1.3.3 Hidrocarburos aromáticos.	11
1.3.4 Hidrocarburos policíclicos aromáticos.	11
1.3.4.1 Antraceno.	12
1.3.4.2 Fenantreno.	12
1.3.4.3 Fluoranteno.	13
1.3.4.4 Pireno.	13
1.3.5 Daños a la salud.	13
1.4 Biorremediación.	14
1.4.1 Biorremediación en ambientes salinos	15
1.5 Estudios antecedentes.	16
2. Planteamiento del Problema.	18
3. Hipótesis.	18
4. Objetivos.	19
5. Justificación.	20
6. Material y Métodos.	
6.1. Diseño de estudio.	22
6.2. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.	22
6.3. Procedimientos.	22
6.4. Variables de Estudio.	32
6.5. Implicaciones Bioéticas.	34
7. Resultados	

7.1	Nombre del artículo	34
7.1.1	Carta de envío	35
7.1.2	Resumen	36
7.1.3	Abstract	36
7.1.4	Introducción	37
7.1.5	Apartados del artículo	40
8.	Resultados adicionales	63
8.1	Puntos de muestreo	63
8.2	Caracterización morfológica	64
8.3	Tolerancia a Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos	74
9.	Conclusiones	
9.1	Conclusiones Generales	75
9.2	Limitaciones	76
9.3	Recomendaciones	76
10.	Referencias Bibliográficas.	76

RESUMEN

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos son un grupo de contaminantes orgánicos que impiden el intercambio gaseoso de las áreas en las que se encuentran, provocando así un daño al ecosistema. Los procesos de biorremediación son la primera opción para el tratamiento de áreas contaminadas con hidrocarburos policíclicos aromáticos; así mismo, las actinobacterias halófilas son una alternativa eficaz para los ambientes salinos.

El objetivo de la presente investigación fue el aislamiento y la identificación de actinobacterias halófilas y halotolerantes provenientes del territorio sódico salino perteneciente al ex lago de Texcoco; con el fin de determinar su posible capacidad de degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (antraceno, fenantreno, fluoranteno y pireno). Las cepas aisladas fueron caracterizadas morfológica y fisiológicamente para su posterior selección. También se les realizó una prueba colorimétrica de biodegradación para identificar a las cepas con potencial degradador. Como resultado de este estudio, se aislaron 43 cepas de actinobacterias halófilas y halotolerantes; de las cuales, se seleccionaron 6 cepas que presentaron un resultado positivo en la prueba colorimétrica de biodegradación (de azul a incoloro); el cambio en la coloración se evaluó a través de espectrofotometría Uv-vis. De igual forma, la prueba demuestra que las cepas seleccionadas son capaces de utilizar los hidrocarburos policíclicos aromáticos estudiados como única fuente de carbono.

Esta investigación sugiere que el ex lago de Texcoco es un ecosistema en el cual se puede encontrar una amplia diversidad de actinobacterias con potencial biotecnológico que podrían ser utilizadas en la biorremediación de ambientes salinos y alcalinos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos.

SUMMARY

Polycyclic aromatic hydrocarbons are a group of organic pollutants that prevent the gas exchange of the areas in which they are found, thus causing damage to the ecosystem. Bioremediation processes are the first option for the treatment of areas contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons; likewise, halophilic actinobacteria are an effective alternative for saline environments.

The objective of the present investigation was the isolation and identification of halophilic and halotolerant actinobacteria coming from the saline sodium territory belonging to the former lake of Texcoco; in order to determine their possible degradation capacity of polycyclic aromatic hydrocarbons (anthracene, phenanthrene, fluoranthene and pyrene). The isolated strains were characterized morphologically and physiologically for their later selection. Also, they underwent a colorimetric biodegradation test to identify the strains with degrading potential. As a result of this study, 43 strains of halophilic and halotolerant actinobacteria were isolated; of which, 6 strains were selected that showed a positive result in the colorimetric biodegradation test (from blue to colorless); the change in coloration was evaluated through Uv-vis spectrophotometry. Alike, the test shows that the selected strains are capable of using the aromatic polycyclic hydrocarbons studied as the only carbon source.

This research suggests that the former lake of Texcoco is an ecosystem in which a wide diversity of actinobacteria with biotechnological potential can be found that could be used in the bioremediation of saline and alkaline environments contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons.

1. Antecedentes

1.1. Actinobacterias

Las actinobacterias son un grupo de bacterias trascendente en la ecología del suelo porque llevan a cabo la función de reciclar la materia orgánica acumulada. Producen una amplia gama de enzimas extracelulares y una vasta variedad de metabolitos secundarios (Medina, y col., 2011).

Estas bacterias tienen una extensa variedad morfológica y genética, así como un alto contenido de Guanina-Citosina en su ADN. Crecen formando filamentos delgados, parecidos a los de los hongos, pero de menor diámetro. Su pH ideal de crecimiento va desde neutral hasta un ambiente alcalino (Sharma y col., 2012)

Las actinobacterias son bacterias Gram positivas, especializadas y de gran importancia económica. Estas bacterias son encontradas principalmente en suelos. Por otro lado, algunas actinobacterias pueden ser patógenas para los seres humanos; son encontradas principalmente en la cavidad oral de humanos y animales (McKinney, 2004).

1.1.1. Actinobacterias extremófilas

El término extremófilo fue usado por primera vez por MacElroy en 1974; es un término relativo, ya que los ambientes que pueden ser extremos para un organismo, pueden ser esenciales para la supervivencia de otro (MacElroy, 1974)

Los microorganismos aislados de ecosistemas extremos tienen la capacidad de adaptarse a ambientes poco favorables, lo que puede indicar un potencial biotecnológico (Morozkina, 2010).

Las actinobacterias extremófilas se clasifican en función de las características fisicoquímicas del ambiente en el que su crecimiento fue óptimo. Se clasifican en varias categorías: a) termófilas: crecimiento óptimo a temperaturas $\geq 50^{\circ}\text{C}$; b) halófilas: requieren del 3% - 30% de concentración de sal para crecer; c) psicrófilas; el

crecimiento es en temperaturas menores a 15 °C; d) alcalófilas: exhiben un crecimiento ideal a valores de pH alrededor de 9; e) acidófilas: crecimiento ideal en $\text{pH} \leq 3$; f) piezófilas: requieren de altas presiones hidrostáticas (Durvasula, 2018).

Así mismo, las actinobacterias extremotolerantes y extremoresistentes se clasifican en: a) metalotolerantes: toleran altas concentraciones (>1 mM) de metales pesados en su ecosistema; b) radioresistentes: son capaces de proteger sus proteínas citosólicas de la oxidación, toleran alta radiación ionizante y resisten la desecación prolongada (Rampelotro, 2016).

1.1.2. Actinobacterias halófilas

Las actinobacterias halófilas se categorizan como halófilas extremas (concentración de sal de 2.5 – 5.2 M), límite de halófilas extremas (contenido de sal de 1.5 – 4 M), halófilas moderadas (concentración de sal de 0.5 – 2.5 M) y halotolerantes, que no requieren la presencia de sal para su crecimiento pero pueden desarrollarse en este ambiente (Hamedi, 2013)

Existen dos formas en las que las actinobacterias halófilas son capaces de resistir la influencia de altas concentraciones de sal. La primera involucra la creación de sal en el citoplasma, esto significa que existe una acumulación de iones inorgánicos dentro de la célula, cuya concentración es comparable con la que se encuentra en el exterior, regulando así la presión osmótica. La segunda forma es a través de la acumulación de moléculas orgánicas conocidas como solutos compatibles (Morozkina, 2010)

1.2. Ambientes extremos

Los ambientes extremos se encuentran localizados alrededor del mundo; sus características son variables y se destacan por tratarse de lugares en los que no es posible la supervivencia de cualquier organismo.

La piezósfera del mar profundo abarca el volumen del mar a una profundidad de 1000 metros, con una presión hidrostática de 10 MPa; representa aproximadamente el 75% del volumen total del océano. Se han hallado microorganismos Piezófilos en el mar profundo de los principales océanos, excepto en el océano Ártico (Fang, 2010)

El sistema hidrotermal Yellowstone consiste en más de 10000 variaciones termales, incluyendo geiseres y muelles sin erupción. Las descargas de corriente de aguas termales contienen elevadas concentraciones de Cloro, Sodio y Silicio (Lowenstern, 2016). Las aguas hidrotermales alcanzan temperaturas de hasta 175°C (Smith, 2018).

Cerca del 85% de la biosfera se encuentra expuesta a temperaturas por debajo de los 5°C. La mayor fracción de estos ambientes con baja temperatura es representada por la región profunda del mar (90% del volumen del océano se encuentra a temperaturas menores a 5°C); seguida por la nieve (35% de la superficie de la tierra), el permafrost (24% de la superficie de la tierra), hielo marino (13% de la superficie de la Tierra) y los glaciares (10% de la superficie de la tierra) (Margesin, 2011).

El Mar Muerto, ubicado al oriente del Mediterráneo, es un lago hipersalino (235 g/kg) caracterizado por condiciones meteorológicas cambiantes, particularmente por vientos inestables. La radiación solar decrece con la profundidad (a 2 metros, la radiación solar es solo del 10%) (Kischa, 2017).

1.2.1. Ex lago de Texcoco

El ex lago de Texcoco se encuentra al noreste de la Ciudad de México; el suelo es salino-sódico con un pH entre 8.5 y 10.5 y un porcentaje de sodio de entre 60% y 80% (Soto-Padilla, 2014). La estructura es granular en la capa superior del suelo y prismática en el subsuelo, y el contenido de materia orgánica varía desde 20 hasta 50 g/kg (Alcántara-Hernández, 2009). Se han aislado microorganismos que han sido capaces de adaptarse a estas condiciones extremas, tanto de suelo como de agua (Valenzuela-Encinas, 2008).

Se han planteado hipótesis en los que se cree que la naturaleza salina- sódica del lago es resultado de la intensa actividad volcánica y abruptos cambios climáticos durante la formación del complejo lagunar; al ser desecado para la implementación de obras hidráulicas durante casi medio siglo, dejó expuesto un amplio lecho salitroso (González, 2014).

Los microorganismos adaptados a estas condiciones extremas de pH y salinidad pueden tener características metabólicas importantes en el área biotecnológica. Sin embargo, la continua expansión de la Ciudad de México y otros factores antropogénicos han cambiado las características del suelo del lago (Valenzuela-Encinas, 2009).

1.3. Hidrocarburos

1.3.1. Generalidades

Los hidrocarburos son moléculas compuestas de átomos de carbono e hidrógeno y representan una de las clases más significantes de compuestos orgánicos. Los átomos de carbono se pueden alinear en cadenas abiertas o pueden formar anillos. A su vez, éstas alineaciones de hidrocarburos se subdividen en saturados e insaturados (Olah, 2003), como se muestra en la figura 1.

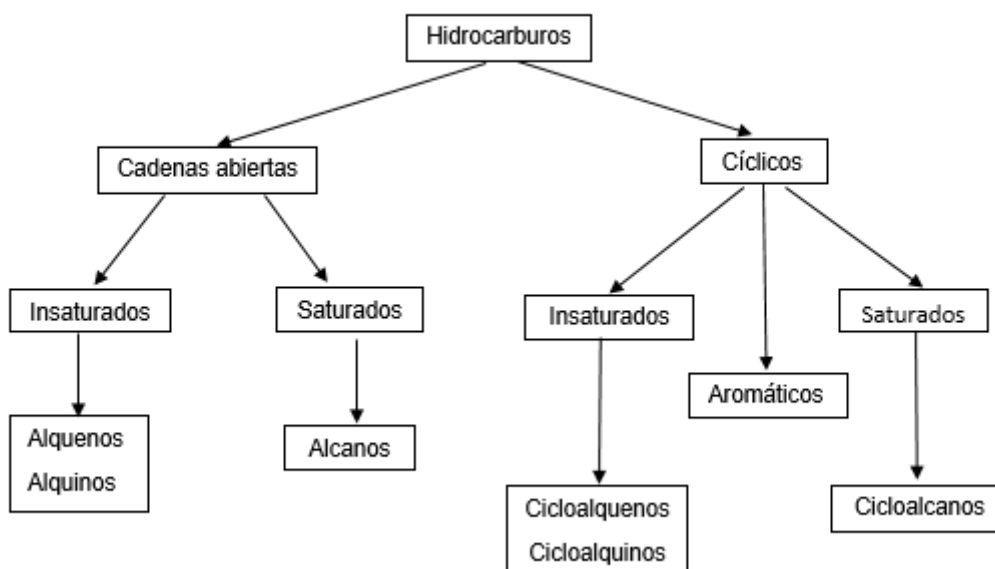


Figura 1. Clasificación de hidrocarburos.

1.3.2. Contaminación con hidrocarburos

La movilización de los hidrocarburos en el ambiente depende de las propiedades de cada uno de ellos. En el aire están presentes como vapores o se encuentran adheridos a las superficies de pequeñas partículas sólidas; pueden viajar largas distancias antes de regresar a la tierra en forma de agua de lluvia o por asentamientos de partículas (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, 2016).

La contaminación por hidrocarburos impide el intercambio gaseoso de las áreas en las que se encuentren (suelos, mares, etc.) provocando así un daño al ecosistema. Esto se ve reflejado en la alteración y muerte de diferentes especies, tanto animales como vegetales, presentes en el sitio contaminado (Cui, 2014).

Los hidrocarburos derivados del petróleo son una fuente importante de contaminación ambiental en cualquier etapa de su obtención, refinamiento y transporte. Los ecosistemas más afectados por los derivados de petróleo son comúnmente lugares con una alta concentración de sal, en los cuales se vuelve más complicado usar técnicas de biorremediación (Le Borgne, y col., 2008).

La contaminación por hidrocarburos derivados del petróleo puede darse debido a los derrames que ocurren durante su refinamiento, transporte o producción de éste. Uno de los principales ambientes que sufren este tipo de contaminación son los mares, considerados ambientes extremos por las bacterias usadas en la biorremediación convencional (Cui, 2014).

Se debe de considerar que los hidrocarburos están menos biodisponibles en ambientes hipersalinos que en los que no lo son. Esta es una consecuencia del efecto “salting out”: las sales solubles reducen la solubilidad de los compuestos orgánicos en agua, la concentración alta de sal en fase acuosa aumenta la tendencia de absorber compuestos orgánicos en la matriz sólida (Martins da Silva, 2012).

1.3.3. Hidrocarburos aromáticos

Estos compuestos tienen por lo menos un anillo de 6 átomos de carbono, el cual presenta un sistema continuo de dobles enlaces conjugados (Higgins, 1978).

Los hidrocarburos aromáticos obtenidos del petróleo y del carbón pueden ser sólidos o líquidos a temperatura ambiente, tóxicos y, en algunos casos, carcinogénicos para los mamíferos. Son de mayor importancia en la producción de polímeros, colorantes, fármacos y surfactantes (Higgins, 1978).

1.3.4. Hidrocarburos policíclicos aromáticos

La unión de dos o más anillos bencénicos forma este tipo de compuestos. Algunos de estos se han investigado extensivamente en relación a sus propiedades cancerígenas (Botello, y col., 2005).

