



INSTITUTO TECNOLÓGICO
SUPERIOR DE MISANTLA

**EVALUACIÓN DE UN CEPARIO
BACTERIANO EN LA
DEGRADACIÓN DE BTEX**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO AMBIENTAL

P R E S E N T A

PAULINA DOMÍNGUEZ CRUZ

DIRECTOR:

MBt. GUADALUPE CORELLY SALAZAR SALAZAR

CODIRECTOR:

MC. YOVANI LÓPEZ GONZALEZ



**INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE MISANTLA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES
AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

FECHA: 25 de Mayo de 2022.

ASUNTO: **AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN
DE TESIS PROFESIONAL.**

A QUIEN CORRESPONDA:

Por medio de la presente hago constar que el (la) C:

PAULINA DOMÍNGUEZ CRUZ

pasante de la carrera de INGENIERÍA AMBIENTAL con No. de Control 172T0003 ha cumplido satisfactoriamente con lo estipulado por el **Manual de Procedimientos para la Obtención del Título Profesional de Licenciatura** bajo la opción **Titulación Integral (Tesis Profesional)**

Por tal motivo se **Autoriza** la impresión del **Tema titulado:**

“EVALUACIÓN DE UN CEPARIO BACTERIANO EN LA DEGRADACIÓN DE BTEX”

Dándose un plazo no mayor de un mes de la expedición de la presente a la solicitud del Acto de Recepción para la obtención del Título Profesional.

ATENTAMENTE


Mii. GRACIELA GUADALUPE AGUILERA ALVAREZ
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES



Archivo.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo más que nada a mi familia, mis padres y hermanos, pues ellos fueron parte esencial para concluir este trabajo, son los constructores de lo cual hoy soy, por su agudeza, comprensión, apoyo y más que nada, por su infinito amor.

De manera especial a mi hermana Olga Lidia y Miguel Ángel que me han brindado capacidades para seguir adelante, que con esfuerzo me han tendido su mano en todo el trayecto de la carrera. A mi hermana María del Pilar que continuamente me estuvo animando en los tiempos más difíciles de mi vida. A mi hermana Maricruz ya que siempre estuvo a mi lado y me ayudó incondicionalmente. A mi hermana Martha que continuamente estuvo de mi mano ofreciéndome todo su apoyo y afecto. A Román pues me ha enseñado la importancia de buscar nuestros sueños y motivarme a seguir mi camino, a todos ellos pues son las personas más importantes en mi vida, que debido al amor y unión que me ofrecen puedo hacer esta meta realidad. A toda la gente que me han apoyado y me han motivado a hacer este trabajo exitosamente. De forma particular a mi asesor de tesis, por haber dedicado su tiempo no solo en la preparación de este trabajo, sino durante toda la carrera universitaria y haberme brindado las herramientas necesarias para terminar este proyecto.

También a mis abuelos que, aunque ya no están aquí, sé que desde el cielo contemplan este logro.

Todas estas personas fueron el motivo de inspiración para concluir este trabajo, por animarme, apoyarme y confiar en mí, además de que forman parte muy especial en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, le agradezco a Dios por brindarme la oportunidad de cumplir esta meta y por estar a mi lado acompañando cada uno de mis pasos, darme confianza y ganas de salir adelante, bendecirme a lo largo de esta vida, ser el soporte y fuerza en aquellos momentos de dificultad.

Agradezco infinitamente a mis padres, Ángel y Juliana, quienes sacrificaron su vida por brindarme la oportunidad de estudiar la maravillosa carrera de ingeniería ambiental, por trabajar duro para que lograra culminar esta bonita etapa. También agradezco a cada uno de mis hermanos y hermanas que me apoyaron en este largo camino.

A todos mis amigos que siempre permanecieron junto a mí me animaron aún en momentos difíciles, sin duda alguna son quienes por aspiración de la vida llegaron a ser parte de mi familia.

De igual forma a cada uno de mis compañeros de la carrera porque siempre me brindaron su ayuda, compartieron conmigo sus conocimientos, en su momento me explicaron y enseñaron cosas que yo aún no comprendía y más que nada a mis magistrales, quienes sin su ayuda nunca hubiera podido hacer este trabajo gracias a sus conocimientos me he desenvuelto en esta carrera y me ayudaron a comprenderla. Sin duda alguna a mis amigas y compañeras de estudio porque me brindaron su atención, consejos y apoyo incondicional, siempre me escucharon y me ayudaron a superar mis miedos.

A cada uno de los miembros del departamento de ingeniería ambiental que conforman el comité mis más sinceros agradecimientos.

Así mismo al Tecnológico de Misantla (ITSM) por abrirme las puertas de su plantel y ofrecer una educación de calidad con muchas conformidades. Y en definitiva a una persona muy significativa en mi vida que sin imaginar se convirtió en mi mejor ayuda, vio en mí lo que nadie más, incluso por animarme a dar mucho más y sobre todo por la confianza que puso en mí, a mi tutora de tesis, ella es quien se merece toda mi gratitud, además por tenerme la paciencia para continuar este trabajo y sobre todo por ayudarme a concluirlo.

ÍNDICE

DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTOS	4
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLA.....	9
CAPÍTULO I. GENERALIDADES	10
1.1 Introducción	10
1.2 Planteamiento del problema.....	12
1.3 Justificación	13
1.4 Objetivos	14
1.4.1 Objetivo general.....	14
1.4.2 Objetivos específicos	14
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	15
2.1 Complejo BTEX.....	15
2.1.1 ¿Qué son los BTEX?	15
2.1.1.1 Benceno.....	15
2.1.1.2 Tolueno.....	16
2.1.1.3 Etilbenceno	17
2.1.1.4 Xileno.....	17
2.1.2 Clasificación.....	17
2.1.3 Propiedades generales	18
2.1.3.1 Propiedades físicas.....	18
2.1.3.2 Propiedades químicas.....	19
2.1.3.3 Propiedades tóxicas.....	20
2.1.4 Repercusiones negativas.....	21
2.1.5 Riesgos a la salud.....	22
2.2 Remoción de complejo BTEX.....	23
2.2.1 Biorremediación	23
2.2.2 Biodegradación	26
2.3 Caracterización de bacterias con potencial de degradación de BTEX.....	27
2.3.1 Tinción de Gram.....	27

2.3.2 Producción de energía	28
2.4 Diversidad metabólica	30
2.4.1 Fotoautótrofas	30
2.4.2 Litótrofas y Organotrofas	30
2.4.3 Heterótrofos	30
2.4.4 Protótrofas	31
2.4.5 Autótrofas.....	31
2.5 Aerobios, anaerobios y fermentadores.....	31
2.6 Cinéticas de degradación	33
2.7 Aislados bacterianos	33
2.8 Construcción de ceparios.....	36
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA.....	38
3.1 Preparación de medios de cultivos.....	38
3.2 Disposición y resguardo del cepario.....	39
3.3 Colecta de muestras	40
3.4 Crecimiento bacteriano en medios nutritivos	42
3.5 Confirmación de cultivos puros	43
3.6 Almacenamiento y resiembras del cepario	44
3.7 Bioensayos de tolerancia a los BTX y Nb.....	44
3.8 Consumo de BTX como fuente de carbono.....	46
3.9 Descripción de cepas	47
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
4.1 Preparación y obtención de medios de cultivo.....	49
4.2 Recolección de cepas y microbiota bacteriana.....	49
4.3 Crecimiento del cepario.....	51
4.4 Verificación de cultivos puros.	52
4.5 Ensayos en caja Petri con los monocíclicos aromáticos.....	53
4.5.1 Tolerancia a Benceno	54
4.5.2 Tolerancia a Tolueno	54
4.5.3 Tolerancia a Xileno	55
4.5.4 Tolerancia a Nitrobenceno	56
4.6 Degradación de monocíclicos aromáticos – BTX y Nb.	57
4.7 Descripción del cepario	60
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	62

CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍAS.....	63
ANEXOS.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Producción anual de los BTEX a nivel mundial.....	18
Figura 2.	Compuestos orgánicos de gama gasolina BTEX	20
Figura 3.	Esquema de las reacciones.....	32
Figura 4.	Efecto de la salinidad sobre la tasa de degradación del Tolueno.....	34
Figura 5.	Medio de cultivo LB sin contaminación	38
Figura 6.	Entrega del consorcio bacteriano	39
Figura 7.	Activación de las cepas bacterianas	39
Figura 8.	Localización de los talleres	40
Figura 9.	Variantes de la técnica de siembra ‘estría cruzada’	41
Figura 10.	Ejemplo de cultivo puro bacteriano	42
Figura 11.	Base de papel para la técnica “picar colonia”	43
Figura 12.	Diseño de una caja Petri con monocíclicos aromáticos.....	43
Figura 13.	Diferentes niveles de crecimiento bacteriano	44
Figura 14.	Tubos de ensayo con capacidad de 8 mL	44
Figura 15.	Medio LB en caja Petri sin contaminación	47
Figura 16.	Resiembra y activación de cuatro cepas bacterianas	48
Figura 17.	Homogenización de la muestra.....	48
Figura 18.	Crecimiento dispar de los microorganismos	49
Figura 19.	Base de papel para técnica “picar colonia”	49
Figura 20.	Crecimiento de bacterias y hongos en medio Métodos Estándar.....	50
Figura 21.	Crecimiento de cepas definidas en una caja Petri.....	50
Figura 22.	Disposición espacial de las cepas en los ensayos.....	51
Figura 23.	Crecimiento de cepas bacterianas expuestas a Benceno.....	52
Figura 24.	Crecimiento de cepas bacterianas expuestas a Tolueno.....	53
Figura 25.	Crecimiento de cepas bacterianas expuestas a Xileno.....	54
Figura 26.	Crecimiento de cepas bacterianas expuestas a Nitrobenceno.....	54
Figura 27.	Tolerancia en bioensayos con BTX..	55

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1.	Propiedades físicas de los BTEX.....	19
Tabla 2.	Propiedades tóxicas de los BTEX.....	21
Tabla 3.	Tinción de Gram, tiempos y características.....	28
Tabla 4.	Medios de cultivo para la siembra de microorganismos	38
Tabla 5.	Concentración de medio mineral.....	39
Tabla 6.	Ubicación geográfica de los puntos de muestreo.....	40
Tabla 7.	Niveles de turbidez	46
Tabla 8.	Características morfológicas	47
Tabla 9.	Morfología del cepario aclimatado.....	52
Tabla 10.	Bioensayos en tubos de ensayo	57
Tabla 11.	Resultados finales de cepas con capacidad de degradación.....	58
Tabla 12.	Descripción de las cepas.....	59
Tabla 13.	Descripción de las cepas.....	71

CAPÍTULO I. GENERALIDADES

1.1 Introducción

El aumento de las industrias comúnmente ha causado, además de beneficios para la vida humana, extenso mal al medio ambiente debido al uso de gran proporción de desperdicios tóxicos. En México, la explotación del petróleo en su grupo ha afectado de manera negativa en materia ambiental, debido a la extensa variedad de productos derivados del petróleo, no obstante, no es viable evaluar cuantitativamente la contaminación implicada a partir de explotación hasta la obtención de los servicios petroquímicos básicos (Brito et al., 2003).

Los monocíclicos aromáticos son los compuestos más solubles de todos los elementos de la gasolina y son los agentes más contaminantes presentes en agua y el suelo. Además de esto, ocasionan diferentes efectos a la salud humana entre los que se destaca la cianosis, carcinogénesis y mutagénesis, además la irritación de piel y pulmones (Mello et al., 2007).