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos son contaminantes ambientales de origen natural y antropogénico como erupciones volcánicas, la fundición del aluminio, producción y preservación de creosota. El origen antropogénico típicamente es el resultado de la combustión incompleta de sustancias orgánicas (Jiménez, 2005).

El comportamiento de estos compuestos depende en gran medida de su número de anillos. Presentan una fuerte adsorción de materia orgánica y pueden ser biodegradados (Jiménez, 2005).

Algunos de estos hidrocarburos han demostrado ser dañinos para el ambiente y, principalmente, para la salud del ser humano; como es el caso del antraceno, el fenantreno, el fluoranteno y el pireno.

1.3.4.1. Antraceno

El antraceno ($C_{14}H_{10}$) se encuentra en estado físico como cristales blancos. La sustancia se descompone al calentarla intensamente, en contacto con luz solar, bajo la influencia de oxidantes fuertes, produciendo humos acres y tóxicos, causando peligro de incendio o explosión (Red de Intercambio de Información Química).

Es una sustancia peligrosa para el ambiente y tiene la capacidad de bioacumularse en organismos como especies acuáticas y plantas. En el ser humano, se puede absorber por inhalación, a través de la piel y por ingestión. Si la exposición es de corta duración se produce una irritación en los ojos, la piel, el tracto respiratorio y el tracto intestinal; si la exposición es prolongada o repetida puede producir sensibilización de la piel (Ministerio de Agricultura y Medio Ambiente).

Interviene en la fabricación de colorantes. Se encuentra como componente de cortinas de humo y cristales para contadores de escintilación (Jiménez, 2005).

1.3.4.2. Fenantreno

El fenantreno ($C_{14}H_{10}$) es uno de los hidrocarburos más frecuentes en el ambiente, considerado un contaminante prioritario ya que contribuye con más del 49% del total de los hidrocarburos policíclicos aromáticos en el ambiente. Se emplea frecuentemente para desarrollar estudios sobre el metabolismo de hidrocarburos policíclicos aromáticos con efecto carcinogénico (Otero y col., 2013).

1.3.4.3. Fluoranteno

El fluoranteno ($C_{16}H_{10}$) es una sustancia que posee un color amarillo claro y es apolar. Se absorbe por inhalación, ingestión o a través de la piel, pero de manera lenta. Provoca efectos tóxicos agudos en los animales acuáticos y su bioconcentración es moderada (Ministerio de Agricultura y Medio Ambiente).

Se produce en el proceso pirolítico de materia orgánica verde, hulla y petróleo a altas temperaturas. Se produce en la biosíntesis de plantas (Jiménez, 2005).

1.3.4.4. Pireno

El pireno ($C_{16}H_{10}$) es un sólido amarillo claro o incoloro que se descompone al calentarlo intensamente, produciendo humos irritantes. La sustancia se puede absorber por inhalación, a través de la piel y por ingestión. La exposición al sol puede provocar un efecto irritante del pireno en la piel y puede llegar a un descoloramiento crónico de la piel (Fichas Internacionales de Seguridad Química). Se emplea en investigación bioquímica.

1.3.5. Daños a la salud

El ser humano está expuesto a estos hidrocarburos a través de la inhalación, contacto con la piel e ingestión. En el organismo, los hidrocarburos policíclicos aromáticos son altamente liposolubles se absorben rápidamente en tejidos lipídicos como los riñones, hígado y tracto gastrointestinal. El metabolismo de estos compuestos tiene lugar en el tejido nasal, glándulas mamarias, bazo, folículos cerebrales, eritrocitos, plaquetas, leucocitos, placenta y útero. (Nwinyi, y col., 2016)

Enoch Olando y col. Estudiaron en el año 2016 la relación entre la exposición constante a este tipo de hidrocarburos y la tos crónica. Encontraron un incremento en el signo tos en personas con enfermedades crónicas del sistema respiratorio, así como tos pasajera en personas clínicamente sanas.

Varios hidrocarburos policíclicos aromáticos han causado tumores en animales de laboratorio, entre estos se encuentra el antraceno, el pireno y el fluoranteno. Estos hidrocarburos se transforman en el cuerpo en sustancias químicas que pueden adherirse a otras sustancias en el cuerpo; la presencia de éstos puede medirse en los tejidos del cuerpo o en la sangre después de ocurrida la exposición a los mismos; también pueden medirse en orina (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades).

1.4. Biorremediación

La práctica de biorremediación consiste en utilizar organismos biológico naturales o modificadas genéticamente, como plantas (fitorremediación), hongos y bacterias, con el fin de transformar sustancias tóxicas para disminuir su toxicidad o para volverlas inocuas. Las bacterias son los microorganismos más utilizados para el tratamiento por biorremediación (Benavides, 2006).

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos pueden degradarse en productos de larga duración al reaccionar con la luz solar y otras sustancias presentes en el aire, generalmente durante un periodo que dura de días a semanas. La degradación en el suelo y en el agua toma generalmente entre semanas y meses y es causado principalmente por la acción de microorganismos (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, 2016).

La interacción entre una especie bacteriana y el petróleo crudo es un proceso bioquímico complejo. La bacteria puede tener efectos directos o indirectos sobre las propiedades del aceite: induce cambios fisicoquímicos que ayudan a la degradación, o por medio de las enzimas que producen las especies bacterianas (Eda Acikgoz, 2015).

El mecanismo de adaptación microbiana para la degradación de compuestos aromáticos como el fenol, se explica por la inducción de enzimas intracelulares. La degradación microbiana del fenol bajo condiciones aeróbicas usualmente procede por una hidroxilación inicial para generar catecol que se escinde por las rutas de fisión

meta u orto. La escisión orto es catalizada por catecol-1,2-dioxigenasa que dirige la formación del semialdehído 2-hidroxiacético (Eda Acikgoz, 2015).

Los microorganismos aislados de la matriz del área contaminada son capaces de mejorar la velocidad y rango de descomposición del contaminante en cuestión. Esto es porque tienen un potencial metabólico versátil, ya que pueden poseer habilidades como degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos, producción de biosurfactantes y tolerancia a metales pesados, entre otras (Eda Acikgoz, 2015).

1.4.1. Biorremediación en ambientes salinos

Se considera que al menos un 5% del total de los efluentes en el mundo son altamente salinos. La concentración de sal en estos ambientes puede variar de 3.5% de sal disuelta, como en el agua de mar, a concentraciones cercanas a la saturación (35%) (Le Borgne y col., 2008).

La biodegradación es la primera alternativa usada en el tratamiento de áreas contaminadas con hidrocarburos debido a su costo-beneficio. Sin embargo, en ambientes salinos e hipersalinos los tratamientos microbiológicos convencionales no funcionan, ya que las altas concentraciones de sal inhiben el crecimiento y la actividad degradadora de las bacterias (Guo, 2016).

La alta salinidad de las superficies contaminadas puede provocar desnaturalización de proteínas y deshidratación de células, lo cual es letal para microorganismos utilizados comúnmente en biorremediación (Benavides, 2006).

El flujo global de hidrocarburos policíclicos aromáticos en ambientes marinos es controlado, en parte, por la degradación microbiana que impide la acumulación de estas moléculas en el ecosistema (Le Borgne y col., 2008).

1.5. Estudios antecedentes de biodegradación de hidrocarburos

Se han realizado estudios para contrarrestar el problema de la contaminación por hidrocarburos alrededor de todo el mundo.

En el continente asiático, Xue y col. identificaron y caracterizaron a *Gordonia paraffinivorans* como nueva especie degradadora de hidrocarburos. El hallazgo fue hecho en 2003 en China; la actinobacteria fue aislada de un pozo petrolero.

Una nueva especie del género *Actinopolyspora* fue hallada en la península Arábiga. Esta nueva especie es halófila extrema y posee la capacidad de degradar hidrocarburos. El hallazgo fue hecho por Al-Mueini y col. en 2007.

En China en el año 2009, Hao y Lu fueron capaces de aislar una especie bacteriana de tipo cocoide, la cual es una especie halófila y es capaz de metabolizar varias moléculas orgánicas de alto y bajo peso molecular.

Zhou y col. estudiaron a bacterias del género *Sphingomonas*, las cuales fueron capaces de utilizar hidrocarburos policíclicos aromáticos como fuente de carbono y energía; los resultados de este estudio realizado en China se publicaron en el año 2016.

En el mismo año, Zhu y col. (China) aislaron *Stenotrophomonas sp.* y *Pseudomonas sp.* de plantas que crecieron en suelos contaminados; estas especies fueron capaces de degradar naftaleno, fluoranteno, pireno y fenantreno cuando las exponen a estos de manera individual o en mezcla.

En África, en el año 2016, Obinna y col., estudiaron en Nigeria a varias especies bacterianas del género *Pseudomonas*. Tras analizar la capacidad hidrocarbonaclástica de estos microorganismos, concluyeron que *Pseudomonas plecoglossicida* y *Pseudomonas sp.* tienen la capacidad de degradar parcialmente los hidrocarburos policíclicos aromáticos a los que se vieron expuestos: naftaleno, fluoranteno, pireno y criseno.

Por otro lado, en América, se estudió la habilidad de bacterias del género *Haloferax* de metabolizar compuestos aromáticos, incluyendo hidrocarburos policíclicos aromáticos en una variedad de ambientes hipersalinos. La investigación fue realizada por Bonfá y col. en Brasil en 2011.

Revelo y col., en Colombia, realizaron un estudio en 2013 en el que caracterizaron bacterias marinas hidrocarbonaclásticas. Este estudio resultó en la descripción de cuatro principales géneros bacterianos: *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Halomonas* sp. Y *Haererehalobacter* sp. La capacidad de degradar aceites se observó en esta comunidad y se dedujo la potencial producción de biosurfactantes por la degradación de hidrocarburos por acción de estas bacterias.

En 2016, Lara-Severino y col., analizaron la capacidad de algunas actinobacterias halotolerantes de degradar antraceno. El resultado de esta investigación fue que las bacterias *K. rosea*, *K. palustris*, *M. testaceum* y *N. farcinica* son capaces de usar y transformar el antraceno. Las bacterias analizadas fueron aisladas de áreas con actividad petrolera, ya que se ha comprobado que las especies nativas son las más aptas para la biorremediación.

2. Planteamiento del Problema

La contaminación ambiental por hidrocarburos impide el intercambio gaseoso; esto afecta a diferentes ecosistemas dañando flora, fauna y, principalmente, la salud del ser humano.

Algunos de los métodos de tratamiento de áreas contaminadas por hidrocarburos son costosos y no siempre efectivos, ya que existe la posibilidad de que los productos de degradación sean más tóxicos que la molécula original.

Debido a esto, la biorremediación puede ser una alternativa viable para enfrentar este problema.

Las bacterias usadas comúnmente en los procesos de biorremediación no son aptas para el tratamiento de áreas hipersalinas contaminadas con hidrocarburos, por lo que se buscan microorganismos capaces de desarrollarse en estos ambientes y que conserven sus propiedades de degradación.

Pregunta investigación

¿Las actinobacterias halófilas son capaces de degradar hidrocarburos policíclicos aromáticos?

3. Hipótesis

Hipótesis alterna:

Las actinobacterias halófilas aisladas son capaces de degradar al menos uno de los hidrocarburos policíclicos aromáticos a los que se van a exponer.

Hipótesis nula:

Las actinobacterias halófilas aisladas no son capaces de degradar los hidrocarburos policíclicos aromáticos a los que se va a exponer.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Identificar actinobacterias halófilas con la capacidad para degradar hidrocarburos policíclicos aromáticos.

4.2 Objetivos Específicos

- Realizar un muestreo en el ex lago de Texcoco para búsqueda y aislamiento de actinobacterias halófilas.
- Evaluar la capacidad de degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos por acción de actinobacterias halófilas.
- Identificar genéticamente a las actinobacterias halófilas con capacidad para degradar hidrocarburos policíclicos aromáticos.

5. Justificación

De acuerdo con los datos reportados por Petróleos Mexicanos (PEMEX) en 2016, en agosto se produjeron 2144 miles de barriles por día de petróleo crudo. Dentro del petróleo que se considera pesado, 360 barriles se distribuyeron en refinerías y 1009 a terminales de exportación (Petróleos Mexicanos, 2016).

El manejo inadecuado de petróleo y sus derivados genera un importante problema de contaminación de suelos, agua y, eventualmente, aire.

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos son compuestos químicos de alta toxicidad que afectan la vida y la salud del ser humano.

El ser humano está expuesto a estos hidrocarburos a través de la inhalación, contacto con la piel e ingestión. En el organismo, los hidrocarburos policíclicos aromáticos son altamente liposolubles, se absorben rápidamente en tejidos lipídicos como los riñones, hígado y tracto gastrointestinal. El metabolismo de estos compuestos tiene lugar en el tejido nasal, glándulas mamarias, bazo, folículos cerebrales, eritrocitos, plaquetas, leucocitos, placenta y útero.

Debido a que los métodos de tratamiento de áreas contaminadas con hidrocarburos suelen ser poco efectivos, se plantea la opción de usar sistemas biológicos como método alternativo para enfrentar este problema.

La biorremediación es una alternativa eficaz para el tratamiento de áreas contaminadas. Consiste en el uso de organismos como plantas, hongos o bacterias para reducir la toxicidad de los compuestos o volverlos inocuos.

Los metabolitos secundarios producidos por bacterias, así como las enzimas extracelulares, son de gran valor en la descontaminación de áreas dañadas por hidrocarburos debido a su actividad surfactante y a sus propiedades bioemulsificantes.

La alta concentración de sal en ambientes contaminados con hidrocarburos inhibe el crecimiento bacteriano, ya que puede provocar la desnaturalización de proteínas y la

deshidratación del organismo. Por otro lado, disminuye la producción de metabolitos secundarios y enzimas extracelulares, afectando así su capacidad degradadora.

Las actinobacterias halófilas son capaces de soportar elevadas concentraciones de sal y pH básico, por lo que pueden desarrollarse en ambientes en los que otros microorganismos no podrían hacerlo. Así mismo, estos microorganismos producen una serie de enzimas hidrolíticas extracelulares como amilasas, lipasas, proteasas, nucleasas y esterases; las cuales son clave en la biodegradación de residuos tóxicos y contaminantes industriales.

6. Material y Métodos

6.1. Diseño de Estudio

Experimental. Cuantitativo

Universo: Microorganismos aislados del ex lago de Texcoco

Método de muestreo: Por conveniencia.

Muestra: Actinobacterias halófilas degradadoras de hidrocarburos policíclicos aromáticos

6.2. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Criterios inclusión

- Actinobacterias halófilas y halotolerantes que degraden hidrocarburos.

Criterios exclusión

- Bacterias que no sean de la familia de las actinobacterias.
- Actinobacterias que no sean halófilas o halotolerantes

Criterios eliminación

- Actinobacterias halófilas que no presenten tolerancia a hidrocarburos policíclicos aromáticos

6.3. Procedimiento

6.3.1 Muestreo

El muestreo se realizó en el territorio perteneciente al ex lago de Texcoco. Se tomaron muestras de tierra de 7 puntos diferentes. De cada punto se tomaron muestras de

agua, sedimento y suelo, en bolsas de polietileno y tubos estériles. Se transportaron al laboratorio bajo condiciones de refrigeración.