Se considera que, en México, hay una vasta diversidad de industrias que usan los hidrocarburos aromáticos como materia prima, dichos son liberados al medio ambiente y no existe ni una legislación que limite la utilización de los BTEX en el combustible y en las dependencias. Sarmiento (2003) estima que 42% del total de los incidentes medioambientales entre 1993 y 2002 han estado en relación con accidentes por escapes de hidrocarburos (Cavazos-Arroyo et al., 2018).

Uno de los siniestros con más difusión ocurrió el 16 de enero de 2002 en Acatzingo, Puebla en la cual se localizó al sur de la autopista Puebla- Orizaba, gracias a una fuga de hidrocarburo crudo, involucrando heridos. En esta zona, tras el paso de los años se han detectado otras dispersiones que han llegado a dañar la salud humana, así como en algunas épocas afectando cultivos, sistemas de riego, superficies terrestres, variedad de animales y medio ambiente (Cavazos et al., 2014).

Durante los últimos años ha sido objeto de intensa investigación el progreso de biotecnologías que concreten los procesos fisicoquímicos ya existentes, basados en la utilización de microorganismos para la recuperación de ambientes contaminados (Bracho, 2011).

Además, México es un país en proceso de avances tecnológicos, por lo que es necesario evolucionar e implementar procesos biotecnológicos a bajo costo y afines con el medio ambiente, para tratar sitios contaminados con los hidrocarburos aromáticos (Morlett, 2009).

Aunado a esto, uno de los principales mecanismos para la eliminación de hidrocarburos es la biorremediación, este método depende de la presencia en el lugar contaminado de microorganismos con la capacidad metabólica adecuada para convertir los compuestos xenobióticos, en compuestos que puedan ser reincorporados a los ciclos biogeoquímicos. De tal manera que uno de los principales mecanismos para eliminar los hidrocarburos potencialmente contaminantes del suelo es la atenuación natural; con esta tecnología, la biodegradación tiene lugar *in situ*, por medio de técnicas fisicoquímicas de interacción.

1.2 Planteamiento del problema

Las bacterias son un grupo de organismos versátiles gracias a su capacidad metabólica y han sido de utilidad para el hombre aún antes de su existencia. El conocimiento de las características más generales de este grupo taxonómico es fundamental para comprender el cómo han podido evitar pérdidas económicas en cosechas de productos agrícolas; cómo podrían cultivarse o modificarse para producir metabolitos de interés farmacéutico o cuáles serían las condiciones abióticas que necesitan para que, a través de procesos enzimáticos puedan modificar, degradar o mineralizar diversos compuestos tóxicos.

Sin embargo, el estudio integral de las especies microbianas requiere años de estudio con comprobación de variables abióticas, equipos y reactivos, además de la publicación de hallazgos e informes que demandan recursos humanos. Aunado a esto, otro punto desfavorable contra reloj es la fluctuación extrema de factores abióticos que genera el cambio climático y a su vez, la modificación y deterioro de ecosistemas que concluye en la pérdida de especies antes de poder conocerlas y clasificarlas.

Existen ambientes contaminados donde se han aislado sorprendentes especies bacterianas adaptadas y capaces de alimentarse de desechos tóxicos, logrando identificar filogenéticamente y potencialmente su aplicación y capacidad. Por ello, la investigación de cada especie bacteriana debe centrarse en describirlas ampliando la información con base a su potencial observado.

El cepario bacteriano del LIAAp fue creado a partir de aislados de ambientes contaminados con hidrocarburos, sin embargo, estos no cuentan con alguna caracterización respecto al potencial de biodegradación, por ello es conveniente y necesario indagar si las bacterias pueden degradar alguno de los compuestos contaminantes del suelo, por ejemplo, los agroquímicos, y algunos monocíclicos perjudiciales como los BTEX.

1.3 Justificación

Los microorganismos desempeñan un papel primordial en su entorno, por ejemplo, la participación de estos en los ciclos biogeoquímicos permite que, mediante su metabolismo, contribuyan a la transformación de compuestos, con consecuencias importantes en el funcionamiento y mantenimiento de los ecosistemas.

En el Laboratorio de Investigación Ambiental Aplicada (LIAAp) del ITSM se han reunido y conservado diferentes cepas bacterianas, desglosando sus condiciones de cultivo y que, hasta el momento, se encuentran en espera de explorar sus actividades y capacidades microbianas en diferentes aplicaciones biotecnológicas.

Se recalca la importancia de que la colección de cepas (cepario) requiere de análisis concretos que resulten relevantes para el ambiente, como lo sería la degradación de plásticos, fijación del nitrógeno, control biológico o degradación de xenobiótico e hidrocarburos, dado que la microbiota bacteriana fue aislada de ambientes notoriamente contaminados, se intuye que las bacterias almacenadas proporcionarán resultados favorecedores para el medio ambiente en la recuperación de suelos contaminados, por ejemplo con ciertos hidrocarburos.

Es por ello que, dando continuidad al estudio de las bacterias de importancia ambiental se evaluó la capacidad de biodegradación que tienen estas bacterias frente a un grupo sencillo de monocíclicos aromáticos denominados BTEX para reconocer a las cepas bacterianas en la solución benéfica ante problemas ambiental.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Estudio de cepas bacterianas para la degradación de monocíclicos aromáticos BTEX.

1.4.2 Objetivos específicos

- Generación de la colección bacteriana.
- Adaptación *in vitro* de microbiota.
- Obtener co-cultivos definidos.
- Analizar la tolerancia y consumo a monocíclicos aromáticos.
- Elaborar la descripción de la colección de cepas bacterianas.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Complejo BTEX

2.1.1 ¿Qué son los BTEX?

Los BTEX son hidrocarburos aromáticos volátiles, que suelen estar presentes en derivados del petróleo, dichos son los elementos de la gasolina y el combustible diésel son más solubles en agua y sus siglas significan un grupo de 4 hidrocarburos monocíclicos que en el orden son: Benceno, Tolueno, Nitrobenceno y Xileno. Dichos compuestos son biodegradados por una extensa pluralidad de microorganismos, debido a que año tras año se han acondicionado a los ambientes del contaminante en el cual estén (Morlett, 2009).

Prácticamente los BTEX son un conjunto de especies químicas que realizan parte de los llamados compuestos orgánicos volátiles (COV's), los cuales, a menudo, se hallan presentes en ambientes conurbados y son parte de la lista de contaminantes peligrosos para el aire, de cierta manera el benceno y el tolueno son estimados compuestos con impacto carcinogénicos (Gallego, 2014).

Los BTEX tienen la posibilidad de interactuar en aguas naturales por medio de efluentes de aguas residuales provenientes de industrias de refinación de petróleo, aguas pluviales, escorrentía de carreteras, derrames accidentales y fugas de tanques de almacenamiento subterráneo, haciéndolos contaminantes usuales en una gigantesca proporción de acuíferos. En seguida, se describen dichos compuestos:

2.1.1.1 Benceno

El benceno es un hidrocarburo monoaromático cuyas propiedades se fundamentan en conceder la función de disolver y dispersar con facilidad gran proporción de compuestos (Bracconi et al., 2017).

Sin lugar a dudas tiene orbitales de enlaces planos y simétricos, o sea, versátil y de mucha trascendencia en la química. Es una molécula que tiene únicamente átomos de hidrógeno y átomos de carbono (Arteaga, 2017). La mayor parte de los compuestos que se conocían hasta el momento tenían una proporción muchísimo más alta de

átomos de hidrógeno, por lo general el doble. Cada ángulo encontrado de los enlaces mide 120° . La orbital de enlace es cilíndricamente simétrico cerca de la línea de alianza de los núcleos atómicos, por lo cual estas unidades se designan como enlaces (Tobares, 2003).

La fórmula del benceno más multitudinario es C_6H_6 o C_nH_{2n-6} , la cual, frecuente ser un compuesto insaturado, en los hidrocarburos, debido a que este tiene un índice de deficiencia de hidrógeno igual a 4, por igual, en varias maneras relevantes de representar el benceno se hallan, ejemplificando, la fórmula desarrollada-1, la composición de Kekulé-2 o el modelo de anillo-3, que son los más frecuentes (Fessenden et al., 1983).

En un inicio se vio que el Benceno poseía características bastante inusitadas y, al final comenzaron a reconocer que era un integrante de una totalmente nueva clase de compuestos orgánicos con características especiales e interesantes. Entre los compuestos BTEX, el benceno necesita atención particular ya que es el más tóxico y el más soluble (Aburto, 2009).

2.1.1.2 Tolueno

El tolueno por su composición C_7H_8 pertenece a los hidrocarburos aromáticos de propiedades, líquido, incoloro, móvil, de un olor característico fuerte y penetrante pero comúnmente agradable, podría ser distinguido desde concentraciones de 8 partes por millón (ppm) y el gusto en el agua desde 0.4 a 1 ppm, este compuesto se suministra al cuerpo principalmente por vía inhalatoria (Aldazábal et al., 2005), se origina de forma natural en el petróleo, y es poco soluble en agua, pero miscible en la mayoría de los disolventes orgánicos existentes, en ciertos aceites minerales y además en vegetales o animales. Actualmente el 50% de este hidrocarburo se produce en el extranjero así mismo distribuido a los distintos países (De Yuso Ariza, 2012).

Del mismo modo, el tolueno está presente en varios productos de uso de la casa e industrial en la fabricación de pinturas, barnices, adhesivos, en la imprenta y entre muchos más, además es uno de los primordiales solventes con riguroso uso. Subsecuentemente el tolueno se almacena en tejido adiposo en el que se retiene en elevados niveles de concentración (Ramírez, 2012).

2.1.1.3 Etilbenceno

El etilbenceno es un hidrocarburo aromático tiene un olor parecido a la gasolina y es soluble en disolventes orgánicos pero insoluble en agua es además un líquido fundamental debido a que es inflamable e incoloro el cual frecuenta reaccionar con oxidantes fuertes. Este solvente está en productos de uso industrial, la adquisición de este producto es legal, su venta en el mercado es a bajo costo y la inhalación de sus vapores no se estima un comportamiento de elevado peligro (Páez et al., 2003).

Cabe resaltar que hay escasos datos acerca de los efectos de dicho monocíclico sobre la salud de las personas. Si se habita en una metrópoli o alrededor de manufacturas o carreteras con gran viabilidad, se puede estar expuesto al compuesto anteriormente mencionado a partir del medio ambiente. Las emisiones de etilbenceno al aire ocurren al incinerar petróleo, combustible y carbón, y a partir de industrias que utilizan etilbenceno (Ramírez, 2012).

2.1.1.4 Xileno

El xileno también conocido como dimetilbenceno es un solvente aromático derivado del benceno, en el que los grupos metilo pueden encontrarse en posición orto, meta y para, sobre el anillo bencénico en conjunto etilbenceno y como impureza más común, tolueno. Los xilenos son sensibles disolventes y se usan como tales, encontrándose también en las tintas de los marcadores permanentes.

Por otra parte, este solvente es insoluble en agua, pero miscible en alcoholes, éteres y otros líquidos orgánicos. Además de que es aún más pesado que el compuesto tolueno, se encuentra en productos de lavado de coladores y maquinaria, proceso de la madera y otros, no está clasificado como cancerígeno, aunque sí como neurotóxico. Las indicaciones de peligro para cualquier isómero de dicho monocíclico, del mismo modo para la mezcla de ellos son: H226, H332, H312 Y H315 (Escolar, 2020).

2.1.2 Clasificación

Los hidrocarburos aromáticos son aquellos compuestos que tienen características relacionadas con el núcleo del benceno, en el que hay seis equipos de carbono- hidrógeno ligados a todos los vértices conformando un hexágono. Los representantes

de dichos compuestos son el Benceno, Tolueno, Etilbenceno y Xileno conocidos comúnmente como BTEX. En la categorización de los monocíclicos se hallan los aromáticos, son compuestos más frecuentes por lo cual son una clase particular de hidrocarburos insaturados. La composición que representan a dichos compuestos se fundamenta en la estructura del anillo del benceno ya que tiene seis átomos de carbono. Sin embargo, la mayor parte de los crudos y derivados del petróleo (excepto ciertos solventes hechos del petróleo) tienen dentro compuestos aromáticos.