6.3.2 Caracterización fisicoquímica de las muestras

Se determinaron las características fisicoquímicas de pH y porcentaje de salinidad de las muestras, para lo cual se colocó un gramo de suelo seco, previamente pulverizado, en un tubo de ensayo que contenía 9 mL de agua destilada. Se agitó en vórtex durante 10 minutos para conseguir homogeneidad. El mismo procedimiento se realizó para las muestras de sedimento. La mezcla se dejó filtrar durante toda la noche utilizando papel filtro Whatman número 1. Las muestras de agua también se sometieron al proceso de filtrado.

El filtrado se sometió al análisis de pH y % de salinidad; para estas se utilizaron un potenciómetro y un refractómetro (MASTER-S/Mill α).

6.3.3 Aislamiento y purificación de cepas

Para el aislamiento se utilizaron 3 diferentes medios de cultivo:

- Medio para halófilos moderados (MH) (Quesada y col., 1983): contiene 10 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de proteosa peptona, 1 g/L de dextrosa y 18 g/L de agar.
- Medio Sauton-UAM (Sandoval y col., 1997): contiene 4 g/L de asparagina, 2 g/L de ácido cítrico, 0.5 g/L de K_2HPO_4 , 0.5 g/L de $MgSO_4$, 0.05 g/L de citrato férrico amoniacal, 0.1 g/L de $ZnSO_4$, 0.5 g/L de $CaCl_2$, 0.1 g/L de $CuSO_4$, 10 g/L de hojuelas de papa, 60 g/L de glicerol, 5 g/L de carbón activado, 0.1 g/L de cicloheximida, 0.05 g/L de estreptomicina, 0.05 g/L de eritromicina, 0.05 g/L de kanamicina y 18 g/L de agar.
- Medio Czapek (Becton Dickinson, No. de catálogo: 211776): se resuspenden 50 g del medio deshidratado por cada litro de agua.

Todos los medios se prepararon con solución salina al 10% y se les ajustó el pH a 9. Los medios fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 minutos; posteriormente, se dejaron enfriar a 45°C y se vertieron en cajas Petri estériles.

Se elaboraron soluciones con suelo y sedimento a una concentración de 0.1 mg/mL, utilizando agua destilada como solvente y asegurando una completa homogeneidad. Para las muestras de agua, la concentración fue de 0.1 mL/mL.

Se realizaron diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000 para inocular las cajas Petri con los diferentes medios de cultivo. Se tomaron 200 µL de cada dilución, la muestra se colocó en el centro de la caja y se distribuyó de forma radial con una varilla de vidrio. Las cajas se incubaron a 37°C durante 7 a 10 días. Posteriormente, se eligieron las colonias que por su morfología macroscópica indicaban ser cepas de actinobacterias (tamaño, color, aspecto, forma, textura, crecimiento radial, presencia de micelio aéreo, producción de pigmento) (Manual de Bergey, 2012) y se procedió a aislarlas para su purificación.

6.3.4 Caracterización morfológica.

Morfología macroscópica.

Se describió la morfología macroscópica de las cepas de acuerdo a las siguientes características: tamaño, color, aspecto, forma, textura, elevación de la colonia, presencia de micelio aéreo y pigmento difusible en el medio de cultivo.

Morfología microscópica.

Se realizó un frotis a las cepas purificadas y se procedió a efectuar una tinción de Gram. Los frotis teñidos se observaron en un microscopio óptico de la marca y modelo OLYMPUS U-5RE-2, se buscaron bacilos Gram positivos en formación de filamentos ramificados.

6.3.5 Caracterización fisiológica.

Determinación de la concentración de NaCl para el crecimiento óptimo de las cepas aisladas.

El rango y la concentración de NaCl óptimo para el crecimiento de las cepas se determinaron sembrando cada cepa en el medio de cultivo MH a diferentes concentraciones de NaCl (0, 0.5, 3, 5, 10, 15, 20, 25 y 30%) a pH de 7. La siembra se realizó por estría y se incubaron a 37°C. El crecimiento fue observado diariamente durante 10 días y se interpretó como (-) cuando fue nulo, (+) cuando fue muy escaso, (++) cuando fue escaso, (+++) cuando fue moderado y (++++) cuando fue óptimo.

Determinación del valor de pH para el crecimiento óptimo de las cepas aisladas.

El rango y pH óptimo para el crecimiento de las cepas se determinaron sembrando cada cepa en el medio de cultivo MH, ajustando la concentración de NaCl de acuerdo al crecimiento óptimo. El pH se ajustó a los valores de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12. Se inoculó por estría y se incubó a 37°C. El crecimiento fue observado diariamente durante 10 días y se interpretó como (-) cuando fue nulo, (+) cuando fue muy escaso, (++) cuando fue escaso, (+++) cuando fue moderado y (++++) cuando fue óptimo.

6.3.6. Distribución de las cepas de acuerdo a las características fisiológicas

Las cepas se distribuyeron de acuerdo al rango de crecimiento óptimo en porcentaje de NaCl de la siguiente manera: a) halotolerantes (crecen tanto en presencia como en ausencia de NaCl en el medio); b) halófilas débiles (0.5 – 5%); c) halófilas moderadas (10 – 20%) y d) halófilas extremas ($\geq 25\%$).

Así mismo, se realizó una distribución considerando el rango de pH para el crecimiento óptimo: a) alcalotolerantes (pH de 5 – 12); b) alcalófilas (pH de 9 – 12)

6.3.7. Biodegradación de los hidrocarburos policíclicos aromáticos: antraceno, fenantreno, fluoranteno y pireno

Las actinobacterias aisladas se inocularon en medio líquido MH suplementado con 10% NaCl y ajustado a pH 8. Se incubaron a 37°C y 120 rpm durante 7 días.

Posteriormente se transfirió un inóculo de 200 μL del cultivo bacteriano, equivalente a 6×10^7 células (2 McFarland) a un tubo con rosca que contenía 5 mL de Medio Mínimo de Sales (MSM: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1000mg/L; Na_2HPO_4 , 800mg/L; K_2HPO_4 , 200mg/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 200mg/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100mg/L; $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5mg/L; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1mg/L) (Sang, 2009) suplementado con 10% NaCl y ajustado a pH 8, conteniente de 0.5 ppm del hidrocarburo a probar (antraceno, fenantreno, fluoranteno o pireno) y 50 μL del indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) a una concentración de 0.5 mg/mL. La presencia del indicador tornó al cultivo de color azul. Cada prueba se realizó por triplicado. La disminución en la intensidad del color azul inicial indicó un resultado positivo a la prueba de biodegradación.

Los cultivos bacterianos que dieron un resultado positivo en la prueba, se volvieron a preparar de la manera indicada anteriormente y se incubaron a 37°C por 48h. A los tiempos 0 h, 24 h y 48 h post incubación se tomaron 3 mL de sobrenadante y se centrifugaron. A la solución se le registró el espectro visible de absorción entre (400-800) nm con un espectrofotómetro Perkim Elmer, utilizando cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico. La capacidad de biodegradación de las cepas para cada hidrocarburo se determinó como la relación de la absorbancia a 600 nm entre el tiempo 0 h y las 48 h. Se prepararon muestras controles que consistieron en 5 mL de medio mínimo de sales suplementado con 10% NaCl y ajustado a pH 8, conteniente de 0.5 ppm del hidrocarburo a evaluar (25 μL de una solución madre de 100 ppm) y 50 μL del indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) a una concentración de 0.5 mg/mL, y muestras de medio mínimo de sales suplementado con 10% NaCl y ajustado a pH 8 contenientes de 50 μL del indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) a una concentración de 0.5 mg/mL. Estas muestras controles también se incubaron a 37°C por 48h y sus espectros visibles de absorción se registraron a los mismos tiempos y en las mismas condiciones que las muestras.

6.3.8 Tolerancia a Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos

Para realizar la prueba de tolerancia a los hidrocarburos policíclicos aromáticos elegidos fue necesario inocular las cepas de Actinobacterias en medio para halófilas moderadas MH complementado con diferentes concentraciones de los mismos.

Primero se realizaron soluciones de los hidrocarburos de interés, antraceno, fenantreno, fluoranteno y pireno; las concentraciones fueron de 1000 ppm, 100 ppm y 1 ppm.

Para cada solución de 1000 ppm se pesaron 0.2 g del hidrocarburo y se diluyeron en 20 mL de metanol.

Posteriormente, se tomó una alícuota de 2 mL de la solución de 1000 ppm y se llevó a un volumen de 20 mL en metanol para obtener una solución de 100 ppm.

Finalmente, de ésta última solución se tomó una alícuota de 0.2 mL y se llevó a un volumen de 20 mL en metanol para obtener una solución de 1 ppm.

Por otro lado, se preparó medio de cultivo para halófilas moderadas MH de la siguiente forma:

- Extracto de Levadura: 1.75 g
- Proteosa Peptona: 0.875 g
- Glucosa: 0.175 g
- Agar: 3.15 g
- Solución Salina al 10%: 87.5 mL
- pH: 9

Para poder vaciar el medio de cultivo en las cajas petri fue necesario incluir las soluciones de hidrocarburos diluidas en agua destilada previamente esterilizada. Las concentraciones quedaron de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 1.

Concentración de Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos en medio de cultivo para halófilas moderadas (MH)

Concentración inicial de HPA	Solución de HPA	Agua destilada	Medio de cultivo MH	Volumen final	Concentración final de HPA
1000 ppm	17.5 mL	70 mL	87.5 mL	175 mL	100 ppm
100 ppm	17.5 mL	70 mL	87.5 mL	175 mL	10 ppm
100 ppm	1.75 mL	85.75 mL	87.5 mL	175 mL	1 ppm
1 ppm	17.5 mL	70 mL	87.5 mL	175 mL	0.1 ppm
1 ppm	1.75 mL	85.75 mL	87.5 mL	175 mL	0.01 ppm

Se midieron 25 mL de medio de cultivo adicionado con Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos para cada caja petri. Así mismo, en cada caja se inocularon 6 cepas y se revisó su crecimiento en los siete días de incubación posteriores.

6.3.9. Identificación genética

Obtención de biomasa.

Las cepas aisladas se inoculan en el medio líquido MH, para obtener biomasa se utiliza la siguiente metodología:

1. Se inoculan las cepas aisladas en matraces de 125 mL conteniendo 30 mL de medio de cultivo líquido MH.
2. Cuando se observa crecimiento suficiente, se transfiere el medio líquido y la biomasa a tubos Falcón de 15 mL estériles y se centrifugan durante 15 minutos, se retira el sobrenadante y el pellet se transfiere a tubos eppendorf de 1.5 mL, se centrifugan los tubos a 14000 rpm por 5 minutos; se retira el sobrenadante y se inicia el protocolo de extracción de ADN con el pellet bacteriano.

Extracción de ADN

Se realiza utilizando el kit Promega Wizard® Genomic:

1. Se resuspende el pellet bacteriano con 480 μ L de EDTA 0.5 M.
2. Se agregan 120 μ L de lisozima, se mezcla cuidadosamente con una pipeta.
3. Se incuba la muestra a 37°C por 60 minutos, se centrifuga a 14000 rpm durante 2 minutos y se retira el sobrenadante.
4. Posteriormente, se agregan 600 μ L de solución nuclear de lisis del kit de purificación de ADN "Promega Wizard® Genomic" mezclando cuidadosamente.
5. Se incuba a 80°C durante 5 minutos y se deja enfriar a temperatura ambiente.
6. Se agregan 3 μ L de solución de RNAsa del kit de purificación de ADN "Promega Wizard® Genomic"; el tubo se mezcla por inversión de 2 a 3 veces.

7. Se incuba el tubo a 37°C por 60 minutos y se deja enfriar a temperatura ambiente.
8. Se agregan 200 µL de solución de precipitación de proteínas del kit de purificación de ADN “Promega Wizard® Genomic” al lisado tratado con RNAsa, se agita vigorosamente en un vortex durante 20 segundos para mezclar.
9. Se incuba la mezcla en hielo durante 5 minutos.
10. Posteriormente, se centrifuga a 14000 rpm por 3 minutos y se transfiere el sobrenadante a un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL que contenga 600 µL de isopropanol.
11. Se mezcla suavemente por inversión hasta que se observa la formación de hebras de ADN visibles.
12. Se centrifuga a 14000 rpm por 2 minutos.
13. Se retira cuidadosamente el sobrenadante y el tubo se golpea suavemente sobre un papel absorbente. Se adicionan 600 µL de etanol al 70%, se invierte el tubo con el pellet de ADN de 2 a 3 veces.
14. Se centrifuga a 14000 rpm durante 2 minutos, se retira cuidadosamente el etanol y se deja secar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
15. En el último paso, se agregan 100 µL de solución de rehidratación del kit de purificación de ADN “Promega Wizard® Genomic” y se incuba en refrigeración a 4°C por 12 horas.
16. Se almacena en congelación hasta su utilización.

El ADN se visualiza por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1% con los productos de extracción de ADN para observar la presencia y la calidad del ADN; se utiliza la siguiente metodología:

1. En un matraz de 200 mL se colocan 0.25 g de agarosa y 25 mL de solución TAE 1X.
2. Se agita suavemente y se calienta en un horno de microondas por 40 segundos, y dos veces más por 20 segundos.
3. Previamente, se arma la cámara de electroforesis y se vierte la agarosa sobre el molde. Se deja solidificar la agarosa por 15 minutos y se retira el peine.
4. Se cubre el gel con solución TAE 1X.

5. Se mezclan 7 μ L de muestra con buffer de carga y se depositan en los pozos del gel. Se depositan 7 μ L de marcador de peso molecular.
6. Se cierra la cámara de electroforesis y se programa a 120 Volts y 300 microAmperes por 45 minutos.
7. Transcurrido este tiempo, se retira el gel y se revela en una solución de bromuro de etidio por 15 segundos.
8. Se captura la imagen en un fotodocumentador.

Amplificación del marcador filogenético

A las cepas aisladas se les amplificó el marcador filogenético de 350 pares de bases (pb) localizado en el gen rRNA 23S, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las secuencias que se utilizaron como iniciadores fueron:

23R insF: 5'-(AC)AGCGTAG(AGCT)CGA(AT)GG-3'

23S insR: 5'-GTG(AT)CGGTTT(AGCT)(GCT)GGTA-3'

La reacción se llevó a cabo utilizando Taq AND polimerasa commercial. Las condiciones del ciclo térmico fueron: un ciclo de predesnaturalización 5 minutos (94°C), desnaturalización 30 segundos (94°C), acoplamiento 20 segundos (50°C), elongación 40 segundos (72°C), repetir 29 ciclos y un ciclo post-elongación de 7 minutos (72°C). Los fragmentos amplificados se observaron por medio de una electroforesis en un gel de agarosa al 2%, revelado en bromuro de etidio por 7 segundos.

Amplificación del gen rRNA 16S

Se realiza por medio de la PCR y se utilizan las siguientes secuencias de nucleótidos (cebadores):

27F: 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'

518F: 5'-CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG-3'

1492R: 5'-TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'

800R: 5'-TAC CAG GGT ATC TAA TCC-3'

La reacción se lleva a cabo utilizando Taq ADN polimerasa comercial. Las condiciones del ciclo térmico son: un ciclo de pre-desnaturalización de 5 minutos (94°C), desnaturalización por 60 segundos (94°C), acoplamiento por 30 segundos (59°C), elongación por 60 segundos (72°C), se repiten 30 ciclos y posteriormente un ciclo de post-elongación de 10 minutos (72°C). Los productos amplificados se visualizan en gel de agarosa al 1% y se revela con bromuro de etidio por 7 segundos.

Ribotipificación mediante PCR-RFLP de 16S rRNA

En un tubo Eppendorf estéril, se digirieron 10 µL de los amplicones de PCR con la enzima MspI (Promega, N° de catálogo: R6401). La mezcla de reacción consistió en 7.6 µL de agua libre de nucleasas (Merck Milipore, N° de catálogo: LSKNF0500), 2 µL de Buffer B 10X (Promega, N° de catálogo: R002A), 0.2 µL de Albúmina sérica bovina acetilada (Promega, N° de catálogo: R396D) y 0.2 µL de la enzima de restricción. El volumen final de la reacción fue de 20 µL. De igual forma, se digirieron 10 µL de los amplicones de PCR con la enzima RsaI (Promega, N° de catálogo: R6371).

Para ambas enzimas, la digestión de restricción se llevó a cabo durante 1 hora a 37°C; posteriormente, se inactivó la enzima por calentamiento 15 minutos a 72°C. 10 µL del producto de digestión fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en Buffer TAE (Invitrogen, N° de catálogo: 24710-030), teñido con bromuro de etidio; el proceso se realizó a 120V durante 80 minutos. Se utilizó un marcador de peso molecular de ADN 1 kb (Thermo scientific, N° de catálogo: 5M0311). Los geles se visualizaron bajo luz UV y se fotodocumentaron electrónicamente.

Los patrones de restricción generados se analizaron de acuerdo con el número de bandas y posición respecto al marcador de peso molecular utilizado. Para el análisis de agrupamiento se incluyeron los perfiles que presentaron al menos 2 bandas. Los patrones se analizaron con el programa PyElph 1.4 basado en el algoritmo Neighbour Joining.

Purificación

Los fragmentos amplificados del gen rRNA 16S se filtraron con el equipo de purificación de PCR Amicon Ultra 0.5 mL (Merck milipore, No. de catálogo UFC503096), siguiendo la metodología del proveedor)

Secuenciación.

Los productos amplificados serán enviados al servicio de secuenciación de Macrogen Maryland, U.S.A.

Identificación de cepas.

Las secuencias obtenidas son revisadas y corregidas. Las secuencias consenso se construyen a partir de los fragmentos *forward* y *reverse* utilizando el programa BioEdit versión 7.0.9.

Las secuencias consenso se comparan con las secuencias ya depositadas en las bases de datos del GenBank a través del programa BLAST del National Center of Biotechnology (NCBI) para determinar el porcentaje de semejanza.

Las secuencias consenso y las secuencias obtenidas del GenBank se alinean con el programa BioEdit sequence alignment editor versión 7.0.9.

6.4. Variables de Estudio

Independientes:

Actinobacterias halófilas

Dependientes:

Tolerancia a hidrocarburos policíclicos aromáticos.

Eliminación de hidrocarburos policíclicos aromáticos.

**Tabla 2.
Variables**

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición	de	Análisis estadísticos
Actinobacterias halófilas.	Bacterias Gram positivas, filamentosas, con alta capacidad de producir enzimas extracelulares.	Débiles: 0.5-10% [NaCl]. Moderadas: 10-20% [NaCl]. Extremas: más del 20% [NaCl].	Independiente. Cuantitativa.	Porcentaje de crecimiento en NaCl.	de	No aplica
Tolerancia a los hidrocarburos.	Capacidad de los microorganismos de crecer y desarrollarse en ambientes contaminados con hidrocarburos.	Cinética de crecimiento de las actinobacterias.	Dependiente. Cuantitativa dicotómica.	Presente 1 Ausente 0		Modelo logístico
Degradación de hidrocarburos.	Descomposición o reducción de compuestos orgánicos formados por átomos de Carbono e Hidrógeno.	Medición de la concentración por Cromatografía de gases.	Dependiente Cuantitativa	Por concentración.		ANOVA

6.5 Implicaciones Bioéticas

Convenio sobre la diversidad biológica de las Naciones Unidas, suscrito en Río de Janeiro en junio de 1992.

Los objetivos del convenio son:

- La conservación de la diversidad biológica.
- El uso sostenible de componentes de la diversidad biológica.
- El reparto justo y equitativo de los beneficios derivados de la utilización de recursos genéticos.

El Convenio establece que sus firmantes deberán evitar o minimizar el impacto negativo resultante del uso de los recursos biológicos.

7. RESULTADOS

7.1. Nombre del artículo enviado

BÚSQUEDA RÁPIDA DE ACTINOBACTERIAS HALÓFILAS Y HALOTOLERANTES CON CAPACIDAD PARA DEGRADAR HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

SEARCHING FOR HALOPHILIC AND HALOTOLERANT ACTINOBACTERIA WITH CAPACITY TO DEGRADE POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS

7.1.1. Carta de envío

De: Claudio M. Amescua Garcia <claudio.amescua@atmosfera.unam.mx>

Enviado: martes, 24 de abril de 2018 03:56 p. m.

Para: Ninfa Ramírez-Durán

Asunto: [RICA] Envío recibido

Ninfa Ramírez-Durán:

Gracias por enviarnos su manuscrito "BÚSQUEDA RÁPIDA DE ACTINOBACTERIAS HALÓFILAS Y HALOTOLERANTES CON CAPACIDAD PARA DEGRADAR HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS" a Revista Internacional de Contaminación Ambiental. Gracias al sistema de gestión de revistas online que usamos podrá seguir su progreso a través del proceso editorial identificándose en el sitio web de la revista:

URL del manuscrito:

<http://www.revistascca.unam.mx/rica/index.php/rica/author/submission/53228>

Iniciar sesión

www.revistascca.unam.mx

Aspectos físicos y químicos de la contaminación, investigaciones sobre la distribución y los efectos biológicos y ecológicos de los contaminantes; así como sobre tecnología e implementación de nuevas técnicas para su medida y control; estudios sociológicos, económicos y legales acerca del tema

Nombre de usuario/o: ninfa

Si tiene cualquier pregunta no dude en contactar con nosotros/as. Gracias por tener en cuenta esta revista para difundir su trabajo.

Claudio M. Amescua Garcia

Revista Internacional de Contaminación Ambiental

Revista Internacional de Contaminación Ambiental

<http://www.revistascca.unam.mx/rica>

7.1.2. Resumen

Introducción: Las actinobacterias son bacterias de gran versatilidad metabólica. Las actinobacterias halófilas y halotolerantes combinan su capacidad productora de enzimas con su resistencia a la salinidad, por lo que son de interés para procesos de biorremediación incluida la remoción de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA). Las bacterias halófilas y halotolerantes se aíslan de ambientes salinos como lo es el ex lago de Texcoco. Hasta el momento no hay reportes del aislamiento de actinobacterias halófilas y halotolerantes con la capacidad de degradar HPA de este ambiente. El objetivo de este trabajo fue aislar actinobacterias halófilas de suelos, sedimentos y aguas del ex lago de Texcoco potencialmente útiles en procesos de biorremediación.

Metodología: Se tomaron 9 muestras de agua, 8 de sedimento y 12 de suelos, de 7 zonas diferentes del ex Lago de Texcoco. Las muestras se cultivaron en 3 medios diferentes y las actinobacterias aisladas se caracterizaron fisiológicamente de acuerdo al requerimiento y tolerancia a % NaCl y pH para su crecimiento. La capacidad de degradar antraceno, fenantreno, fluoranteno y pireno se determinó por UV-Vis utilizando el indicador colorimétrico 2, 6-dicloroindofenol (DCPIP). La tolerancia a diferentes concentraciones de los HPA también fue evaluada.

Resultados: Se aislaron 43 actinobacterias, de la cuales 35 fueron halófilas y 8 halotolerantes. De ellas, 6 mostraron capacidad para degradar a alguno de los hidrocarburos estudiados. Las bacterias degradadoras sin embargo, no resultaron ser las más tolerantes.

Conclusión: existen actinobacterias halófilas y halotolerantes potencialmente utilizables en procesos de biorremediación de HPA en el ex lago de Texcoco.

7.1.3. Abstract

Introduction: Actinobacteria are bacteria of great metabolic versatility. Halophilic and halotolerant actinobacteria combine their enzyme production capacity with their resistance to salinity, which is why they are of interest for bioremediation

processes including the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). Halophilic and halotolerant bacteria are isolated from saline environments such as the former lake of Texcoco. So far there are no reports of the isolation of halophilic and halotolerant actinobacteria with the ability to degrade HPA in this environment. The objective of this work was to isolate halophilic actinobacteria from soils, sediments and waters of the former Texcoco Lake potentially useful in bioremediation processes.

Methodology: 9 water samples, 8 sediment samples and 12 soil samples were taken from 7 different areas of the former Lake of Texcoco. The samples were cultured in 3 different media and the isolated actinobacteria were characterized physiologically according to the requirement and tolerance to % NaCl and pH for their growth. The ability to degrade anthracene, phenanthrene, fluoranthene and pyrene was determined by UV-Vis using the colorimetric indicator 2,6-dichloroindophenol (DCPIP). Tolerance to different PAH concentrations was also evaluated.

Results: 43 actinobacteria were isolated, of which 35 were halophilic and 8 were halotolerant. Of these, 6 showed the capacity to degrade some of the hydrocarbons studied. The degrading bacteria, however, did not turn out to be the most tolerant.

Conclusion: there are halophilic and halotolerant actinobacteria potentially usable in bioremediation processes of PAH in the former lake of Texcoco.

Palabras claves: biodegradación, actinomicetos, método UV-Vis, tolerancia, antraceno, fenantreno, fluoranteno, pireno.

7.1.4. Introducción

Los hidrocarburos son moléculas compuestas por átomos de carbono e hidrógeno y representan un amplio conjunto de compuestos orgánicos de gran importancia. Dentro de estos, los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) son de gran interés (Olah 2003). Estos compuestos que son el resultado de la unión de dos o más anillos bencénicos en forma lineal, angular o en clúster

(Abdel-Shafy y Mansour 2016). Los HPA se caracterizan por ser persistentes en el medio ambiente, presentar diversas estructuras y diferentes niveles de toxicidad (Rengarajan et al. 2015).

Los HPA se encuentran en el medio ambiente de manera natural o antropogénica, llegan a este debido a la combustión incompleta de estas fuentes (naturales o antropogénicas). Dentro de las fuentes naturales se encuentran: incendios forestales, actividad volcánica, síntesis bacteriana y de algas, filtración del petróleo, erosión de rocas sedimentarias que contienen petróleo y descomposición vegetativa. Las fuentes antropogénicas fundamentales son: craqueo del petróleo, combustión incompleta en incineradores y procesos industriales, emisiones provenientes de automóviles, de la cocción de alimentos, de estufas de leña, del humo de cigarrillos y tabacos, de derrames petroleros, del lodo de agua residual, de basura alquitranada, etc (Abdel-Shafy y Mansour 2016).

El ser humano está expuesto a estos hidrocarburos a través de la inhalación, contacto con la piel e ingestión. En el organismo, los HPA son altamente liposolubles se absorben rápidamente en tejidos lipídicos como los riñones, hígado y tracto gastrointestinal. El metabolismo de estos compuestos tiene lugar en el tejido nasal, glándulas mamarias, bazo, folículos cerebrales, eritrocitos, plaquetas, leucocitos, placenta y útero; y ocurre a través del sistema de oxidasa de función mixta mediada por el citocromo P450 con oxidación o hidroxilación como primer paso. (Abdel-Shafy y Mansour 2016, Nwinyi et al. 2016). La exposición a estos compuestos produce inmunosupresión y efectos carcinogénicos y mutagénicos (Rengarajan et al. 2015, Abdel-Shafy y Mansour 2016). Por tanto, la presencia y acumulación de ellos en el ambiente es potencialmente un problema de salud.

Varias tecnologías han sido evaluadas para tratar de eliminar a los HPA del medio ambiente. Entre ellas, las basadas en la biorremediación son prometedoras debido a su seguridad y relación costo-efectividad. La práctica de biorremediación consiste en utilizar organismos biológicos naturales o modificados genéticamente, como plantas (fitorremediación), hongos, algas y

bacterias, con el fin de transformar sustancias tóxicas en otras inocuas o de menor toxicidad. Las bacterias son los microorganismos más utilizados para tratamientos por biorremediación (de Mesa et al. 2006).

Las bacterias inducen cambios fisicoquímicos que ayudan a la degradación de estos los HPA. Por ejemplo, aumentan la solubilidad de estos mediante la producción de biosurfactantes, o producen cambios en su estructura química por medio de la acción de enzimas (Acikgoz y Ozcan 2015).

Las actinobacterias son bacterias filamentosas Gram positivas, conocidas por su versatilidad metabólica y producción de enzimas extracelulares de gran importancia biotecnológica y médica. Esta versatilidad metabólica les facilita la supervivencia en condiciones de estrés o desfavorables para el resto de las bacterias. (Nawani et al. 2013). Estos microorganismos participan en la estabilización de residuos orgánicos en el suelo, principalmente. También se pueden encontrar en ríos y lagos o donde existan los nutrimentos adecuados para su desarrollo. Requieren menor cantidad de nitrógeno para su crecimiento que el resto de las bacterias, por lo que tienden a metabolizar las formas más resistentes de materia orgánica (McKinney 2004).

Las actinobacterias halófilas representan un reducido grupo de actinobacterias que, al combinar su capacidad productora con su resistencia a las condiciones extremas de salinidad, resultan microorganismos de gran interés como fuente productora en el área industrial, farmacéutica, cosmética y biotecnológica (Ramírez et al. 2003). Particularmente en procesos de biorremediación resultan prometedoras para ambientes contaminados de alta salinidad, donde el resto de los microorganismos tendrían condiciones difíciles de supervivencia ya que las altas concentraciones de sal inhiben el crecimiento y la actividad metabólica (Guo 2016).

La principal vía de biodegradación aeróbica de hidrocarburos es la oxidación de los anillos aromáticos por acción de enzimas producidas por los microorganismos como la catecol-dioxigenasa (Obi et al. 2016). Estas reacciones de oxidación pueden ser fácilmente detectadas a través de métodos

colorimétricos, con el uso de indicadores aceptores de electrones, como es el caso del 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP). La reducción del DCPIP se detecta por el cambio de color en el medio, de azul a incoloro (Bučková et al. 2013). En estudios in vitro sobre la capacidad biodegradadora de microorganismos, el antraceno, fenantreno, fluoranteno y pireno son de los HPA más utilizados como moléculas modelo.

El objetivo del estudio fue aislar actinobacterias halófilas de suelos, sedimentos y aguas del ex lago de Texcoco (ambiente de alta salinidad y alcalinidad) potencialmente útiles en procesos de biorremediación. Para ello se determinó mediante el indicador DCPIP la capacidad para transformar antraceno, fenantreno, fluoranteno y pireno de las cepas aisladas.