Los BTEX, poseen una fundamental solubilidad en el agua, debido a que tienen la posibilidad de movilizarse en el ambiente, así como tienen la posibilidad de ser degradados por su forma más simple que poseen frente a todos los otros hidrocarburos (Altamirano, 2017). Según una investigación realizada por Leahy y Colwell (1990) citados por Morlett (2009) evalúan que la producción anual de petróleo o compuestos derivados del petróleo en todo el mundo oscila entre 1.7 y 8.8 mil millones de toneladas (Figura 1). El Xileno es el compuesto que más se obtiene, seguido por el Tolueno, Benceno y Etilbenceno según datos estadísticos.

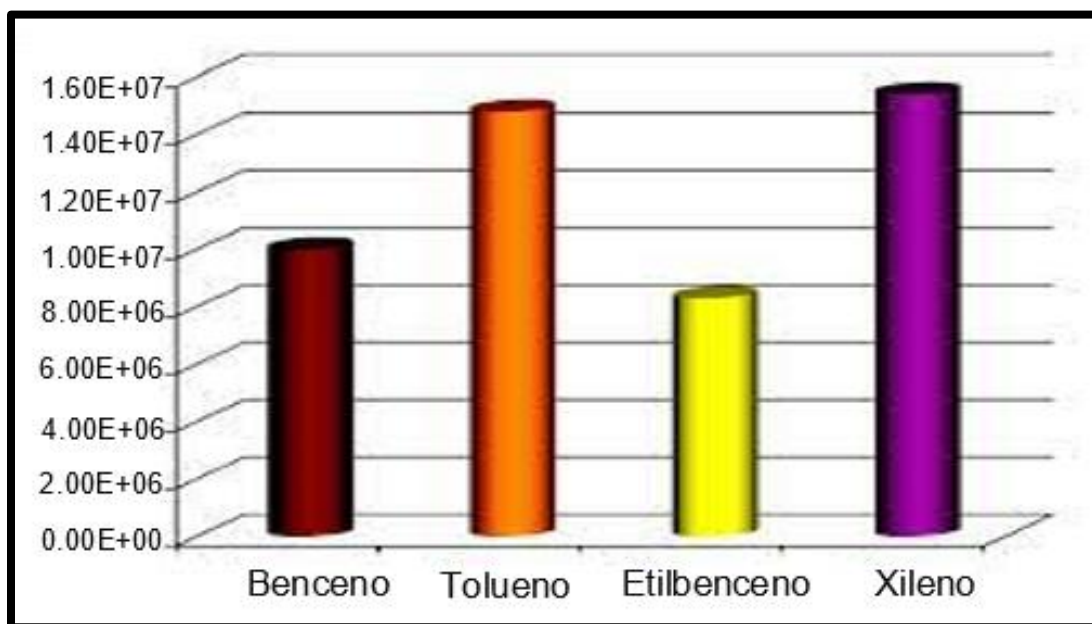


Figura 1. Producción anual de los BTEX a nivel mundial (Ton/año).

2.1.3 Propiedades generales

2.1.3.1 Propiedades físicas

Los hidrocarburos aromáticos tienen algunas propiedades asociadas con el núcleo o anillo suelen ser especiales, como en el benceno se encuentran seis grupos de carbono-

hidrógeno unidos a cada uno de los vértices de un hexágono, en el benceno los enlaces que unen estos seis grupos al anillo presentan características intermedias, respecto a su comportamiento, entre los enlaces simples y dobles.

Moreno Grau (2003) citados por Acevedo (2009) menciona que la composición típica de los hidrocarburos constituyentes de la gasolina, en volumen, es de 4-8% de alcanos, 2-5% de alquenos, 25-40% de isoalcanos, 3-7% de cicloalcanos, 1-4% cicloalquenos y 20-50% de compuestos aromáticos, de los que el 0.5 - 2.5% es Benceno.

A continuación, se presentan otras caracterizaciones físicas de los BTEX encontrados en diferente literatura (Tabla 1).

Tabla 1. Propiedades físicas de los BTEX.

Sustancia	Benceno	Tolueno	Etilbenceno	Xileno
Fórmula	C ₆ H ₆	C ₆ H ₅ CH ₃	C ₈ H ₁₀	C ₆ H ₄ (CH ₃)
Peso molecular	78.11	92.14	106,16 g/mol	106.17
Presión de vapor	101 hPa (20°C)	29 hPa (20°C)	9.5 hPa (20°C)	6.7 hPa (20°C)
Densidad relativa	(20/4) 0.878	(20/4) 0.866	(20/4) 0.8714	(20/4) 0.88
Temperatura de descomposición	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene
Viscosidad	No tiene	No tiene	0,68 mPa·s a 20°C	No tiene
Color	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro
Olor	Dulce	Dulce	Aromático	Suave
Solubilidad	Tienen una solubilidad en agua bastante escasa	Es inmisible en agua	A 15°C es ligeramente soluble en agua, es miscible con alcoholes y éteres	No es soluble en agua y flotará sobre agua más densa si se combina

Fuente: Acevedo (2009).

2.1.3.2 Propiedades químicas

Los hidrocarburos por sus propiedades químicas se dividen en dos categorías. Las cuales la primera se basa en compuestos orgánicos, cuya gama pertenece a la gasolina, por lo que, corresponden a algunos alcanos de cadena pequeña como lo son; (C₆-C₁₀), isopentano, 2,3-dimetilbutano, n-butano, n-pentano y compuestos aromáticos volátiles, tales como hidrocarburos monoaromáticos Benceno, Tolueno, Etilbenceno y Xileno; inclusive, los productos orgánicos de rango diésel incluyen alcanos de cadena más larga (C₁₀-C₄₀) y productos químicos hidrófobos tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos. Dependiendo del número de carbonos y su estructura química se determina su clasificación (Figura 2) Fuente: Njobuenwu (2005).

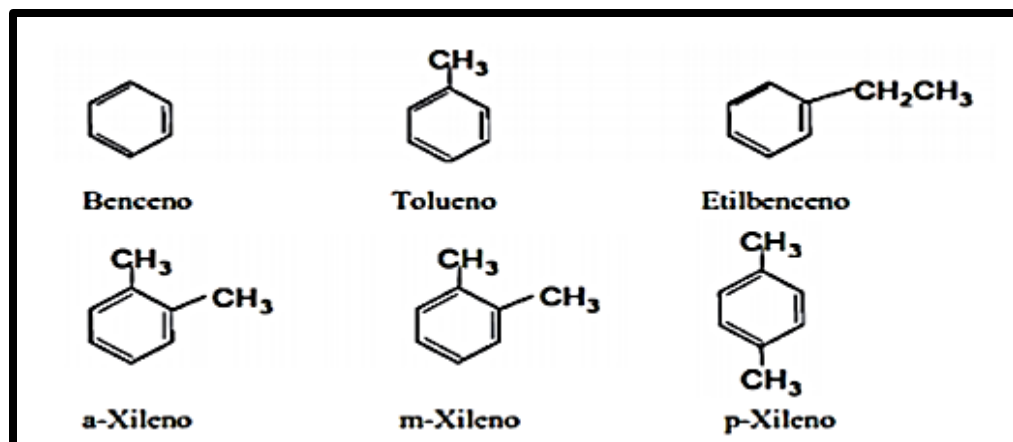


Figura 2. Compuestos orgánicos de gama gasolina BTEX.

Los hidrocarburos tienen cadenas cíclicas con uno o más anillos bencénicos, los cuales son los aromáticos. Estos al ser poco polares o no polares presentan la capacidad de no disolverse en agua. Los hidrocarburos se pueden constituir por el 50-80% de la composición total del petróleo; mientras que la gasolina está constituida aproximadamente por un 70% de compuestos alifáticos y 30% de hidrocarburos aromáticos (Olguín et al., 2007).

2.1.3.3 Propiedades tóxicas

El medio ambiente, los humanos y los recursos naturales padecen ciertos efectos tóxicos gracias a los hidrocarburos aromáticos. Una vez que el monocíclico se volatiliza los gases se comienzan a desprender y se absorben mediante la ingestión o al contaminar la cadena alimenticia; y por contacto dérmico. Principalmente su obtención se hace por medio de la sustracción líquido-líquido siendo un proceso en el que los gases que se desprenden tienen las posibilidades dañinas de afectar el sistema nervioso central de los animales, el hígado y los pulmones, así como varios organismos del cuerpo humano. Tienen la posibilidad de ocasionar efectos bastante graves en el sistema respiratorio y sobre la dermis. Ciertos estudios presentan inclusive, las consecuencias a largo plazo pueden aparecer afecciones reproductivas, aunque es necesario resaltar que ciertos BTEX no son bioacumulables en plantas o en animales impidiendo una afectación directa (Mellado, 2019).

Sin embargo, los efectos tóxicos son generados primordialmente por hidrocarburos que entran en contacto con el océano, esto significa que, gracias a las refinerías situadas en la costa y los derrames petroleros en el mar se generan extensa variedad de males

al ecosistema, depositándose en el fondo del océano cierta proporción de residuos y una mayoría en el área del mar contaminando la vida marina, entre los que está, fitoplancton, animales y plantas acuáticas (Cabrera, s.f.). Especialmente, el benceno causa toda clase de leucemias, mientras tanto que el tolueno, etilbenceno y los isómeros del xileno ocasionan severo mal al sistema nervioso central y varias otras patologías véase la Tabla 2 (Morlett, 2009).

Tabla 2. Propiedades tóxicas de los BTEX.

Compuesto		Daños a la salud
Benceno	1)	Favorece el desarrollo de todo tipo de leucemias. También puede causar leucemia aplásica y pancitopenia reversible
	2)	Otros metabolitos del benceno interfieren con los ácidos nucleicos.
Tolueno	1)	Las altas concentraciones pueden provocar coma narcótico.
	2)	Pueden ocasionar un cuadro hepatotóxico, además de glomerulonefritis autoinmune.
	3)	Es teratogénico.
Etilbenceno	1)	Causa intoxicación crónica.
	2)	Provoca irritación de vías superiores. Alteraciones hematológicas (leucopenia y linfocitosis), trastornos hepáticos y de las vías biliares
Xileno	1)	Induce daños en los órganos hematopoyéticos y en el sistema nervioso central.
	2)	Se asocia a defectos neurológicos, alteraciones en la síntesis de proteínas y deterioro de la actividad inmunogénica.

* La intoxicación aguda por estos compuestos produce cefalea, náuseas, mareo, desorientación, confusión e inquietud.

Fuente: Morlett (2009).

2.1.4 Repercusiones negativas

De acuerdo con estudios realizados al paso del tiempo por la exposición al aire contaminado con hidrocarburos aromáticos se presenta un mayor el riesgo de causar enfermedades respiratorias, por la exposición de contaminantes de la gama aromáticos. De acuerdo a estudios realizados se demuestra que las poblaciones cuyas viviendas están ubicadas en las afueras de las fuentes de emisión por contaminantes en el aire presentan altas tasas de casos de asma y enfermedades relacionadas.

Esto quiere decir que, en cuanto a los resultados presentan gran problemática en las soluciones de mejora para los casos causados, es posible analizar el régimen y generar estudios que permitan abordar problemas tan complejos como se requieran, así como, el diseño de recomendaciones para el manejo de riesgos en la salud, así como el incremento de nuevas biotécnicas amigables con el medio ambiente.