7.1.5. Apartados del artículo

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las muestras

Se realizó un muestreo por conveniencia en el ex lago de Texcoco. Se tomaron muestras de agua, suelo y sedimento en 7 zonas diferentes. Las muestras fueron recolectadas y transportadas al laboratorio en bolsas de polietileno y tubos estériles bajo condiciones de refrigeración.

Caracterización fisicoquímica de las muestras

Se prepararon dispersiones de suelo y sedimento a una concentración de 0.1 g/mL, utilizando agua destilada como fase dispersante y asegurando completa homogenización. Tanto las dispersiones preparadas como las muestras de agua colectadas se filtraron durante toda una noche utilizando papel filtro Whatman número 1. Al filtrado obtenido se le determinó el pH y el % de salinidad por medio de un potenciómetro (ConduTronic, modelo pH10) y un refractómetro (MASTER-S/Millα), respectivamente.

Medios de cultivo y aislamiento

Se prepararon 3 diferentes medios de cultivo para el aislamiento de las actinobacterias. (i) Medio para bacterias halófilas moderadas (MH): 10 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de proteosa peptona, 1 g/L de dextrosa y 18 g/L de agar. (ii) Medio Sauton-UAM: 4 g/L de asparagina, 2 g/L de ácido cítrico, 0.5 g/L de K_2HPO_4 , 0.5 g/L de $MgSO_4$, 0.05 g/L de citrato férrico amoniacal, 0.1 g/L de $ZnSO_4$, 0.5 g/L de $CaCl_2$, 0.1 g/L de $CuSO_4$, 10 g/L de hojuelas de papa, 60 g/L de glicerol, 5 g/L de carbón activado, 0.1 g/L de cicloheximida, 0.05 g/L de estreptomicina, 0.05 g/L de eritromicina, 0.05 g/L de kanamicina y 18 g/L de agar. (iii) Medio Czapek (Becton Dickinson, No. de catálogo: 211776). Los medios fueron complementados con solución salina al 10 % y se les ajustó el pH a 9. Los medios fueron esterilizados en autoclave a 121 °C durante 15 minutos; posteriormente, se dejaron enfriar a 45 °C y se vertieron en cajas Petri estériles.

Para aislar las actinobacterias de las muestras colectadas, se prepararon dispersiones de suelo y sedimento a una concentración de 0.1 g/mL, utilizando agua destilada como fase dispersante y asegurando una completa homogenización. Para inocular las cajas Petri contenientes de los diferentes medios de cultivo, se realizaron diluciones 1:10, 1:100, 1:1000 de las dispersiones de suelo y sedimentos y de las muestras iniciales de agua. Se tomaron 200 µL de cada dilución y se colocaron en el centro de las cajas Petri, posteriormente se distribuyeron de forma radial con una varilla de vidrio. Las cajas se incubaron a 37 °C durante 7 a 10 días. Posteriormente, se eligieron las colonias que por su morfología macroscópica (tamaño, color,

aspecto, consistencia, crecimiento radial, presencia de micelio aéreo, producción de pigmento) indicaban ser cepas de actinobacterias y se procedió a aislarlas para su purificación. Las cepas se purificaron sembrándolas en el mismo medio del cual fueron aisladas.

Caracterización morfológica

Se describió la morfología macroscópica de las cepas purificadas de acuerdo a las siguientes características: tamaño, color, forma, textura, aspecto, elevación de la colonia, presencia de micelio vegetativo o aéreo y pigmento difusible en el medio de cultivo. Para la morfología microscópica, se realizó un frotis a las cepas purificadas y se procedió a efectuar una tinción de Gram. Los frotis teñidos se observaron en un microscopio óptico (OLYMPUS, U-5RE-2)

Caracterización fisiológica

Se determinó el rango de % NaCl en el cual se observa crecimiento bacteriano, así como el valor de concentración dentro del rango en el cual se observa el crecimiento óptimo de las cepas aisladas. Para ello se sembró cada cepa en el medio de cultivo MH a diferentes concentraciones de NaCl (0, 0.5, 3, 5, 10, 15, 20, 25 y 30) % y a pH 7. La siembra se realizó por estría y se incubaron a 37 °C. El crecimiento fue observado diariamente durante 10 días y se interpretó como (-) cuando fue nulo, (+) cuando fue muy escaso, (++) cuando fue escaso, (+++) cuando fue moderado y (++++) cuando fue óptimo.

Para conocer el rango de pH en el cual hay crecimiento bacteriano, así como el requerido para lograr el mayor crecimiento, cada cepa se sembró en el medio de cultivo MH suplementado con la concentración de NaCl requerida para el óptimo crecimiento. Los valores de pH evaluados fueron 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12. Se inoculó por estría y se incubó a 37 °C. El crecimiento fue observado diariamente durante 10 días y se interpretó como (-) cuando fue nulo, (+) cuando fue muy escaso, (++) cuando fue escaso, (+++) cuando fue moderado y (++++) cuando fue óptimo.

Biodegradación de los hidrocarburos policíclicos aromáticos: antraceno, fenantreno, fluoranteno y pireno y tolerancia a los mismos

Prueba de biodegradación

Las actinobacterias aisladas se inocularon en medio líquido MH suplementado con 10 % NaCl y ajustado a pH 8. Se incubaron a 37 °C y 120 rpm durante 7 días. Posteriormente se transfirió un inóculo equivalente a 6×10^7 células (Tubo 2 del Nefelómetro de McFarland) a un tubo con rosca que contenía 5 mL de Medio Mínimo de Sales (MMS: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1000 mg/L; Na_2HPO_4 , 800 mg/L; K_2HPO_4 , 200 mg/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 200 mg/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 mg/L; $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5 mg/L; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1 mg/L) suplementado con 10 % NaCl y ajustado a pH 8, conteniente de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del hidrocarburo a probar (antraceno, fenantreno, fluoranteno o pireno) y 50 μL del indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) a una concentración de 0.5 mg/mL. La presencia del indicador tornó al cultivo de color azul. Cada experimento se realizó por triplicado. La actinobacteria se

clasifica como biodegradadora si el medio de cultivo se decolora a azul claro o a incoloro.

Los cultivos bacterianos en los que visualmente se detectó una degradación del color azul inicial, se volvieron a preparar de la manera indicada anteriormente y se incubaron a 37 °C por 48 h. A los tiempos 0 h, 24 h y 48 h post incubación se tomaron 3 mL de sobrenadante y se centrifugaron. A la solución se le registró el espectro visible de absorción entre (400-800) nm con un espectrofotómetro Perkim Elmer, utilizando cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico. La capacidad de biodegradación de las cepas para cada hidrocarburo se determinó como la relación de la absorbancia a 600 nm entre el tiempo 0 h y las 48 h.

Se prepararon 3 muestras controles que consistieron en: (Control 1) muestras de 5 mL de medio mínimo de sales suplementado con 10 % NaCl y ajustado a pH 8 conteniendo de 50 µL del indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) a una concentración de 0.5 mg/mL; (Control 2) el mismo control 1 el cual contiene además 0.5 µg/mL del hidrocarburo a evaluar; (Control 3) el mismo control 1 el cual fue inoculado con un equivalente a 6×10^7 células (Tubo 2 del Nefelómetro de McFarland). Estas muestras controles también se incubaron a 37 °C por 48 h y sus espectros visibles de absorción se registraron a los mismos tiempos y en las mismas condiciones que las muestras.

Prueba de tolerancia

Se inocularon las cepas de actinobacterias en medio para halófilas moderadas MH el que contenía 10 % NaCl y se ajustó a pH 8. El medio fue complementado además con diferentes concentraciones de los hidrocarburos policíclicos aromáticos antraceno, fenantreno, fluoranteno y pireno. Para ello se prepararon soluciones concentradas de los mismos, utilizando metanol como solvente, y se añadió el volumen suficiente de manera tal que la concentración final del hidrocarburo en el volumen del medio MH fuera 1 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 1000 $\mu\text{g/mL}$ y 5000 $\mu\text{g/mL}$. El medio de cultivo adicionado con los hidrocarburos policíclicos aromáticos se distribuyó equitativamente en cajas Petri. Asimismo, en cada caja se inocularon 6 cepas y se revisó su crecimiento en los siete días de incubación posteriores. El crecimiento se interpretó como (-) cuando fue nulo, (+) cuando fue muy escaso, (++) cuando fue escaso, (+++) cuando fue moderado y (++++) cuando fue óptimo.

RESULTADOS

Muestreo.

La recolección de muestras se realizó en el ex lago de Texcoco, obteniendo un total de 29 muestras de 7 zonas diferentes: Zona 1. N 19° 28' 36.581" O 98° 57' 8.571". Zona 2. N 19° 28' 5.484" O 98° 56' 57.033". Zona 3. N 19° 27' 7.837" O 98° 58' 48.691". Zona 4. N 19° 27' 53.201" O 98° 59' 24.507". Zona 5. N 19° 27' 31.43" O 98° 59' 55.38". Zona 6. N 19° 27' 55.78" O 99° 0' 42.70". Zona 7. N 19° 28' 33.82" O 98° 57' 5.66". Las 29 muestras están distribuidas de la siguiente forma: 9 muestras de agua, 8 muestras de sedimento y 12 muestras de suelo.

Determinación de pH y % de salinidad de las muestras.

El **cuadro I** muestra la caracterización fisicoquímica de las muestras colectadas, así como las coordenadas de la zona de donde se tomó la muestra.

Cepas aisladas de actinobacterias.

Se aislaron un total de 43 cepas de actinobacterias, las cuales fueron elegidas por su morfología tanto macroscópica como microscópica. Macroscópicamente se escogieron por la presencia del micelio aéreo, consistencia dura y crecimiento radial, y microscópicamente si presentaban bacilos Gram positivo en formación filamentosos. De las 43 cepas aisladas, 1 cepa fue aislada de muestras de agua, 17 de muestras suelo y 25 de muestras de sedimentos. Las cepas fueron nombradas como LTXMN-ZZZ donde N es un número del 1 al 29 que indica de cuál de las 29 muestras fue aislada la bacteria (la tabla 1 detalla zona y tipo de muestra de las 29 muestras) y ZZZ es una numeración corrida comenzando en 001 que identifica al número de cepa aislada. Aquellas cepas que no correspondieron con actinobacterias fueron descartadas del estudio.

Características fisiológicas de las actinobacterias.

Las actinobacterias aisladas se clasificaron de acuerdo a su requerimiento de %NaCl para el crecimiento óptimo. Se obtuvieron 8 cepas halotolerantes (crecimiento en presencia y ausencia de % NaCl), 11 cepas halófilas débiles (requieren entre 0.5 %-15 % de NaCl para su crecimiento) y 24 cepas halófilas moderadas (requieren entre 0 %-29 % de NaCl para su crecimiento).

Asimismo, se realizó la clasificación de acuerdo con el pH para el crecimiento óptimo; obteniendo un total de 35 cepas alcalotolerantes (crecen en un rango de pH) y 8 cepas alcalófilas (crecen a un valor de pH mayor a 7). El **cuadro II** muestra el rango de % NaCl y pH que permitieron crecimiento bacteriano, así como los valores de % NaCl y pH para el crecimiento óptimo de cada una. Se muestra la clasificación fisiológica por cepa y el tipo de muestra de la cual se aisló cada una.

De las 11 actinobacterias halófilas débiles, 5 son alcalófilas y 6 alcalotolerantes. De las 24 halófilas moderadas, 2 son alcalófilas y 22 alcalotolerantes. De las 8 halotolerantes, 1 es alcalófila y 7 alcalotolerantes.

Dado que todas las cepas crecieron a 10 % NaCl, y este valor además fue óptimo para la mayoría de ellas, el resto de los experimentos se realizó suplementado el medio de cultivo a 10 % de NaCl. De manera similar, todas las cepas crecieron a un valor de pH 8, por lo tanto el resto de los experimentos se realizó ajustando el pH a este valor.

Biodegradación de los hidrocarburos policíclicos aromáticos: antraceno, fenantreno, fluoranteno y pireno y tolerancia a los mismos

Las 43 cepas aisladas de actinobacterias fueron incubadas en presencia del indicador redox 2, 6 diclorofenol indofenol (DCPIP) y de los hidrocarburos antraceno, fenantreno, fluoranteno y pireno. De ellas, 6 cepas (13.9 %) fueron capaces de cambiar el color de al menos uno de los 4 medios suplementados con los hidrocarburos de azul intenso a azul claro (prácticamente incoloro).

A estas 6 cepas se les determinó entonces la capacidad de degradación de cada hidrocarburo (antraceno, fenantreno, fluoranteno y pireno) mediante el cálculo de la relación de las absorbancias registradas a las 0 y 48 h. El **cuadro III** muestra los resultados obtenidos.

Aquellas cepas que tuvieron un CD48 mayor a 1.8 se considera que tienen una alta capacidad para degradar hidrocarburos (valores menores a 1.2 indican ausencia de degradación). En el **cuadro III** se muestra el CD48 obtenido para las 6 cepas estudiadas con los 4 hidrocarburos evaluados.

Las cepas LTXM10-001 y LTXM23-002 mostraron alta capacidad de degradación para los cuatro hidrocarburos evaluados. Las cepas LTXM14-006 y LTXM15-005 presentan alta capacidad de degradación para los hidrocarburos de alto peso molecular como son el fluoranteno y pireno. La cepa LTXM24-005 mostró alta capacidad de degradación para el fluoranteno y la cepa LTXM14-005 mostró una baja capacidad de degradación para los hidrocarburos evaluados.

Finalmente se determinó la tolerancia a los cuatro hidrocarburos estudiados de las 43 cepas de actinobacterias aisladas. El **cuadro IV** muestra las 6 cepas que mostraron la mayor tolerancia a los hidrocarburos estudiados, y la tolerancia encontrada en las cepas detectadas como degradadoras de hidrocarburos.

Como se puede apreciar en el **cuadro IV**, no hay coincidencia entre las cepas de mayor tolerancia y las degradadoras. Las cepas LTXM14-006 y LTXM23-002 toleran pireno en una alta concentración (5000 $\mu\text{g/mL}$) y son las cepas con mayor capacidad de degradación para este hidrocarburo. Sin embargo, la cepa LTXM15-005 tiene una bajísima tolerancia al pireno y una alta capacidad de degradación de este.

Las cepas con mayor tolerancia a los hidrocarburos fueron aisladas y se clasifican como: LTXM6-010 (suelo, halotolerante y alcalotolerante), LTXM7-007 (suelo, halófila débil, alcalotolerante), LTXM15-001 (sedimento, halófila débil, alcalófila), LTXM23-003 (sedimento, halófila moderada, alcalotolerante), LTXM24-004 (sedimento, halófila moderada, alcalotolerante) y LTXM29-002 (suelo, halófila moderada, alcalotolerante).

Ninguna cepa degradadora fue aislada de suelo, 5 de ellas fueron aisladas de sedimento y una de agua. En el caso de las que presentaron mayor tolerancia a los hidrocarburos, 3 fueron aisladas de suelo y tres de sedimento.