La Ley de Aire Limpio requiere que la EPA regule los contaminantes tóxicos del aire de las categorías de instalaciones industriales de los cuales también se encuentran los

BTEX. Al mismo tiempo se realizan actividades susceptibles en la contaminación con monocíclicos por exposición ambiental y ocupacional a mezclas de hidrocarburos que se emiten en estaciones de servicio expendedoras de gasolina (Zárate et al., 2015).

La refinación del petróleo tiene una mayor complejidad técnica, ya que del material llamado comúnmente “crudo” se obtienen muchos tipos de combustibles, desde el querosén hasta los distintos tipos de naftas, diésel, el *fuel oil* y otros derivados que de alguna manera contaminan el medio ambiente (Sosa, 2014). Dado que son múltiples los impactos negativos que producen los hidrocarburos aromáticos, la experiencia internacional da indicios de que los posibles daños, sean inesperados con la extracción de gases causa diversos tipos de contaminación, más que favorecer a la población traerán consigo serios problemas socio ambientales (García-Cruz, 2014).

Dentro de los accidentes e incidentes provocados por los hidrocarburos aromáticos BTEX se definen las causas que provocan ciertas anomalías al medio ambiente, se pone de manifiesto que todos los casos de contaminaciones de acuíferos superficiales o profundos científicamente documentados han ocurrido bien por fallos en la cementación/revestimiento de pozos, bien por fugas en superficie asociadas a fallos en las balsas de contención, tratamiento deficiente de las aguas de retorno o fugas directas de los pozos. Ello permite concluir que la existencia de un marco normativo, así como una actividad de vigilancia son elementos fundamentales para la recuperación del medio ambiente (Bezoz, s.f.).

2.1.5 Riesgos a la salud

La absorción de los hidrocarburos aromáticos tiene lugar por inhalación o ingestión y también por vía cutánea, los derivados monoalquilados del benceno son mucho más tóxicos, es decir pueden causar efectos agudos y crónicos en el sistema nervioso, existen más variedades de enfermedades causadas por estos hidrocarburos que de cierta forma viene afectando tanto a las personas como al medio ambiente. La contaminación del aire y sus efectos en la salud pública determina una inquietud sobre el tema principal de preocupación a nivel global, singularmente en las ciudades (Stellman et al., 2001).

En el estudio de Acevedo (2009) citado anteriormente, con el transcurrir del tiempo ha aumentado el riesgo cancerígeno el cual ha sido obtenido mediante la aplicación del proceso de investigación propuesta por la U.S. De igual manera la EPA revela que existen riesgos cancerígenos individuales mayores a los admisibles en todas las

estaciones de servicio. También se refiere a que el riesgo es de 4 a 15 veces superior al admisible, por lo que los productos del petróleo repercuten moderadamente en la exposición de la salud de las personas que trabajan con este recurso.

De entre los cuatro componentes de los hidrocarburos aromáticos (BTEX) el tolueno causa algunos daños a la salud del ser humano los cuales son: irritación ocular, cansancio, confusión, debilidad, pérdida de la memoria, y otros más, así mismo el benceno provoca, somnolencia, mareo, taquicardia, dolores de cabeza, vómitos y acidez e irritación estomacal, entre los más riesgosos este puede causar disminución del número de glóbulos rojos en sangre, por último los BTEX, especialmente el benceno, son agentes no polares de carácter lipofílico con diversos efectos nocivos para la salud humana en especial el benceno, es uno de los componentes de la gasolina que tiene baja tasa de excreción, efectos cancerígenos, mutagénicos y se les ha identificado también como disruptor endócrino (Antonio et al., s.f.)

2.2 Remoción de complejo BTEX

2.2.1 Biorremediación

Silvana (2014) señala que en base a distintas investigaciones relacionadas con microorganismos demuestra que tienen capacidades únicas aportando gran avance a la tecnología esto mediante la utilización del potencial metabólico generado por sí mismos acelerando la biodegradación de forma natural de un contaminante bajo condiciones óptimas de parámetros críticos, a esta técnica eficaz se le ha denominado biorremediación y es usualmente utilizada por organismos vivos que viven en el suelo y agua como lo son: las algas, hongos y bacterias para absorber, degradar o transformar contaminantes orgánicos e inorgánicos y retirarlos, inactivarlos o mitigar su efecto en suelo, agua y aire.

Se puede llevar a cabo mediante dos métodos: bioaumentación y bioestimulación, siendo las más comúnmente utilizadas. La bioestimulación con fertilizantes orgánicos e inorgánicos aporta nutrientes adicionales aumentando la población microbiana indígena para acelerar el proceso degradativo de los contaminantes.

Las técnicas biotecnológicas son de tipo aerobio y se producen en condiciones aerobias esto quiere decir en presencia de oxígeno, o bien de tipo anaerobio en condiciones sin oxigenación (Arroyo et al., 2004).

Para que el proceso de biorremediación se lleve a cabo es necesario que el ambiente en el que se encuentre cuente con ciertas condiciones, se debe considerar una temperatura adecuada, agua suficiente y debe existir cierta cantidad de nutrientes y según sea el caso oxígeno, de esta manera se considera una tecnología aplicable para eliminar un contaminante específico.

Desde la existencia de los microorganismos son utilizados por su potencial enzimático para mineralizar los compuestos contaminantes o degradarlos como es el caso de los hidrocarburos hasta productos intermedios, en un ambiente aerobio o anaerobio, desde el punto de la importancia de la biorremediación (González-Rojas, 2011).

Las bacterias presentes en el suelo contaminado tienen la capacidad de transformar los compuestos orgánicos hasta convertirlos en dióxido de carbono, agua y fuentes de alimento para su propio crecimiento y reproducción, es decir, el proceso de biorremediación ocurre naturalmente. Se tiene en cuenta que los microorganismos tienen la capacidad de adaptarse rápidamente a cualquier ambiente y eventualmente degradar cualquier compuesto orgánico natural sin la intervención del hombre o agente químicos, sin embargo, esta situación de adaptación requiere la presencia de condiciones ambientales tales como el pH, oxígeno y la temperatura, concentraciones de contaminante no tóxicas para los microorganismos y adecuadas condiciones de humedad y conductividad del medio, entre las más importantes.

Sin embargo, la ausencia de algunos de los parámetros mencionados puede causar o limitar totalmente la actividad biológica y es cuando la mano del hombre juega un papel fundamental en la intervención del proceso optimizando y mejorando las condiciones para aumentar la población bacteriana también llamado bioaumentación y/o manipulando genéticamente las bacterias para la degradación específica de algunos compuestos químicos (Suarez, 2013).

Arroyo et al., (2004) indica que la concentración y composición de los microorganismos y la tasa de transformación de contaminantes está compuesta por distintos factores:

Los nutrientes juegan un papel importante en el proceso de biorremediación principalmente el nitrógeno y el fósforo, seguidos del hierro y calcio, se añaden al sistema a través de galerías filtrantes o pozos de extracción y en algunos casos en forma de fertilizantes, en general el suelo retiene la mayoría de los nutrientes necesarios, sin embargo, si estos no se encuentran en cantidades normales se puede adicionar mayor cantidad al medio.

Los microorganismos utilizan principalmente fósforo y nitrógeno como nutrientes principales la gran parte presentes en el suelo en concentraciones suficientes, de lo contrario se suministra la cantidad faltante al sistema, en el rango del carbono, nitrógeno y fósforo (C:N:P) depende mayormente por el tratamiento a emplear siendo en la mayoría de los casos 100:10:1 de acuerdo a experimentos realizados.

El rango de pH del suelo oscila entre 6.5 a 7.5 afecta elocuentemente en la actividad microbiana llevándose a cabo un crecimiento bacteriano favorable para el sistema, es por ello que el pH también afecta directamente en la solubilidad del fósforo y en el transporte de metales pesados en el suelo.

A medida que la temperatura aumenta, las reacciones químicas y enzimáticas crecen también, es necesario tener una temperatura equivalente a 15 y 45°C para que las especies bacteriana realicen su trabajo, es importante indicar que para cada microorganismo existe una temperatura mínima por debajo de la cual no existe crecimiento, temperatura óptima por la cual el crecimiento del microorganismo es más rápido y una máxima arriba de la cual ya no existe crecimiento.

Para un crecimiento adecuado los microorganismos requieren condiciones mínimas de humedad es por ellos que el agua es parte de protoplasma bacteriano del sistema y sirve como medio base para el transporte de los compuestos orgánicos y nutrientes al interior de las células, con una mínima o en su caso un exceso de humedad inhabilitaría el crecimiento de microorganismos al reducir las posibilidades de oxígeno en el suelo.

La estructura química según sea el hidrocarburo variará debido a su carga atómica y baja solubilidad en el agua siendo parámetros que afectan la halogenación, la existencia de ramificaciones de un hidrocarburo va a depender en gran medida de su estructura molecular.

Las bacterias son una diversidad de microorganismos capaces de adaptarse a un contaminante y/o degradarlo siendo así las más aptas para su uso en la biorremediación entre ellas se encuentran:

La bacteria *Deinococcus radiodurans* es utilizada para la eliminación de elementos radiactivos que se encuentran presentes en el suelo y aguas subterráneas. Es considerado un microorganismo es un extremófilo que resiste a condiciones extremas de radiación, sequedad, agentes oxidantes y diversos compuestos mutagénicos.

Las cianobacterias que son organismos microscópicos tienen la capacidad de desarrollarse en ambientes con escasas concentraciones de dióxido de carbono además de degradar diferentes hidrocarburos o pesticidas (Reyes-Reyes et al., 2018). Por otro lado, las cianobacterias son empleadas como indicadores de contaminación orgánica y tienen la capacidad de generar oxígeno y su propio alimento (Peinador, 1999).

2.2.2 Biodegradación

La biodegradación es una tecnología que se da naturalmente, es la disolución química de los materiales por bacterias u otros métodos biológicos, es muy importante debido a que, ya que sus avances metodológicos en la biodegradación microbiana han reconocido minuciosas investigaciones de alto rendimiento al conocer algunos organismos necesarios para aportar vías claves de biodegradación. Es decir, los compuestos orgánicos son difíciles de degradar debido a su ambiente por lo que la biodegradación de otros tipos de compuestos si se puede realizar.

Dicha biotecnología, capaz de eliminar algunos contaminantes es el principal mecanismo de degradación, es limitada y muy comúnmente aplicada. La degradación de los hidrocarburos y en su caso de monocíclicos aromáticos son generalmente los procedentes del petróleo por las poblaciones de microorganismo nativos representan uno de los importantes componentes por el cual el hidrocarburo y sus derivados pueden disminuir considerablemente su presencia en el medio ambiente (Cardona, 2003).

Al igual que la biorremediación, la biodegradación depende de las condiciones del hábitat, del contaminante y de los microorganismos presentes, es por ello la importancia en cada uno de los factores la hora de aplicarlos en la metodología, además dicha biotecnología se diferencia por su estructura química estable, gran tamaño molecular y alto número de cloros, también dada su baja solubilidad en el agua y fuerte absorción al suelo (Acuña et al., 2010).

Si bien los microorganismos capaces de biodegradar los compuestos de BTEX generalmente están presentes en diferentes sitios, principalmente en lugares donde se derraman hidrocarburos, existe la necesidad de saber si las condiciones son favorables para que ocurra la biodegradación. Por otra parte, es importante mencionar que la biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo puede verse afectada por las condiciones ambientales, tanto plantas como seres vivos, que se presenten en el sitio contaminado, por este motivo es importante controlarlas para que la actividad de los microorganismos degradadores sea eficiente y se puedan aplicar. Los factores que más

intervienen dentro de la biodegradación son: temperatura, pH, humedad, aceptores de electrones y nutrientes (Vallejo et al., 2005).

Halden y colaboradores (1999) atribuyen que los hidrocarburos son considerados una gama de compuestos tóxicos de considerable importancia ambiental, demostrando la eficiencia de los microorganismos del género *Pseudomonas* en degradación de ácido 3-fenoxibenzoico en suelos. En el experimento los resultados presentaron un papel degradativo, ambas *Pseudomonas* fueron manipuladas genéticamente. Una vez más se demostró que las bacterias fueron eficientes en distintas pruebas; sin embargo, las bacterias modificadas genéticamente presentaron una eficiencia favorable para sobrevivir a factores ambientales adversos esto quiere decir que son cada vez más efectivas.

De igual manera, los hongos juegan un papel muy importante como degradadores ya que han sido evaluados para la degradación de hidrocarburos y los resultados fueron positivos para la degradación de distintos compuestos. Como ejemplo de estos hongos Prenafeta-Boldú et al.,(2002) estudiaron el papel que desempeñan algunos hongos de modo que se enfocaron en el hongo *Cladophialophora* sp. En algunos componentes como lo son; Benceno, Tolueno, Etilbenceno y Xileno. El hongo no fue capaz de degradar el benceno, pero degradó los hidrocarburos aromáticos, Tolueno, Etilbenceno y Xileno.

Y finalmente, otro caso importante evaluado por Abed et al., (2002) fue el papel que realizaron algunos géneros *Phormidium* y *Oscillatoria* en el que evaluaron su potencial de degradación de hidrocarburos. mediante un proceso realizado e investigación de estos géneros, los resultados arrojados señalaron que en 7 días se había degradado el *n*-octadecano en un 25 y 34%, lo cual indica un avance muy significativo respectivamente de cada género. Los valores obtenidos señalan el potencial de estas cianobacterias para el mejoramiento de futuras técnicas biodegradativas en suelos presentes por hidrocarburos (Torres, 2003).

2.3 Caracterización de bacterias con potencial de degradación de BTEX

2.3.1 Tinción de Gram

Las bacterias pueden clasificarse según su respuesta en Gram positivas o Gram negativas, está basada en diferencias fundamentales de la envoltura celular, concretamente en las características de la pared celular y contenido de peptidoglicano

lo que le confiere propiedades determinantes a cada microorganismo (Pirez y Mota, 2008).

La clasificación por tinción de Gram es considerada diferencial al poder visualizar más de un color. Las Gram positivas se tiñen de color azul-violeta y las Gram negativas se tiñen rosado o rojo (López-Jácome et al., 2014). Este método requiere de la fijación de las muestras para preservar la arquitectura estructural y química de las células y se emplean únicamente dos colorantes, los tiempos de contacto de estos, se muestran en la siguiente tabla 3.

Tabla 3. Tinción de Gram, tiempos y características

Solución	Tiempo de aplicación	Bacterias Gram positivas	Bacterias Gram negativas
Colorante: cristal violeta	30 s	violeta	Violeta
Mordiente: lugol	1 min	violeta	Violeta
Decolorante: alcohol acetona	10-15 min	violeta	Incolora
Colorante de contraste: safranina	1 min	violeta	Rosada

Aunado a esto, la técnica permite saber de manera rápida las características de la muestra y hacer una diferencia de los potenciales microorganismos causantes de una infección, por ejemplo, ha sido una técnica sencilla de diferenciación bacteriana que se emplea con resultados óptimos en la rápida detección de la neumonía en situación de Urgencias (Ferré et al., 2011).

2.3.2 Producción de energía

A lo largo de los últimos años emergen disciplinas de la microbiología ambiental aplicada, esta se fundamenta en diferentes indagaciones que se han realizado por medio de arduo trabajo en el desarrollo de la microbiología molecular, con el lapso del tiempo se buscó decidir la funcionalidad metabólica de la mayoría de los conjuntos de bacterias que hay hasta entonces, desde aquel entendimiento, crear novedosas aplicaciones en la vida humana.

Es por esto, que este desarrollo vertiginoso de la ciencia y el desarrollo tecnológico nos ha permitido usar microorganismos en funcionalidad de la descontaminación del agua y

suelo. El aprovechamiento del metabolismo de los microorganismos ha posibilitado la obra de reactores biológicos a mucho menor precio que los fisicoquímicos, y además ha posibilitado la obra de plantas de procedimiento de sistema mixto, para una mayor eficiencia (Fontúrbel et al., 2004).

Las cianobacterias son microorganismos bastante relevantes que son capaces de realizar la fotosíntesis oxigénica. En la actualidad, son consideradas una fuente posible para la producción de biocombustibles o compuestos farmacéuticos entre otros, resultan muy relevantes como productores de energía y eficientes para la biodegradación (Fasce, 2016).

Las bacterias cumplen una función importante en el medio ambiente, su trabajo consiste en biodegradar contaminantes adaptándose al mismo y convirtiéndolos en energía lo cual es una actividad importante para los avances tecnológicos que a gran medida han buscado favorecer al medio ambiente, convirtiendo fuentes de energía gracias a las bacterias.

Un caso de ello, es comprobado por medio del análisis de la bacteria del género *Geobacter* sp por medio de la función de transferir electrones a moléculas y de determinada forma aprovecharlos, del mismo modo óxidos de nitrógeno, sustancias de elevado peso molecular formadas por la degradación química y biológica de otros desperdicios.

Este microorganismo posibilita la transferencia de electrones en forma directa a los electrodos, conformando pequeñas corrientes eléctricas, de igual manera posibilita a la especie *Geobacter* sp presentar un fundamental papel en el periodo natural de la materia orgánica y de los metales en el subsuelo y mantos acuíferos. La bacteria previamente mencionada posibilita la transferencia de electrones hacia los electrodos permitiendo la generación de electricidad misma que se recibe con materia orgánica, la utilización de electrodos como donador de electrones ayuda a la reducción de contaminantes tales como: disolventes clorados, uranio y nitrato.

En el año 2002 Esteve Núñez confirmó que se podía conseguir energía eléctrica por medio de la utilización de la bacteria *Geobacter* sp realizando un fácil contacto con uno de los ánodos, sin necesidad de recurrir a mediadores químicos o la participación de las personas. Para entonces el género bacteriano que habita comúnmente en el suelo y agua presentaba la función de respirar piedras en vez de compuestos solubles, lo cual quiere decir que usa óxidos de hierro de la tierra con aceptadores de los electrones para oxidar la materia orgánica convirtiéndola en fuente de energía (Álvarez, s.f.).

2.4 Diversidad metabólica

2.4.1 Fotoautótrofas

Los organismos fotoautótrofos poseen la función de conformar fotones de la luz del sol por medio de una fuente de energía dichos fotones tienen la posibilidad de fijar carbono inorgánico a modo de carbono orgánico y es así como se llaman fotoautótrofos.

La fotosíntesis es llamada un proceso fundamental y exclusivo proceso de conversión de la energía lumínica, implica la fabricación de nutrientes orgánicos paralelamente transforma la luz debido a la materia orgánica por medio de los organismos fotoautótrofos (Apella y Araujo, 2005).

Andersen (2005) citado por Cueto (2008), menciona que la utilización de organismos fotosintéticos para obtener productos de interés no es algo novedoso, en el último siglo se han cultivado diferentes organismos fotoautótrofos, con el fin de obtener metabolitos de interés, entre ellos tenemos la posibilidad de nombrar a *Spirulina* sp., *Dunaliella salina*, *Chlorella* sp. *Haematococcus* sp., entre otros. Siendo algas y cianobacterias las más usadas en este proceso y que cumplen con los requerimientos necesarios para hacer este proceso.

2.4.2 Litótrofas y Organotrofas

Para fines de aprovechamiento de energía las bacterias pueden dividirse en microorganismos litótrofos que se caracterizan por su capacidad de requerir solo de compuestos inorgánicos sencillos como lo es el SH_2 , SO , NH_3 , Fe , etc. Es decir, que las bacterias requieren de cierta variedad de fuentes orgánicas cuyas alternativas sean obtener energía.

Así mismo, las bacterias organotrofas se caracterizan por requerir únicamente de compuestos orgánicos los cuales pueden ser hidratos de carbono, proteínas, petróleo, lípidos y alcoholes (Frioni, 1999).

2.4.3 Heterótrofos

En su mayoría los heterótrofos provienen de los procariontes los cuales producen su propio alimento por ende significa que a partir de compuestos orgánicos obtienen los átomos de carbono que los hace diferentes a los demás (Pullés, 2014). Teniendo en cuenta que algunos heterótrofos llamados también fotoheterótrofos pueden obtener energía de la luz solar al igual que las fotoautótrofas.

No obstante, por mucho el grupo más grande de procariontes es similar, respecto a sus patrones de alimentación, a los animales de modo que ambos obtienen energía y carbono a partir de moléculas orgánicas, dichos organismos poseen una gran capacidad de adaptación y tolerancia en condiciones adversas, en otras palabras, se ha comprobado que la mayor parte de bacterias heterótrofas son los indicadores más confiables del tratamiento de descontaminación.

2.4.4 Protótrofas

Tienen la capacidad de desarrollarse en medios carentes de aminoácidos. Un compuesto que es capaz de inhibir el efecto de los mutágenos, es decir, que no permite que se revierta la mutación en la bacteria es un antimutágeno. Se encuentran específicamente en cepas de bacterias, algas y hongos (Kappelle, 2008).

En su mayoría las cepas presentan la capacidad de crecer en medios mínimos, las cuales pueden ser sintetizadas fácilmente, sin embargo, son microorganismos que no ocupan otros elementos nutritivos distintos a los del tipo silvestre del cual se derivan. Por ende, su clasificación se basa en los factores de crecimiento y de algunos otros factores.

2.4.5 Autótrofas

Se definen como microorganismos autótrofos a aquellas bacterias que se caracterizan por su capacidad de acumular energía química, esto mediante las moléculas de carbohidratos que construyen por sí mismos, estos finalmente son aprovechados por otros mecanismos. En definitiva, es capaz de producir su propio alimento sintetizando sus propios nutrientes. Considerando que a la mayoría de los autótrofos transforman la luz solar para producir alimento, de ahí que a este proceso que realizan se le conoce como fotosíntesis y solo tres grupos son capaces de esta transformación de energía entre las que se encuentran las plantas, algas y algunas bacterias (Henaó-Castro et al., 2015).

2.5 Aerobios, anaerobios y fermentadores

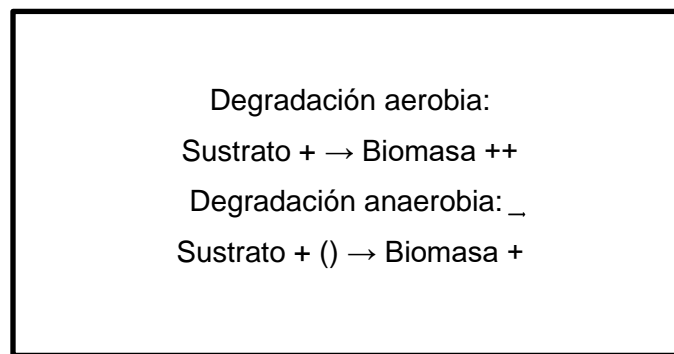
Los microorganismos conocidos comúnmente como anaerobios tienen un amplio conjunto de géneros y especies tales como; cocos, bacilos grampositivos y gramnegativos, su crecimiento se da únicamente en ausencia de oxígeno (anaerobio) basándose en los cultivos de medios enriquecidos. En su mayoría ellas tienen gran relevancia en los procesos patológicos orales (Pastor et al, s.f.).

Los organismos no solo requieren de condiciones óptimas anaerobias para multiplicarse,

sino que el oxígeno sea apto para ellos, de igual manera para los procesos aerobios toman un papel muy importante en el que la degradación de contaminantes puede llevarse también por hongos que contengan dioxigenasas utilizando el oxígeno para la activación y ruptura del anillo aromático.