DISCUSIÓN

Los ambientes hipersalinos se encuentran ampliamente extendidos alrededor del mundo, generalmente en regiones que se caracterizan por su alta temperatura (Ramírez et al. 2004). El ex lago de Texcoco en México es uno de estos ambientes; entre sus características fisicoquímicas se encuentran una elevada salinidad y alcalinidad. Estas características fueron confirmadas en este trabajo (**Cuadro I**). Dichas características propician la supervivencia

de organismos extremófilos, capaces de adaptarse a condiciones en las que pocos pueden persistir. En este trabajo se evaluaron 2 condiciones extremas, la salinidad y el pH. En total se aislaron 43 cepas de actinobacterias de las cuales 35 fueron halófilas (73 %) y 8 alcalófilas (19 %), demostrando la diversidad de organismos extremófilos presentes en este ecosistema (ex lago de Texcoco).

Tres medios de cultivos suplementados con 10 % NaCl y pH 9 se utilizaron a fin de ampliar al máximo las posibilidades de aislar actinobacterias halófilas y alcalófilas. Una vez realizada la caracterización fisiológica de las cepas aisladas, se mantuvo la concentración de 10 % de NaCl para el resto de los experimentos, y el pH se ajustó a 8, pues en este pH hubo mejor crecimiento.

Las actinobacterias halófilas combinan su capacidad de producir enzimas extracelulares con su resistencia a la salinidad, lo que las convierte en microorganismos con alto potencial biotecnológico. Un ejemplo de ello es que, 6 de las aisladas del ex lago de Texcoco son capaces de degradar hidrocarburos policíclicos aromáticos como se muestra en el **cuadro III**.

El diclorofenol indofenol (DCPIP) es un indicador redox que cambia su color de azul a incoloro cuando acepta electrones. El control 1 no mostró degradación, indicando que el medio mínimo de sales suplementado con 10 % de NaCl y a pH 8 no decolora al indicador. Este control al igual que los otros se incubaron a 37 °C como las 6 cepas evaluadas, y la presencia de la temperatura tampoco lo decoloró. El control 2 tampoco mostró decoloración,

indicando que la presencia de los hidrocarburos en el medio tampoco afecta el color del indicador. El control 3 tampoco mostró decoloración, indicando que las actinobacterias solo en presencia del medio mínimo de sales no decoloran al indicador, es decir no hay reacción de oxidación entre los microorganismos y el medio o entre los microorganismos y el propio indicador. Por lo tanto, si la actinobacteria se encuentra en el medio de sales mínimo con el indicador sin ninguna otra fuente de carbono que el hidrocarburo, entonces un cambio de color en el medio indica que hay electrones liberándose debido a la oxidación del hidrocarburo (sustrato), es decir por un proceso de biodegradación.

Las actinobacterias halófilas aisladas del ex lago de Texcoco presentaron alta tolerancia a los hidrocarburos policíclicos aromáticos a los que se vieron expuestos (antraceno, fenantreno, fluoranteno y pireno). Pero como se muestra en el **cuadro IV**, una alta tolerancia a los HPA no asegura una capacidad de degradación, como pudiera erróneamente asociarse.

El problema de contaminación por hidrocarburos policíclicos aromáticos crece paulatinamente en todo el mundo. En México se producen miles de barriles de petróleo crudo al día (Petróleos Mexicanos 2016), por lo que existe un riesgo elevado de derrames causados por accidentes durante la extracción o distribución del mismo. El uso de actinobacterias halófilas que demuestran capacidad para degradar hidrocarburos policíclicos aromáticos es una alternativa viable al creciente problema de contaminación, a través de la biorremediación. Este trabajo demuestra que un ecosistema para encontrar

tales bacterias es el ex Lago de Texcoco. No hay trabajos anteriores donde se reporte actinobacterias con esta capacidad aisladas de este ecosistema.

CONCLUSIONES

El ex lago de Texcoco es una fuente de actinobacterias halófilas y halotolerantes degradadoras de hidrocarburos policíclicos aromáticos potencialmente utilizables en procesos de biorremediación de ambientes salinos.

REFERENCIAS

Abdel-Shafy H. I., y Mansour M. S. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egypt. J. Pet.* 25(1), 107-123. DOI /10.1016/j.ejpe.2015.03.011

Acikgoz E., y Ozcan B. (2016). Phenol biodegradation by halophilic archaea. *Int Biodeterior Biodegradation* 107, 140-146. DOI: 10.1016/j.ibiod.2015.11.016

Bučková M., Puškarová A., Chovanová K., Kraková L., Ferianc P., y Pangallo, D. (2013). A simple strategy for investigating the diversity and hydrocarbon degradation abilities of cultivable bacteria from contaminated soil. *World J Microbiol Biotechnol.* 29(6), 1085-1098. DOI: 10.1007/s11274-013-1277-5

de Mesa J. B. L., Quintero G., Vizcaíno A. L. G., Cáceres D. C. J., Riaño S. M. G., y García J. M. (2006). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova* 4(5), 82-90.

Guo G., He F., Tian F., Huang Y., y Wang H. (2016). Effect of salt contents on enzymatic activities and halophilic microbial community structure during phenanthrene degradation. *Int. Biodeterior. Biodegradation*, 110, 8-15. DOI: 10.1016/j.ibiod.2016.02.007

McKinney R (2004). *Environmental Pollution Control Microbiology*. Marcel Dekker, Inc. New York, pp 63-64, 464 pp.

Nawani N., Aigle B., Mandal A., Bodas M., Ghorbel S., and Prakash D. (2013). Actinomycetes: Role in biotechnology and medicine. *BioMed Res. Int.*, Volume 2013, Article ID 687190, 1 page. DOI:10.1155/2013/687190

Nwinyi O. C., Ajayi O. O., y Amund O. O. (2016). Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by two strains of *Pseudomonas*. *Braz J Microbiol*, 47(3), 551-562, DOI: 10.1016/j.bjm.2016.04.026

Obi L. U., Atagana H. I., y Adeleke R. A. (2016). Isolation and characterisation of crude oil sludge degrading bacteria. *SpringerPlus* 5(1), 1946. DOI: 10.1186/s40064-016-3617-z

Olah G., y Molnár A. (2003). Hydrocarbon Chemistry. 2nd edición. Wiley-Interscience, Canadá.

PEMEX; 2016. Base de Datos Institucional. Disponible en:

<http://ebdi.pemex.com/bdi/bdiController.do?action=cuadro&cvecua=EDISCR>

U

Ramírez N., Sandoval H., y Serrano J. (2004). Las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 24 (1-2), 12-23.

Rengarajan T., Rajendran P., Nandakumar N., Lokeshkumar B., Rajendran P., y Nishigaki I. (2015). Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 5(3), 182-189. DOI: 10.1016/S2221-1691(15)30003-4

1 **CUADRO I. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS MUESTRAS**
 2 **COLECTADAS, TIPO DE MUESTRA Y ZONA DE MUESTREO.**

Código de la muestra	pH	% de salinidad	Tipo de muestra	Zona de aislamiento
LTXM1	9.95	24	Suelo	Zona 1
LTXM2	9.81	10	Suelo	Zona 1
LTXM3	9.92	14	Suelo	Zona 2
LTXM4	9.62	3	Suelo	Zona 2
LTXM5	9.15	2	Suelo	Zona 2
LTXM6	10.1	10	Suelo	Zona 3
LTXM7	9.85	3	Suelo	Zona 3
LTXM8	7.29	8	Suelo	Zona 4
LTXM9	9.76	53	Agua	Zona 5
LTXM10	9.81	53	Agua	Zona 5
LTXM11	9.85	50	Agua	Zona 5
LTXM12	9.83	52	Agua	Zona 5
LTXM13	9.4	9	Sedimento	Zona 5
LTXM14	9.22	3	Sedimento	Zona 5
LTXM15	9.38	10	Sedimento	Zona 5
LTXM16	9.44	5	Sedimento	Zona 5
LTXM17	9.43	90	Agua	Zona 6
LTXM18	9.50	85	Agua	Zona 6
LTXM19	9.47	87	Agua	Zona 6
LTXM20	9.5	92	Agua	Zona 6

LTXM21	9.5	92	Agua	Zona 6
LTXM22	9.51	7	Sedimento	Zona 6
LTXM23	9.43	7	Sedimento	Zona 6
LTXM24	9.27	5	Sedimento	Zona 6
LTXM25	9.37	5	Sedimento	Zona 6
LTXM26	9.43	6	Suelo	Zona 7
LTXM27	8.84	2	Suelo	Zona 7
LTXM28	9.77	10	Suelo	Zona 7
LTXM29	9.91	14	Suelo	Zona 7

CUADRO II. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LAS CEPAS DE ACTINOBACTERIAS AISLADAS

Clave de la cepa	Rango de crecimiento (%NaCl)	%NaCl óptimo	Clasificación por %NaCl óptimo	Rango de crecimiento (pH)	pH óptimo	Clasificación por pH óptimo	Origen de la muestra
LTXM3-004	0.5 – 10%	5%	Halófila débil	6 – 12	7 – 8	Alcalotolerante	Suelo
LTXM3-005	0 – 15%	5%	Halotolerante	7 – 9	7	Alcalotolerante	Suelo
LTXM6-005	0.5 – 15%	3 – 5%	Halófila débil	5 – 12	8	Alcalotolerante	Suelo
LTXM6-010	0 – 15%	10%	Halotolerante	7 – 9	7	Alcalotolerante	Suelo
LTXM7-007	0.5 – 15%	3%	Halófila débil	6 – 12	8	Alcalotolerante	Suelo
LTXM10-001	0 – 20%	5 – 15%	Halotolerante	5 – 12	7 – 9	Alcalotolerante	Agua
LTXM14-001	3 – 20%	10%	Halófila moderada	6 – 12	8 – 9	Alcalotolerante	Sedimento
LTXM14-002	3 – 20%	10%	Halófila moderada	6 – 12	8 – 9	Alcalotolerante	Sedimento
LTXM14-003	3 – 20%	10%	Halófila moderada	6 – 12	8 – 9	Alcalotolerante	Sedimento

LTXM14-004	0 – 20%	3 – 10%	Halotolerante	5 – 12	8 – 9	Alcalotolerante	Sedimento
LTXM14-005	0.5 – 20%	10 – 15%	Halófila moderada	5 – 12	8 – 9	Alcalotolerante	Sedimento
LTXM14-006	3 – 15%	10%	Halófila débil	5 – 12	8 – 9	Alcalotolerante	Sedimento
LTXM15-001	5 – 10%	5%	Halófila débil	8 – 12	9	Alcalófila	Sedimento
LTXM15-002	0 – 10%	3%	Halotolerante	8 – 12	9	Alcalófila	Sedimento
LTXM15-005	0.5 – 15%	5 – 10%	Halófila débil	6 – 12	8 – 9	Alcalotolerante	Sedimento
LTXM15-006	0.5 – 20%	10%	Halófila moderada	5 – 12	8 – 9	Alcalotolerante	Sedimento
LTXM15-007	0 – 10%	5%	Halotolerante	6 – 12	8 – 9	Alcalotolerante	Sedimento
LTXM16-002	3 – 20%	10 – 15%	Halófila moderada	6 – 12	8 – 9	Alcalotolerante	Sedimento
LTXM22-001	3 – 20%	10 – 15%	Halófila moderada	6 – 12	8 – 9	Alcalotolerante	Sedimento
LTXM22-002	10%	10%	Halófila moderada	8 – 12	10	Alcalófila	Sedimento
LTXM23-001	3 – 20%	5 – 15%	Halófila débil	6 – 12	8 – 9	Alcalotolerante	Sedimento
LTXM23-002	0.5 – 10%	3%	Halófila débil	8 – 12	9	Alcalófila	Sedimento
LTXM23-003	3 – 20%	10 – 15%	Halófila moderada	5 – 12	8 – 9	Alcalotolerante	Sedimento
LTXM24-001	3 – 20%	10%	Halófila moderada	5 – 12	8 – 9	Alcalotolerante	Sedimento

LTXM24-003	0 – 10%	3 – 5%	Halotolerante	6 – 12	8 – 9	Alcalotolerante	Sedimento
LTXM24-004	3 – 20%	10%	Halófila moderada	6 – 12	8 – 9	Alcalotolerante	Sedimento
LTXM24-005	3 – 20%	10%	Halófila moderada	6 – 12	8 – 9	Alcalotolerante	Sedimento
LTXM24-006	5 – 10%	5%	Halófila débil	8 – 12	9	Alcalófila	Sedimento
LTXM24-008	3 – 15%	10%	Halófila moderada	6 – 12	8 – 9	Alcalotolerante	Sedimento
LTXM25-002	3 – 20%	10%	Halófila moderada	6 – 12	8 – 9	Alcalotolerante	Sedimento
LTXM25-003	3 – 20%	10%	Halófila moderada	6 – 12	8 – 9	Alcalotolerante	Sedimento
LTXM26-002	0.5 – 10%	5%	Halófila débil	8 – 12	9	Alcalófila	Suelo
LTXM26-003	0 – 10%	5%	Halotolerante	6 – 12	8 – 9	Alcalotolerante	Suelo
LTXM27-006	3 – 10%	5%	Halófila débil	8 – 12	9	Alcalófila	Suelo
LTXM28-001	3 – 20%	10%	Halófila moderada	6 – 12	8 – 9	Alcalotolerante	Suelo
LTXM28-003	3 – 20%	10%	Halófila moderada	5 – 12	8 – 9	Alcalotolerante	Suelo
LTXM28-004	3 – 20%	10%	Halófila moderada	6 – 12	8 – 9	Alcalotolerante	Suelo
LTXM28-005	10%	10%	Halófila moderada	8 – 12	10	Alcalófila	Suelo
LTXM28-006	3 – 20%	10%	Halófila moderada	6 – 12	8 – 9	Alcalotolerante	Suelo

LTXM28-007	10%	10%	Halófila moderada	7 – 12	8 – 9	Alcalotolerante	Suelo
LTXM28-008	3 – 15%	10%	Halófila moderada	6 – 12	8 – 9	Alcalotolerante	Suelo
LTXM28-009	3 – 15%	10%	Halófila moderada	6 – 12	8 – 9	Alcalotolerante	Suelo
LTXM29-002	3 – 20%	10%	Halófila moderada	6 – 12	8 – 9	Alcalotolerante	Suelo

CUADRO III. CEPAS CON CAPACIDAD PARA DEGRADAR A LOS HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS ANTRACENO, FENANTRENO, FLUORANTENO Y PIRENO.

Cepa	Capacidad de Degradación(CD ₄₈) por UV-Vis				Clasificación fisiológica	Aislada de
	Antrace -no	Fenan -treno	Fluoran -teno	Pire- no		
Control 1		1.2			Haloalcalotolerant e Halófila moderada, alcalotolerante	Agua Sediment o
Control 2	1.1	1.1	1.1	1.1		
Control 3	1.1	1.1	1.1	1.1		
LTXM10 -001	<u>2.0</u>	<u>2.2</u>	<u>2.6</u>	<u>2.3</u>		
LTXM14 -005	1.6	1.4	1.4	1.4		
LTXM14 -006	1.1	1.6	<u>2.2</u>	<u>3.5</u>		
LTXM15 -005	1.4	1.5	<u>1.9</u>	<u>2.0</u>		
LTXM23 -002	<u>2.0</u>	<u>1.8</u>	<u>2.3</u>	<u>2.7</u>	Halófila débil, alcalófila	Sediment o

LTXM24					Halófila	Sediment
-005					moderada,	o
	1.4	1.5	2.0	1.4	alcalotolerante	

CUADRO IV. CEPAS CON MAYOR TOLERANCIA A LOS HIDROCARBUROS EVALUADOS Y TOLERANCIA A LOS HIDROCARBUROS DE LAS CEPAS DEGRADADORAS.