El oxígeno es un parámetro muy importante ya que sirve también como aceptor final de electrones para la oxidación completa de estos compuestos. Sin embargo, la disminución del oxígeno disuelto de los sitios contaminados limita la biodegradación de los BTEX.

Los estudios por la vía aerobia para el catabolismo de los compuestos aromáticos han demostrado que estas enzimas (monooxigenasas y dioxigenasas), llevan a cabo el primer paso que es la activación para la conversión de los compuestos aromáticos (Figura 3).



Fuente: Maroto and Rogel, (2009) citado por Bermúdez (2012)

Schink, 1997 y Fries y Cols., (1994) citados por Morlett (2009) indican que la biodegradación anaerobia es efectivo proceso biológico que ha dado un gran avance a la tecnología empleando microorganismos vivos, así como también es de gran importancia para el tratamiento de diferentes residuos orgánicos e hidrocarburos aromáticos contaminantes en suelo y agua, también para la producción de energía en forma de biogás CH_4 (Karakashev y cols., 2005).

García-Cruz et al., (2014) refiere que, de acuerdo a diversas investigaciones se comprueba a los monocíclicos como un contaminante principal en el suelo y que de alguna manera son degradados y se ha observado que se degradan por diferentes rutas metabólicas, dependiendo de la estructura molecular del compuesto. De los cuatro compuestos aromáticos el tolueno es el de mayor consumo bajo condiciones aerobias dependiendo de las bacterias empleadas en el sistema.

Los microorganismos aerobios facultativos realizan la fermentación mediante la producción de energía, bloqueando la presencia de oxígeno asegurando que el suministro de energía se produzca por respiración (Varela, 2006).

2.6 Cinéticas de degradación

Los diferentes estudios que se llevan a cabo actualmente con BTEX han producido en gran medida resultados de degradación simultánea, por lo que los diferentes trabajos aún no se han completado. Se consideran importantes los siguientes descubrimientos y trabajos realizados. Estos descubrimientos y trabajos se centran en los organismos que se están estudiando. Según los científicos estos descubrimientos y trabajos contribuyen mucho a la ciencia.

La figura 4 muestra el efecto de la concentración de NaCl sobre la degradación del tolueno, se puede observar que la tasa más alta de 950 mg de proteína⁻¹ h⁻¹ tiene a una salinidad de 50 gr de NaCl L⁻¹. Esto lo clasifica como un consorcio moderadamente halófilo. Se evaluó la influencia de la salinidad en el coeficiente de partición del tolueno, para valores de salinidad entre 0-200 g NaCl l⁻¹ se obtuvieron valores entre 0.2 y 1.25. Esto indica que, para la mayor salinidad probada, el tolueno presente en la fase líquida es 6 veces menor que el tolueno en el experimento sin NaCl (Morales et al., S. f).

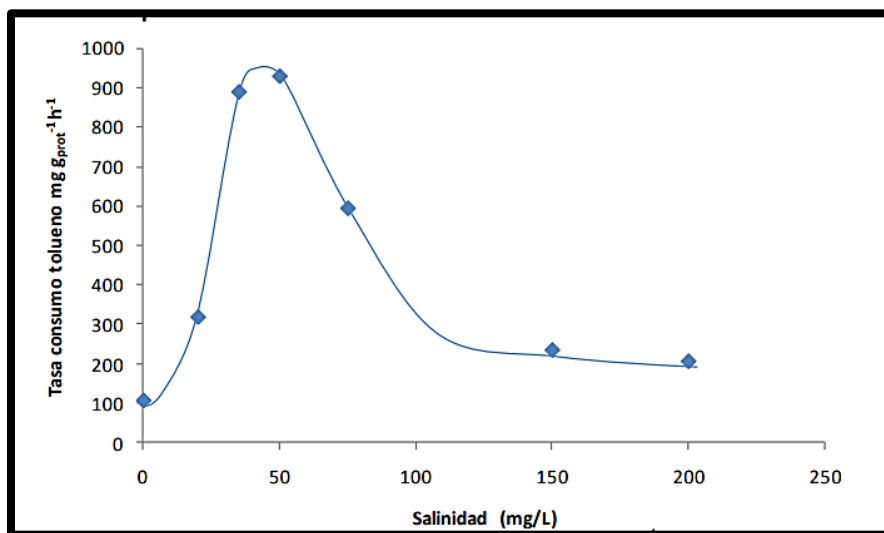


Figura 4. Efecto de la salinidad sobre la tasa de degradación de tolueno.
Fuente: Morales et al., (s.f.).

2.7 Aislados bacterianos

Existen varios estudios que aíslan distintos géneros de bacterias, todas pueden degradar diferentes tipos de hidrocarburos. Otras búsquedas muestran resultados positivos y beneficiosos para el medio ambiente. Aunque solo se puede cultivar una pequeña parte de

la comunidad microbiana, el aislamiento y la identificación de bacterias es importante para comprender el papel de estos microorganismos en el metabolismo de los hidrocarburos del petróleo (Segura et al., 2016).

A continuación, se describen los siguientes ejemplos de aislados bacterianos:

Mediante la investigación realizada por Araujo et al. (2006), informa que en el suelo contaminado con hidrocarburo del campo petrolero Moga en el estado Zulia, Venezuela, se estudió el uso de cepas bacterianas nativas y la aplicación de lodos estabilizados en la recuperación de suelos afectados por los hidrocarburos. Comprueba la capacidad (viabilidad) de las cepas bacterianas aisladas del suelo para degradar el combustible diésel. Las cuatro cepas más efectivas integraron el cultivo mixto en el estudio de procesabilidad, en el que se utilizó el lodo estable del sistema de lagunas como esponja y se aplicó tecnología de compostaje durante 150 días en suelos contaminados con aceite, nitrógeno y fósforo como fertilizante.

Otro proyecto señala, cómo es posible estudiar y caracterizar cepas bacterianas, en este trabajo se evaluaron tres bacterias capaces de alimentarse de hidrocarburo, se evaluó si las cepas son capaces de biodegradar hidrocarburos en presencia o ausencia de nitrógeno. Las muestras fueron aisladas de un suelo de la Patagonia con una extensa historia de contaminación por combustibles y sus derivados.

Se encontraron tres bacterias que pueden crecer en bajas concentraciones de nitrógeno y notables concentraciones de combustible. Dichas cepas fueron identificadas por ARNr 16S los microorganismos pertenecen a los géneros *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. y *Gordonia* sp. Además, se cuantificó y caracterizaron los ácidos grasos de la membrana. Principalmente se investigó la adaptabilidad para degradar hidrocarburos alifáticos, aromáticos, poliaromáticos y cíclicos en dos variables, presencia y ausencia de nitrógeno.

En ambos escenarios, las cepas fueron capaces de eliminar casi en su totalidad los hidrocarburos testeados. Se comprobó que estos géneros bacterianos aislados, tuvieron una buena adaptación a los cambios de pH, temperatura y concentración de NaCl, y es por ello que pueden tolerar y adaptarse a los contaminantes que están presentes en el suelo patagónico (Acuña, 2010).

En una colaboración de la Universidad de Santiago de Cuba con la Universidad de Barcelona Silva y colaboradores (2008), aislaron cepas bacterianas del sistema de tratamientos de residuos de la refinería del petróleo "Hermanos Díaz" en Santiago Cuba mediante el método de enriquecimiento secuencial, la fuente de carbono empleada fue petróleo Mesa 30/Puerto Escondido. El resultado fue el aislamiento de nueve cepas

bacterianas, cinco de ellas son Gram negativas (AT14 - AT18) y el resto positivas. El secuenciamiento del gen 16S ribosomal de las cepas Gram negativas indica que son de la especie *Pseudomonas aeruginosa*. Ensayos de biodegradación de petróleo a una concentración de 0.2 v/v demostraron que la cepa AT18 es capaz de eliminar el 50% del petróleo en los primeros 5 días. Se confirma la posibilidad de encontrar candidatos idóneos o promisorios en la degradación de hidrocarburos, a pesar de la toxicidad de estos compuestos, en diversos ambientes saturados de contaminantes.

En el Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras en el Caribe, Colombia, se encuentra el Cepario de Bacterias Marinas, las cuales fueron aisladas de estaciones que por años estuvieron impactadas con hidrocarburos. Para saber si estas cepas eran capaces de tolerar crudo y aceite combustible para motor (ACPM) se analizaron con estos contaminantes a concentraciones de 1% v/v. Para elegir bacterias capaces de degradar Hidrocarburos competitivamente, se sembraron masivamente en medios suplementados con petróleo crudo y ACPM durante 7 días, aquellas que lograron crecer a estas concentraciones fueron reunidas en un cultivo mixto (consorcio) se identificaron correspondientes a los géneros *Klebsiella*, *Chromobacterium*, *Flavimonas*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Bacillus*, Posteriormente se enfrentaron a una concentración del 2% v/v ACPM. Después de 21 días de incubación, se determinó que las cepas fueron capaces de degradar el 68.6% del total de alifáticos. Las bacterias del cepario analizadas, tienen interesantes capacidades metabólicas para tolerar, asimilar y degradar altas concentraciones de hidrocarburo. Este resultado indica lo loable que resulta indagar las capacidades de los microorganismos cuando estos han sido aislados de ambientes contaminados (Marín et al., 2004, citado por Narváez-Flórez et al., 2008).

En un estudio realizado en el Centro de Investigaciones del Petróleo, La Habana, Cuba se aislaron posibles cepas degradadoras de hidrocarburos en presencia del contaminante conocido como crudo Mesa 30, las cepas se analizaron evaluando al contaminante como única fuente de carbono, tres de ellas indicaron degradación en los primeros siete días del experimento. Los microorganismos se identificaron en los géneros *Bacillus* y *Alcaligenes*, una de las cepas (F10S1) removi6 el 69.26% a los 45 días de cultivo estático. Además, las cepas F9S y F1FLC biodegradaron el 50%, esto quiere decir que las cepas aisladas tienen potencial de remoci6n de contaminantes presentes en las costas marinas, al menos del 50% (Barrios et al., 2012).

La Universidad Nacional de la Patagonia de San Juan Bosco, concretamente recolectó muestras en tres diferentes sitios del litoral de Caleta Córdova, en uno de los sitios se ubicaba una monoboya de carga de petróleo. Para conocer la mineralización de hidrocarburos se emplearon como fuente de carbono gasoil, petróleo, kerosene, aceite lubricante al 0,1 % y nafta al 0,05% y fue determinada mediante la producción de CO₂. La mineralización de los hidrocarburos ensayados se realizó principalmente en los primeros 14 días. En este estudio, se aislaron más de 200 microorganismos bacterianos de los cuales se concluyó que el género bacteriano con mayor frecuencia fue *Pseudoalteromonas*. La presencia de microorganismos es un factor de suma importancia para la recuperación de ambientes contaminados, en este estudio se confirma que bacterias aisladas fueron capaces de metabolizar el hidrocarburo y quizás con un manejo especial, poder biorremediar el lugar (Pucci et al., 2010).

Un aislamiento bacteriano analizado en la Facultad de Ciencias Biológicas (UNMSM) Brasil, demostró la capacidad de degradación *in vitro* de cepas bacterianas en ambientes contaminados, para evaluar el potencial bacteriano, determinado a partir de la densidad óptica (DO), se realizaron dos soluciones salinas con petróleo y diésel (1%). Los resultados mostraron la capacidad de los microorganismos para metabolizar dichos compuestos durante 15 días previos a su crecimiento. El análisis genético 16S rRNA de los aislados concluye en los géneros *Proteobacterium*, *Pseudomonas* y *Exiguobacterium*. Los resultados muestran la potencial aplicación de las bacterias en procesos de biorremediación por su capacidad metabólica y adaptativa de crecimiento usando hidrocarburos (Lustosa et al., 2018).

2.8 Construcción de ceparios

Un cepario o consorcio bacteriano es un grupo de bacterias extraídas de un solo sitio de indagación, recopiladas y estudiadas en un laboratorio, del mismo modo, resguardadas. La colección de cultivos microbianos tiene como objetivo fundamental obtener, preservar, clasificar, estudiar y documentar de manera completa y accesible, un acervo de cultivos bacterianos, puros, estables y bien clasificados de interés específico (CINVESTAV, 2021).

En el Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (U.M.I.E.Z) de la F.E.S. Zaragoza, a partir de la colección americana de cultivos tipo (ATCC) reúne en su cepario una pequeña colección de cuatro cepas bacterianas. Las cepas se encuentran resguardadas a -20° C y cada 90 días son evaluadas para el control de calidad y empleadas en la calibración de equipos.

Las cepas son de los géneros *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Escherichia coli* ATCC25922 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228 (García, 2013).

El mantenimiento de un cepario requiere de constantes revisiones para asegurar la latencia bacteriana es el caso de Acosta (2019) para evaluar la viabilidad y pureza de un consorcio que se encuentra en la Universidad de Santander, dicho consorcio está constituido por 14 cepas microbianas (ATCC) de las cuales ocho son bacterias y seis cepas de hongos filamentosos, distribuyéndose en tres grandes grupos (Bacterias Gram Positivas, Bacterias Gram Negativas y Hongos filamentosos). Como resultado se determinó una condición de conservación de 95,7% para Bacterias Gram negativas y 98,3% para Bacterias Gram positivas de recuperación de viabilidad a los 12 meses de conservación como resultado promedio.

En 1998, en el Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas se creó un consorcio bacteriano a partir de la donación de cada cepa por diferentes universidades como lo es el Instituto Politécnico Nacional (IPN), Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del IPN, Colección Americana de cultivos Tipo (ATCC) y el Hospital de Especialidades Pediátricas (HEP) con la finalidad de la realización de prácticas y uso docente. Gutiérrez-Jiménez et al., (2015) investigó la viabilidad, pureza y características biológicas del consorcio, dicho cepario cuenta con 33 especies bacterianas agrupadas en ocho géneros y cinco familias (*Streptococcaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcaceae*, *Bacillaceae* y *Pseudomonaceae*). La mayor parte de la colección está constituida por los géneros *Streptococcus* y *Escherichia* (45,5 y 21,2%, respectivamente), seguidos de *Staphylococcus* (9%), *Bacillus*, *Shigella* y *Salmonella* (6,1% por género), *Klebsiella* y *Pseudomonas* (3% por género).

En la Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas de la Universidad Internacional SEK, Quito, se realizó una investigación cuyo fin es aislar de microorganismos y disponibilidad para actividades de docencia así como la generación de un consorcio bacteriano, tomando muestras de fuentes naturales en tres diferentes puntos (tierra, estiércol y queso crema) como resultado se obtuvieron ocho cepas de los géneros *Lactobacillus zeae* s, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Lysinibacillus boronitolerans* (Osorio et al., 2021).

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1 Preparación de medios de cultivos.

Para visualizar el desarrollo de bacterias aerobias no exigentes y la diversidad biológica de las muestras bacterianas, se utilizó medio de cultivo Métodos Estándar y para la conservación de cepas, el medio de cultivo de Luria Bertani (LB).

Los reactivos necesarios para dichos medios se detallan en la siguiente tabla 4. Estos componentes fueron disueltos en agua destilada, colocados en un agitador de calentamiento para su completa disolución, a su vez se diluyó el medio en un matraz Erlenmeyer sellado y listo para ser esterilizado en la autoclave vertical a temperatura y presión constante de 121°C y 15 lb respectivamente durante un lapso de 15 a 20 minutos para evitar el crecimiento de contaminantes. Finalmente, ya esterilizado el medio de cultivo se vertió en cajas Petri y dejó reposar para que gelificaran en la campana de flujo horizontal.

Tabla 4. Medios de cultivo para la siembra de microorganismos.

MEDIO DE CULTIVO	REACTIVOS	g/L
Medio LB	Peptona de caseína	10
	Extracto de levadura	5
	Cloruro de sodio	5
	Agar bacteriológico	15
Métodos Estándar	Peptona de caseína	5
	Extracto de levadura	2.5
	Dextrosa	1
	Agar bacteriológico	15

Se aseguró que los medios de cultivos gelificados estuvieran a temperatura ambiente previo a su utilización, en caso contrario se almacenaron a 4°C (refrigerador). Cada caja Petri fue rotulada con la fecha de elaboración para asegurar la calidad y estabilidad de los nutrientes (Figura 5).

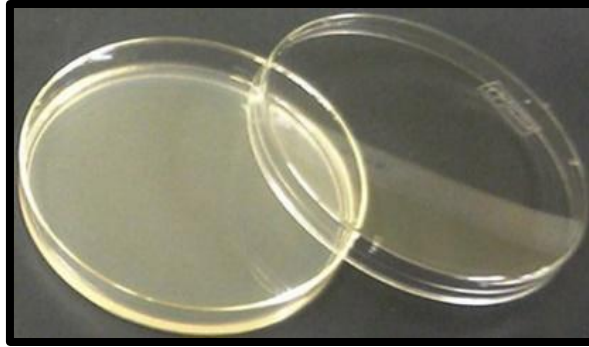


Figura 5. Medio de cultivo LB sin contaminación.

Para los bioensayos en tubo se preparó medio mineral sin fuente de carbono, el cual consta de los siguientes ingredientes Tabla 5 (gr/L):

Tabla 5. Concentración de medio mineral.

INGREDIENTES	CONCENTRACIÓN
NH ₄ Cl	0.1 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.04 g
NaCl	0.2 g
K ₂ HPO ₄	0.02 g
KH ₂ PO ₄	0.02 g

Tanto los reactivos como cada uno de los materiales se esterilizaron a 15 lb de presión, los reactivos durante 15 a 20 min y la cristalería durante 30 minutos, bajo las condiciones anteriormente mencionadas.

3.2 Disposición y resguardo del cepario.

En el laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto Tecnológico Superior de Misantla se cuenta con un consorcio bacteriano generado por la tesista Martha Domínguez la cual hizo entrega de un total de 5 cepas en medio semisólido (Figura 6), obtenidas a partir de talleres mecánicos expuestos a hidrocarburos, ubicados en la ciudad de Misantla, Veracruz. A partir de este consorcio se resembraron las diferentes cepas con la finalidad de evaluar su crecimiento en presencia de BTEX.

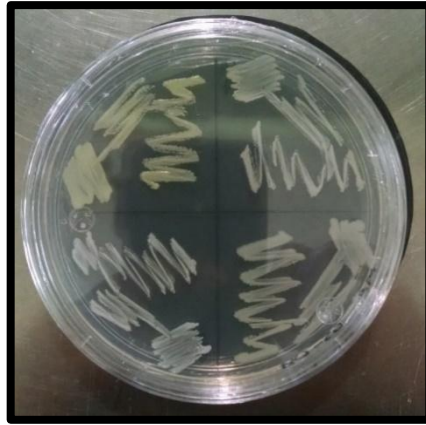


Figura 6. Entrega del consorcio bacteriano.

Para la determinación de la viabilidad bacteriana de dichas cepas, se realizaron siembras aisladas (con resiembras en caso de contaminación) de los microorganismos adquiridos para confirmar un óptimo crecimiento (activación bacteriana), esto se logró incubando durante aproximadamente 48 horas a 31°C, con una primera revisión de crecimiento a las 24 horas (Figura 7).



Figura 7. Activación de las cepas bacterianas.

3.3 Colecta de muestras

La toma de muestra tuvo la finalidad de obtener microorganismos nativos, para aislarlos y probar su capacidad degradadora frente a los hidrocarburos presentes en la zona de muestreo contaminada se tomaron cinco muestras (suelo) en diferentes talleres mecánicos tabla 6 expuestos a hidrocarburos, los puntos de muestreo están ubicados en los alrededores de la ciudad de Misantla (Figura 8).

Tabla 6. Ubicación geográfica de los puntos de muestreo.

Taller	Nombre	Ubicación
Taller 1	“Toño”	Latitud: 19,9369063°, Longitud: -96,8501309
Taller 2	“El pocito”	Latitud: 19,9384097°, Longitud: -96,8499056°
Taller 3	“Galván”	Latitud: 19,9430957°, Longitud: -96,8504724°
Taller 4	“Banderilla”	Latitud: 19,9344947°, Longitud: -96,8490896°
Taller 5	“El asilo”	Latitud: 19,94321°, Longitud: -96,8497077°

Para la recolección de las muestras sencillas se emplearon bolsas plásticas limpias, marcador permanente, una espátula y un frasco hermético previamente esterilizados, se ubicó el lugar de muestreo y se tomó con una espátula una pequeña porción de suelo aproximadamente un centímetro de profundidad, con un marcador se codificó cada muestra tomada principalmente con el nombre del taller y fecha. Para el transporte de las muestras se necesitaron bolsas de plástico con el propósito de conservar la muestra en perfectas condiciones y a temperatura ambiente, se resguardaron las muestras en el laboratorio a temperatura ambiente si es que se analizaría en las 24 h siguientes y a 4°C para periodos no mayores a cinco días.

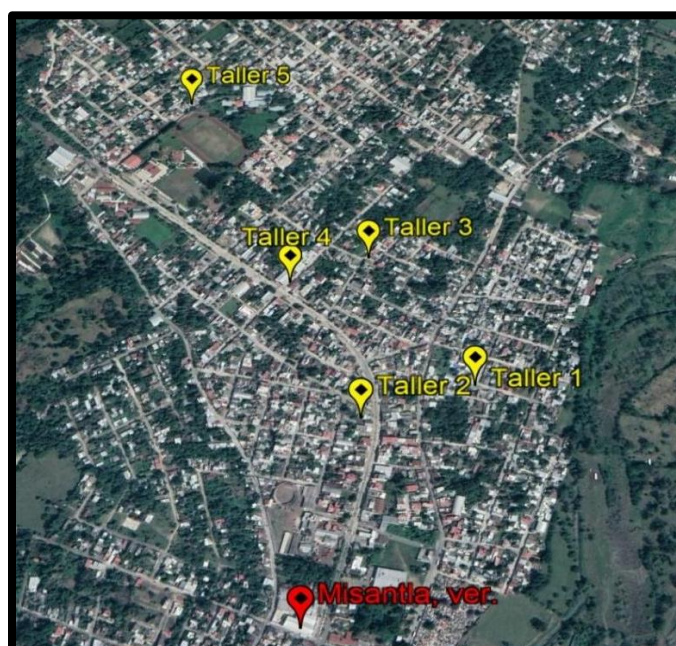


Figura 8. Localización de los talleres.

3.4 Crecimiento bacteriano en medios nutritivos

Fue necesario esterilizar el área donde se sembraron las muestras, para ello se manejó alcohol al 70% y con servitoallas se desinfectó toda la superficie, se emplearon dos mecheros uno de cada lado para mantener el área estéril y que ninguna caja fuera contaminada por algún otro microorganismo del ambiente.

Cada muestra fue maniobrada por separado, sin embargo, el procedimiento para la obtención de los microorganismos fue el mismo. En un vaso de precipitado de 100 mL se vertieron 50 mL de agua destilada estéril y cinco gramos de suelo, con ayuda de un agitador de cristal estéril se homogenizó la mezcla. Se dejó reposar cada vaso de precipitado durante 30 minutos para la sedimentación del suelo y asegurar la obtención de una alícuota del sobrenadante.