Cepa	Cepas con mayor tolerancia (ppm)				Tolerancia en cepas degradadoras (ppm)				
	Antra-ceno	Fenan-treno	Fluoran-teno	Pire-no	Antra-ceno	Fenan-treno	Fluoran-teno	Pire-no	
LTXM6-010	5000	5000	5000	5000	LTXM10-001	100	1000	100	100
LTXM7-007	5000	5000	5000	5000	LTXM14-005	100	5000	100	100
LTXM15-001	5000	5000	1000	5000	LTXM14-006	<1	1000	1000	5000
LTXM23-003	5000	1000	5000	5000	LTXM15-005	1000	1000	1000	< 1
LTXM24-004	5000	1000	5000	5000	LTXM23-002	< 1	1000	< 1	5000
LTXM29-002	5000	5000	5000	5000	LTXM24-005	< 1	5000	< 1	100

8. RESULTADOS ADICIONALES

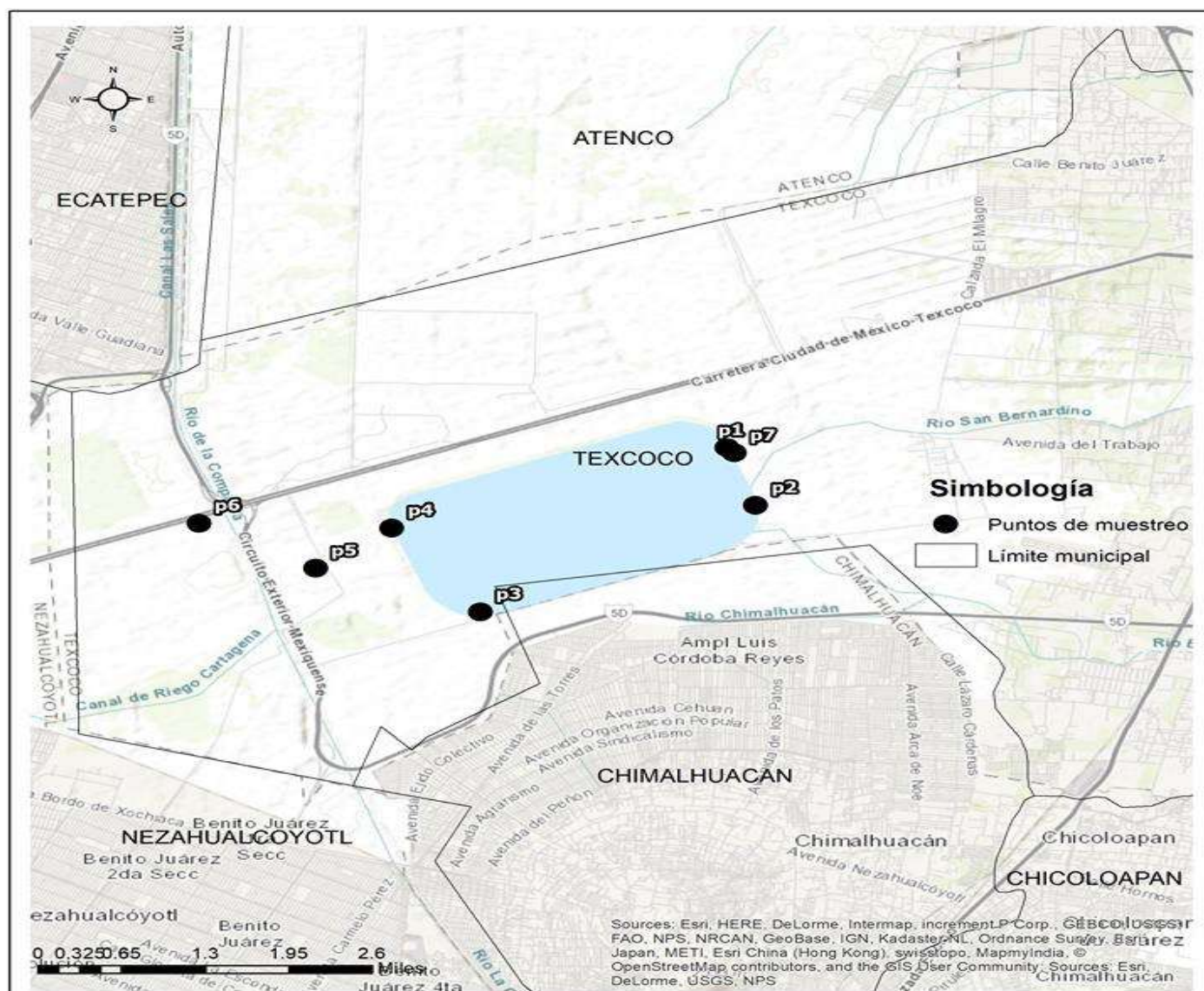
8.1. Puntos de muestreo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD



Fuente: Elaboración propia con base en datos de CONABIO

8.2. Caracterización morfológica de las cepas

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA		
CLAVE DE LA CEPA	MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA
LTXM3-004	TAMAÑO: 2-3 mm COLOR: Blanca FORMA: Estrellada BORDES: Filamentosos ELEVACIÓN: Convexa SUPERFICIE: Rugosa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Dura	Bacilos Gram positivo
LTXM3-005	TAMAÑO: 3-5 mm COLOR: Blanca FORMA: Estrellada BORDES: Aserrados ELEVACIÓN: Convexa SUPERFICIE: Rugosa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Dura	Bacilos Gram positivo. Forman filamentos (Actinobacteria)
LTXM6-005	TAMAÑO: 3-5 mm COLOR: Beige FORMA: Circular BORDES: Filamentosos ELEVACIÓN: Convexa SUPERFICIE: Rugosa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Dura	Bacilos Gram positivo que forman filamentos (Actinobacteria)
LTXM6-010	TAMAÑO: 5-10 mm COLOR: Blanca FORMA: Estrellada BORDES: Aserrados ELEVACIÓN: Plana SUPERFICIE: Lisa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Dura	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.
LTXM7-007	TAMAÑO: 2-3 mm COLOR: Beige FORMA: Circular BORDES: Definidos ELEVACIÓN: Plana	Cocos Gram positivo.

	<p>SUPERFICIE: Filamentosa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Dura</p>	
LTXM10-001	<p>TAMAÑO: 3 – 5 mm COLOR: Beige, esporas blancas FORMA: Circular BORDES: Lobulados ELEVACIÓN: Pulvinata SUPERFICIE: Rugosa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS: No CONSISTENCIA: Dura</p>	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.
LTXM14-001	<p>TAMAÑO: 5 – 10 mm COLOR: Blanca FORMA: Ovalada BORDES: Irregulares ELEVACIÓN: Plana SUPERFICIE: Rugosa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Friable</p>	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.
LTXM14-002	<p>TAMAÑO: 3 – 5 mm COLOR: Beige FORMA: Ovalada BORDES: Definidos ELEVACIÓN: Plana SUPERFICIE: Rugosa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Friable</p>	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.
LTXM14-004	<p>TAMAÑO: 2 – 4 mm COLOR: Beige, esporas blancas FORMA: Circular BORDES: Definidos ELEVACIÓN: Umbonada SUPERFICIE: Rugosa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Friable</p>	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.

LTXM14-005	<p>TAMAÑO: 1 – 2 mm COLOR: Beige, esporas blancas. FORMA: Puntiforme BORDES: Definidos ELEVACIÓN: Plana SUPERFICIE: Rugosa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Friable</p>	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.
LTXM14-006	<p>TAMAÑO: 3 – 5 mm COLOR: Beige FORMA: Circular BORDES: Aserrados ELEVACIÓN: Pulvinata SUPERFICIE: Rugosa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Friable</p>	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.
LTXM15-001	<p>TAMAÑO: 2 – 3 mm COLOR: Beige FORMA: Puntiforme BORDES: Definidos ELEVACIÓN: Convexa SUPERFICIE: Lisa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Dura</p>	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.
LTXM15-002	<p>TAMAÑO: 5 – 10 mm COLOR: Verde, esporas blancas FORMA: Estrellada BORDES: Aserrados ELEVACIÓN: Convexa SUPERFICIE: Rugosa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: Si, verde CONSISTENCIA: Dura</p>	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.

LTXM15-005	<p>TAMAÑO: 3 – 5 mm COLOR: Beige FORMA: Circular BORDES: Lobulados ELEVACIÓN: Convexa SUPERFICIE: Lisa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Dura</p>	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.
LTXM15-006	<p>TAMAÑO: 2 – 4 mm COLOR: Beige, esporas blancas FORMA: Circular BORDES: Lobulados ELEVACIÓN: Plana SUPERFICIE: Rugosa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Friable</p>	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.
LTXM15-007	<p>TAMAÑO: 5 – 10 mm COLOR: Verde, esporas blancas FORMA: Estrellada BORDES: Aserrados ELEVACIÓN: Convexa SUPERFICIE: Rugosa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: Si, verde CONSISTENCIA: Dura</p>	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.
LTXM16-002	<p>TAMAÑO: 1 – 2 mm COLOR: Beige, esporas blancas FORMA: Puntiforme BORDES: Definidos ELEVACIÓN: Plana SUPERFICIE: Lisa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Friable</p>	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.

LTXM22-001	<p>TAMAÑO: 3 – 5 mm COLOR: Beige FORMA: Ovalada BORDES: Lobulados ELEVACIÓN: Plana SUPERFICIE: Rugosa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Friable</p>	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.
LTXM22-002	<p>TAMAÑO: 2 – 4 mm COLOR: Beige FORMA: Estrellada BORDES: Aserrados ELEVACIÓN: Convexa SUPERFICIE: Rugosa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Dura</p>	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.
LTXM23-001	<p>TAMAÑO: 3 – 5 mm COLOR: Blanca FORMA: Circular BORDES: Lobulados ELEVACIÓN: Plana SUPERFICIE: Rugosa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Friable</p>	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.
LTXM23-002	<p>TAMAÑO: 3 – 5 mm COLOR: Verde, esporas blancas FORMA: Circular BORDES: Irregulares ELEVACIÓN: Convexa SUPERFICIE: Rugosa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: Si, verde CONSISTENCIA: Dura</p>	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.

LTXM23-003	<p>TAMAÑO: 2 – 4 mm COLOR: Blanca FORMA: Circular BORDES: Irregulares ELEVACIÓN: Plana SUPERFICIE: Rugosa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Friable</p>	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.
LTXM24-001	<p>TAMAÑO: 5 – 8 mm COLOR: Blanca FORMA: Ovalada BORDES: Definidos ELEVACIÓN: Plana SUPERFICIE: Rugosa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Friable</p>	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.
LTXM24-003	<p>TAMAÑO: 3 – 5 mm COLOR: Beige FORMA: Circular BORDES: Definidos ELEVACIÓN: Convexa SUPERFICIE: Lisa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Dura</p>	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.
LTXM24-004	<p>TAMAÑO: 2 – 4 mm COLOR: Blanca FORMA: Ovalada BORDES: Irregulares ELEVACIÓN: Plana SUPERFICIE: Rugosa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Friable</p>	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.

LTXM24-005	<p>TAMAÑO: 2 – 4 mm COLOR: Blanca FORMA: Ovalada BORDES: Irregulares ELEVACIÓN: Plana SUPERFICIE: Rugosa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Friable</p>	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.
LTXM24-006	<p>TAMAÑO: 1 – 2 mm COLOR: Beige, esporas blancas FORMA: Puntiforme BORDES: Aserrados ELEVACIÓN: Convexa SUPERFICIE: Lisa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Dura</p>	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.
LTXM24-008	<p>TAMAÑO: 2 – 4 mm COLOR: Beige FORMA: Circular BORDES: Lobulados ELEVACIÓN: Plana SUPERFICIE: Rugosa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Friable</p>	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.
LTXM25-002	<p>TAMAÑO: 2 – 4 mm COLOR: Blanca FORMA: Circular BORDES: Lobulados ELEVACIÓN: Plana SUPERFICIE: Rugosa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Friable</p>	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.

LTXM25-003	<p>TAMAÑO: 2 – 4 mm COLOR: Blanca FORMA: Circular BORDES: Irregulares ELEVACIÓN: Plana SUPERFICIE: Rugosa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Friable</p>	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.
LTXM26-002	<p>TAMAÑO: 2 – 4 mm COLOR: Beige FORMA: Estrella BORDES: Aserrados ELEVACIÓN: Convexa SUPERFICIE: Rugosa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Dura</p>	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.
LTXM26-003	<p>TAMAÑO: 3 – 5 mm COLOR: Beige FORMA: Circular BORDES: Lobulados ELEVACIÓN: Convexa SUPERFICIE: Lisa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Dura</p>	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.
LTXM27-001	<p>TAMAÑO: 2 – 4 mm COLOR: Beige FORMA: Circular BORDES: Lobulados ELEVACIÓN: Convexa SUPERFICIE: Lisa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Dura</p>	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.

LTXM27-006	<p>TAMAÑO: 2 – 3 mm COLOR: Beige FORMA: Estrella BORDES: Aserrados ELEVACIÓN: Convexa SUPERFICIE: Rugosa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Dura</p>	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.
LTXM28-001	<p>TAMAÑO: 2 – 4 mm COLOR: Beige, esporas blancas FORMA: Circular BORDES: Definidos ELEVACIÓN: Convexa SUPERFICIE: Rugosa ASPECTO: Húmeda LUZ REFLEJADA: Brillante LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Cremosa</p>	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.
LTXM28-003	<p>TAMAÑO: 5 – 10 mm COLOR: Blanca FORMA: Circular BORDES: Lobulados ELEVACIÓN: Plana SUPERFICIE: Rugosa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Friable</p>	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.
LTXM28-004	<p>TAMAÑO: 2 – 4 mm COLOR: Blanca FORMA: Circular BORDES: Definidos ELEVACIÓN: Umbonada SUPERFICIE: Rugosa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Friable</p>	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.

LTXM28-005	<p>TAMAÑO: 1 – 3 mm COLOR: Beige FORMA: Estrella BORDES: Aserrados ELEVACIÓN: Convexa SUPERFICIE: Rugosa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Dura</p>	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.
LTXM28-006	<p>TAMAÑO: 3 – 5 mm COLOR: Blanca FORMA: Circular BORDES: Lobulados ELEVACIÓN: Plana SUPERFICIE: Rugosa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Friable</p>	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.
LTXM28-007	<p>TAMAÑO: 2 – 3 mm COLOR: Café, esporas blancas FORMA: Estrella BORDES: Aserrados ELEVACIÓN: Convexa SUPERFICIE: Rugosa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Dura</p>	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.
LTXM28-008	<p>TAMAÑO: 1 – 3 mm COLOR: Blanca FORMA: Circular BORDES: Irregulares ELEVACIÓN: Plana SUPERFICIE: Rugosa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Friable</p>	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.

LTXM28-009	TAMAÑO: 3 – 5 mm COLOR: Blanca FORMA: Circular BORDES: Definidos ELEVACIÓN: Convexa SUPERFICIE: Rugosa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Dura	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.
LTXM29-002	TAMAÑO: 1 – 3 mm COLOR: Blanca FORMA: Circular BORDES: Definidos ELEVACIÓN: Umbonada SUPERFICIE: Rugosa ASPECTO: Seca LUZ REFLEJADA: Mate LUZ TRANSMITIDA: Opaca PRODUCCIÓN DE PIGMENTO: No CONSISTENCIA: Friable	Bacilos Gram positivo, forman filamentos.

8.3. Tolerancia a Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos

Clave de la cepa	Antraceno	Fluoranteno	Fenantreno	Pireno
LTXM3-004	0 ppm	0 ppm	0 ppm	0 ppm
LTXM3-005	0 ppm	0 ppm	0 ppm	0 ppm
LTXM6-005	100 ppm	100 ppm	100 ppm	100 ppm
LTXM6-010	5000 ppm	5000 ppm	5000 ppm	5000 ppm
LTXM7-007	5000 ppm	5000 ppm	5000 ppm	5000 ppm
LTXM14-001	100 ppm	100 ppm	5000 ppm	100 ppm
LTXM14-002	100 ppm	100 ppm	100 ppm	100 ppm
LTXM14-003	100 ppm	0 ppm	5000 ppm	100 ppm
LTXM14-004	100 ppm	0 ppm	5000 ppm	100 ppm
LTXM14-005	100 ppm	100 ppm	5000 ppm	100 ppm
LTXM14-006	0 ppm	1000 ppm	1000 ppm	5000 ppm
LTXM15-001	5000 ppm	1000 ppm	5000 ppm	5000 ppm
LTXM15-002	5000 ppm	1000 ppm	1000 ppm	5000 ppm
LTXM15-005	1000 ppm	1000 ppm	1000 ppm	0 ppm
LTXM15-006	100 ppm	1000 ppm	1000 ppm	5000 ppm
LTXM15-007	5000 ppm	1000 ppm	1000 ppm	0 ppm
LTXM16-002	100 ppm	100 ppm	1000 ppm	100 ppm
LTXM22-001	100 ppm	100 ppm	100 ppm	100 ppm
LTXM22-002	0 ppm	0 ppm	0 ppm	5000 ppm
LTXM23-001	5000 ppm	0 ppm	1000 ppm	5000 ppm

LTXM23-002	0 ppm	0 ppm	1000 ppm	5000 ppm
LTXM23-003	5000 ppm	5000 ppm	1000 ppm	5000 ppm
LTXM24-001	5000 ppm	100 ppm	1000 ppm	100 ppm
LTXM24-003	100 ppm	100 ppm	1000 ppm	100 ppm
LTXM24-004	5000 ppm	5000 ppm	1000 ppm	5000 ppm
LTXM24-005	0 ppm	0 ppm	5000 ppm	100 ppm
LTXM24-006	0 ppm	0 ppm	0 ppm	0 ppm
LTXM24-008	5000 ppm	5000 ppm	1000 ppm	100 ppm
LTXM25-002	5000 ppm	1000 ppm	0 ppm	100 ppm
LTXM25-003	100 ppm	100 ppm	5000 ppm	100 ppm
LTXM26-002	0 ppm	0 ppm	5000 ppm	0 ppm
LTXM26-003	100 ppm	100 ppm	100 ppm	100 ppm
LTXM27-006	100 ppm	100 ppm	1000 ppm	100 ppm
LTXM28-001	100 ppm	100 ppm	5000 ppm	100 ppm
LTXM28-003	1000 ppm	1000 ppm	5000 ppm	1000 ppm
LTXM28-004	0 ppm	100 ppm	5000 ppm	100 ppm
LTXM28-005	0 ppm	0 ppm	5000 ppm	0 ppm
LTXM28-006	1000 ppm	1000 ppm	5000 ppm	5000 ppm
LTXM28-007	5000 ppm	0 ppm	0 ppm	0 ppm
LTXM28-008	1000 ppm	0 ppm	1000 ppm	5000 ppm
LTXM28-009	100 ppm	0 ppm	5000 ppm	0 ppm
LTXM29-002	5000 ppm	5000 ppm	5000 ppm	5000

9. CONCLUSIONES

9.1. Conclusiones Generales

El espectro salino y el espectro de pH permitieron distribuir a las bacterias en la clasificación de halófilas, halotolerantes, alcalófilas y alcalotolerantes. Se aislaron 43 cepas de Actinobacterias, de las cuales, 8 son haloalcalófilas, 8 son haloalcalotolerantes y 27 son halófilas y alcalotolerantes.

La concentración máxima de hidrocarburos policíclicos aromáticos que toleraron las Actinobacterias fue de 5000 ppm. El hidrocarburo en el que existió mayor crecimiento bacteriano fue el fenantreno. La tolerancia fue menor en el caso del fluoranteno.

Seis de las cepas de actinobacterias demostraron tener la capacidad de degradar los hidrocarburos policíclicos aromáticos antraceno, fenantreno, fluoranteno y pireno, en la

prueba colorimétrica de biodegradación. Sin embargo, no fueron las mismas cepas que toleraron la mayor concentración de estos hidrocarburos.

La capacidad de tolerancia de las actinobacterias a los hidrocarburos policíclicos aromáticos no asegura el potencial de biodegradación de los mismos.

9.2. Limitaciones

Una de las limitantes de la presente investigación fue el periodo de tiempo en el que se realizó, así como la carencia de equipos de química analítica necesarios para la cuantificación de la degradación de los hidrocarburos.

9.3. Recomendaciones

Se sugiere dar seguimiento a la investigación a través de un análisis cuantitativo de la degradación de hidrocarburos, así como la identificación de los productos de la misma.

10. Referencias Bibliográficas:

Acikgoz, E. y B. Ozcan. "Phenol biodegradation by halophilic archaea" *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2016; Volumen 107: 140-146.

ATSDR: Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades [Internet]. Atlanta: ATSDR; c2016 [actualizado 6 Mayo 2016; citado 22 Oct 2016]. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos. Disponible en: http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs69.html

Al-Mueini, R; Al- Dalali, M.; y col. "Hydrocarbon degradation at high salinity by a novel extremely halophilic actinomycete". CSIRO publishing. 2007; Volumen 4: 5 – 7.

Benavides, J.; Quintero, G.; y col. "Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo". NOVA. 2006; Volumen 4 (5): 82-90.

Bonfá, M.; Grossman, M.; y col. "Biodegradation of aromatic hydrocarbons by Haloarchaea and their use for the reduction of the chemical oxygen demand of hypersaline petroleum produced water". Chemosphere. 2011; Volumen 84: 1671-1676.

Botello, A.; Rendón, J.; y col. "Golfo de México: contaminación e impacto ambiental, diagnóstico y tendencias". Segunda edición. México: Universidad Autónoma de Campeche; 2005.

CNH: Comisión Nacional de Hidrocarburos [Internet] México: CNH; 2016. [consultado 12 Oct 2016]. Información estadística y geográfica. Disponible en: <http://www.gob.mx/cnh/acciones-y-programas/geoestadisticas55319?idiom=es>.

Cui, C.; Ma, L.; Shi, J.; y col. "Metabolic pathway for degradation of anthracene by halophilic *Marteella* sp. AD-3". International Biodeterioration & Biodegradation. 2014; Volúmen 89: 67-73.

Durvasula, Ravi V. y D.V. Subba Rao, coord. 2018. "Extremophiles: From Biology to Biotechnology". CRC Press.

Fang, J.; Zhang, L. y D. Bazylinski. "Deep-sea piezosphere and piezophiles: geomicrobiology and biogeochemistry". Trends in Microbiology. 2010; Volumen 18: 413 – 422.

Fichas Internacionales de Seguridad Química [Internet]. España: Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. [citado 21 Oct 2016]. Disponible en: <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/FISQ/Ficheros/1401a1510/nspn1474.pdf>

Gochnauer, M.; Leppard, G.; y col. "Isolation and characterization of *Actinopolyspora halophila*, gen. et sp. nov., an extremely halophilic actinomycete". Canadian Journal of Microbiology. 1975; Volumen 21 (10): 1500-1511.

González Ornelas, I. (2014). Almacenes de Carbono Orgánico en tres sitios con diferente cobertura vegetal de la zona federal del ex lago de Texcoco. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de México.

Guo, G.; He, F.; Tian, F.; y col. "Effect of salt contents on enzymatic activities and halophilic microbial community structure during phenanthrene degradation". *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2016; Volúmen 110: pp. 8-15.

Hamedi, J.; Mohammadipanah, F. y A. Ventosa. "Systematic and biotechnological aspects of halophilic and halotolerant actinomycetes". *Extremophiles*. 2013; Volúmen 17: 1 – 13.

Hao, R. y A. Lu. "Biodegradation of heavy oils by halophilic bacterium". *Progress in Natural Science*. 2009; Volúmen 19: 997-1001.

Higgins, I. and R. Burns. "The Chemistry and Microbiology of Pollution". Gran Bretaña: Editorial Academic Press; 1978.

Jiménez, B. "La contaminación ambiental en México". México: Editorial Limusa; 2005.

Kishcha, P.; Starobinets, B. y col. "Observations of Unexpected Short-Term Heating in the Uppermost Layer of the Dead Sea after a Sharp Decrease in Solar Radiation". *International Journal of Oceanography*. 2017; Volumen 2017: 1 – 12.

Kuppusamy, S.; Thavamani, P.; Megharaj, M.; y col. "Isolation and characterization of Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degrading, pH tolerant, N-fixing and P-solubilizing novel bacteria from manufactured gas plant (MGP) site soils". *Environmental Technology & Innovation*. 2016; Volúmen 16: 1-42.

Lara, R.; Camacho, M.; Casanova, E.; y col. "Haloalkalitolerant Actinobacteria with capacity for anthracene degradation isolated from soils close to areas with oil activity in the State of Veracruz, Mexico". *International Microbiology*. 2016; Volúmen 19: 15-26.

Le Borgne, S.; Paniagua, D. y R. Vázquez. "Biodegradation of Organic Pollutants by Halophilic Bacteria and Archaea". *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2008; Volúmen 15: 74-92.

MacElroy, R. D. "Some Comments on the Evolution of Extremophiles". *Biosystems*. 1974; No. 6: 74-75.

Marguesin, R. y V. Miteva. "Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms". *Research in Microbiology*. 2011; Volumen 162: 346 – 361.

Martins da Silva, P.; Berg, M.; Serrano, A.; Dubs, F. y P. Sousa. "Environmental factors at different spatial scales governing soil fauna community patterns in fragmented forests". *Landscape Ecology*. 2012; Volúmen 27 (9): 1337-1349.

McKinney, R. "Environmental Pollution Control Microbiology". Estados Unidos de América: Editorial Marcel Dekker Ink; 2004.

Medina, H. y Z. Evangelista. "Aislamiento y búsqueda de Actinobacterias del suelo productoras de enzimas extracelulares y compuestos con actividad antimicrobiana". *UNACAR TECNOCENCIA*. Enero 2011: 72-94.

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente [Internet]. España: PRTR. [citado 21 Oct 2016] Registro Estatal de Emisiones y Fuentes Contaminantes. Disponible en: <http://www.prtr-es.es/Antraceno,15648,11,2007.html>

Morozkina, E.V.; Slutskaya, T.V.; y col. "Extremophilic Microorganisms: Biochemical Adaptation and Biotechnological Application (Review)". *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2010; Volúmen 46 (1): 1 – 14.

Nwinyi, O.; Ajayi, O. y O. Amund. "Degradation of polinuclear aromatic hydrocarbons by two strains of *Pseudomonas*". *Brazilian Journal of Microbiology*. 2016; Volúmen 47: 551-562.

Olah, G. y A. Molnár. "Hydrocarbon Chemistry". Segunda edición. Canadá: Editorial Wiley-Interscience; 2003.

Olando, E.; Higashi, T.; Kambayashi, Y.; y col. "Exposure to daily ambient particulate Polycyclic aromatic hydrocarbons and cough occurrence in adult chronic cough patients: A longitudinal study". *Atmospheric Environment*. 2016; Volúmen 140: 34-41.

Otero, A.; Cruz, P. y Y. Velasco. "Evaluación del efecto del hidrocarburo fenantreno sobre el crecimiento de *Chlorella vulgaris*". *Acta de Biología Colombiana*. 2013; Volumen 18 (2): 87-98.

PEMEX: Petróleos Mexicanos [Internet] México: PEMEX; 2016. [consultado 13 de Oct 2016]. Base de Datos Institucional. Disponible en: <http://ebdi.pemex.com/bdi/bdiController.do?action=cuadro&cvecua=EDISCRU>.

Quesada, E.; Ventosa, A. y col. "Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative bacteria from hypersaline soils". *General Microbiology*. 1983; Volúmen 129: 2649 – 2657.

Rampelotro, Pabulo H., coord. 2016. "Biotechnology of Extremophiles". Suiza: Springer International Publishing.

Red de Intercambio de Información Química. [Internet]. Bolivia: RIIQ. [consultado 22 Oct 2016]. Disponible en: http://www.estis.net/sites/cien-bo/default.asp?site=cien-bo&page_id=48148A46-2CBC-416E-87A9-2674B5DBD5B9#

Revelo, D.; Gómez, M.; Concha, M.; y col. "Characterization of hydrocarbonoclastic marine bacteria using the 16S rRNA gene: a microcosm case study" *DYNA*. 2013; Volúmen 180: 122-129.

Sharma, A.; Gohel, S. y Satya Singh. "Actinobase: Database on molecular diversity, phylogeny and biocatalytic potential of salt tolerant alkaliphilic actinomycetes". *Bioinformatics. Discovery at the interface of physical and biological sciences*. Junio 2012; Volumen 8 (11): 535-538.

Smith, I; Lynne, B. y col. "The formation of geyser eggs at Old Faithful Geyser, Yellowstone National Park, U.S.A." *Geothermics*. 2018. Volúmen 75: 105 – 121.

Soto-Padilla, M.; Valenzuela-Encinas, C.; y col. "Isolation and phylogenic identification of soil haloalkaliphilic strains in the former Texcoco Lake". *International Journal of Environmental Health Research*. 2014; Volúmen 24 (1): 82 – 90.

Xue, Y.; Sun, X.; Zhou, P.; y col. "Gordonia paraffinivorans sp. nov., a hydrocarbon-degrading actinomycete isolated from an oil-producing well". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2003; Volumen 53: 1643 – 1646.

Zhou, L.; Li, H.; Zhang, Y. y col. "Sphingomonas from petroleum-contaminated soils in Shenfu, China and their PAHs degradation abilities". *Brazilian Journal of Microbiology*. 2016 Volume 47: 271-278.

Zhu, X.; Ni, X.; y col. "Biodegradation of Mixed PAHs by PAH-Degrading Endophytic Bacteria". *International Journal of Enviromental Research and Public Health*. 2016; Volumen 13:1-13.