Con una aza bacteriológica esterilizada en el mechero se tomó la alícuota para transferirla y dispersarla por agotamiento en las cajas Petri con medio de cultivo. Se realizaron diversas siembras por triplicado, con la técnica y variantes de estría cruzada (Figura 9), las cajas se sellaron herméticamente con cinta *kleen pack* y se rotularon con la fecha y nombre del taller. Cada muestra se sembró por triplicado, posteriormente se esperó un tiempo de incubación de 1-3 días a temperatura ambiente y en oscuridad para observar el crecimiento de bacterias y/u hongos.

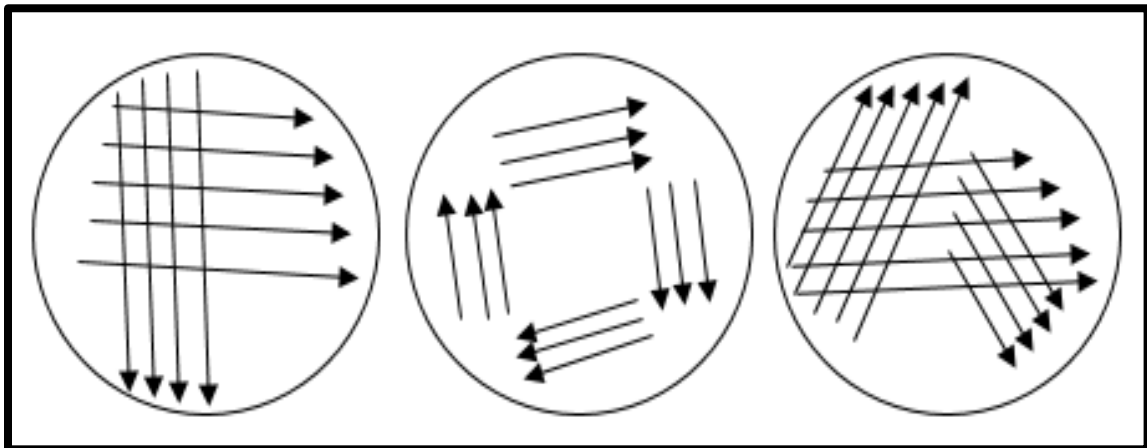


Figura 9. Variantes de la técnica de siembra 'estría cruzada'.

Si la respuesta de crecimiento era abundante y esta impedía la separación de microorganismos bacterianos, el procedimiento se repetía disminuyendo la cantidad de alícuota y aumentando la zona de dispersión y agotamiento de esta.

3.5 Confirmación de cultivos puros

Para la obtención de co-cultivos puros o aislados bacterianos, se observaron en cada caja Petri las colonias bacterianas con morfologías definidas, es decir, se seleccionaron aquellas que se diferenciaban de otros. Cada colonia fue transferida a una caja nueva, para asegurar el crecimiento de una sola cepa (una morfología), para aquellas colonias que al transferirlas transportaban esporas u otros organismos, se repetía la siembra hasta lograr su definición (separación).

Se corroboró con el contador de colonias y mediante análisis visual en diferentes fondos de color que todas las colonias de una caja Petri, presentaran la morfología bacteriana idéntica para confirmar la obtención de cultivos puros (Figura 10) y finalmente se asignaron claves a cada cepa obtenida.

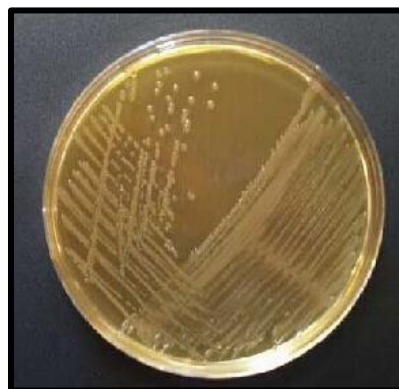


Figura 10. Ejemplo de cultivo puro bacteriano. Fuente: Jaramillo et al (2010).

3.6 Almacenamiento y resiembras del cepario

Cada cepa validada se protegió de la luz con papel aluminio y se almacenó a 4°C. Para asegurar la viabilidad de las bacterias aisladas bajo esta técnica de conservación, se resembraban cada 25 días en el medio de cultivo que resultó óptimo para su desarrollo bajo las condiciones de siembra e incubación mencionadas con anterioridad. Cuando un bioensayo requería de las cepas, estas cajas servían como alícuotas para la obtención de microorganismos frescos.

3.7 Bioensayos de tolerancia a los BTX y Nb

Los ensayos de tolerancia a monocíclicos aromáticos, se realizaron en cajas Petri, cada compuesto fue analizado por separado.

El medio empleado para este ensayo fue métodos estándar dado a la claridad y transparencia que posee después de su gelificación. Cada cepa analizada fue sembrada en la superficie mediante la técnica 'picar colonia' la cual consiste en utilizar palillos u aza bacteriológicas estériles para la disposición lineal de las muestras. Se diseñó una guía de siembra (Figura 11) para colocar en la misma posición y longitud a cada cepa estudiada.

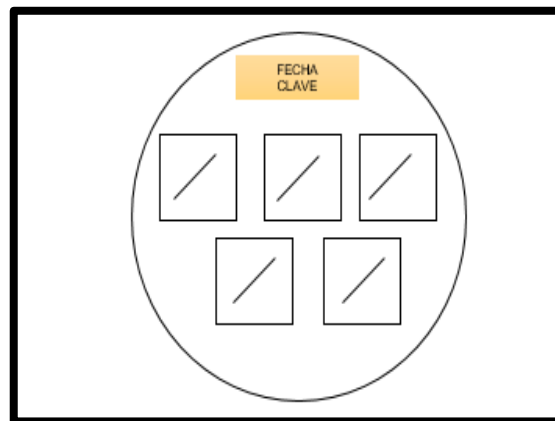


Figura 11. Base de papel para la técnica "picar colonia".

Enseguida se adicionaba el compuesto depositándolo y dispersándolo en un disco de papel filtro estéril a una concentración de 50 μL /caja Petri, para ello se usó una micropipeta graduada de 200 μL y puntas amarillas previamente esterilizadas, dicho papel era colocado en la tapa de la caja Petri, nunca en contacto con el medio de cultivo (Figura 12). Por último, la caja fue sellada con *kleen pack*, se envolvía en papel estraza y depositadas dentro de recipientes herméticos colocados en bolsas de plástico para evitar la fuga del compuesto.

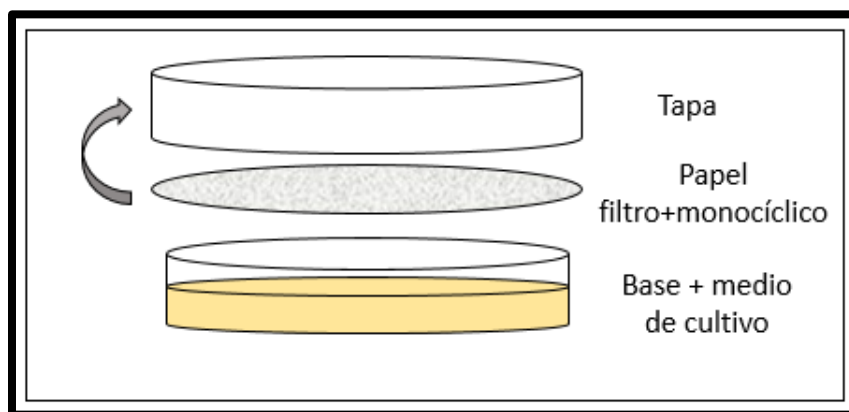


Figura 12. Diseño de una caja Petri con monocíclicos aromáticos.

Las cajas fueron incubadas de manera invertida para propiciar el contacto con el compuesto (de naturaleza volátil) durante 8 días a temperatura ambiente. Cada compuesto fue analizado por triplicado y para confirmar la validez del experimento se realizaron controles positivos (medio métodos estándar sin compuesto) que aseguraron la correcta activación de las bacterias y negativos (sin cepas bacterianas) que confirmaron la correcta esterilización del medio de cultivo.

Para observar el grado de tolerancia se realizó una guía que se observa en la figura 13, la cual estandarizó la evaluación de cada cepa para conocer la tolerancia a los compuestos mediante la densidad de su crecimiento.

Se reportó no tolerante si el crecimiento era menor al observado versus control positivo. Se concluyó como Poco Tolerante cuando el crecimiento era similar al del control positivo y se caracterizó como Tolerante si el crecimiento rebasaba la zona de crecimiento.

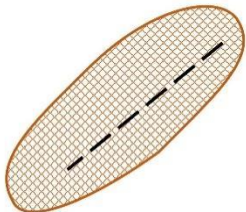
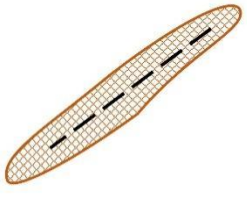

Tolerante	Poco tolerante	No tolerante
+++	++	+
		

Figura 13. Diferentes niveles de crecimiento bacteriano.

3.8 Consumo de BTEX como fuente de carbono

Los bioensayos se realizaron en tubos de ensayo con capacidad de 8 mL (Figura 14) ya que se consideró importante mantener una superficie de contacto mínima entre el medio de cultivo y el espacio gaseoso del tubo dado a que los monocíclicos estudiados son volátiles.



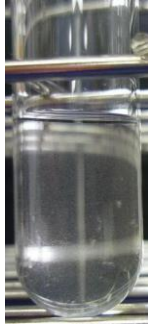

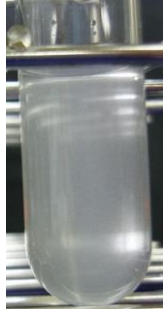
Figura 14. Tubos de ensayo con capacidad de 8 mL.

Se inocularon 50 μ L de cada cepa tolerante (previamente activada) en 5 ml de medio mineral, los tubos eran sellados con tapa de rosca y asegurados con kleen pack. Cada cepa se testeó por triplicado y en cada grupo se aseguró bioensayos control (únicamente medio mineral).

Todos los bioensayos se incubaron a temperatura ambiente en un agitador horizontal marca Civeq a una velocidad de 200 r.p.m durante una semana.

Diariamente se aseguraron las condiciones del experimento y finalizando el tiempo de incubación se corroboró la presencia de turbidez o precipitado en los tubos de ensayo, por último, se registraron los resultados como lo indica la Tabla 7.

Tabla 7. Niveles de turbidez.

No turbiedad	Poca turbiedad	Turbiedad
		




















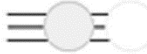
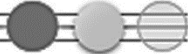










3.9 Descripción de cepas

Una de las etapas previas a la identificación taxonómica bacteriana es realizar la observación de las colonias bacterianas que se generan en siembra de cultivos puros. Se debe describir la morfología de una colonia bacteriana (cada especie es capaz de producir una colonia, diferente a las demás).

A partir de un inóculo de cada cepa, se resembró mediante la técnica de estría cruzada, incubándose durante 48 horas a temperatura ambiente. La generación de colonias se observó en la superficie de las cajas Petri.

Por último, se registraron las diferencias entre los nueve aspectos que señala la tabla 8, se usó el contador de colonias y diferentes fondos de color para observar con claridad cada característica.

Tabla 8. Características morfológicas.

	Puntiforme	Pequeña	Mediana	Grande	
TAMAÑO	 <1mm	 1mm	 2mm	 3mm o mayor	
FORMA	Circular  Fusiforme 	Rizoide 	Filamentosa 	Irregular 	
BORDE	Entero 	Rizoide 	Filamentoso 	Ondulado  Lobulado  Rizado 	
TRANSPARENCIA:					
	Opaca		Transparente		
BRILLO:					
	Sin brillo		Brillante		
COLOR:					
	No pigmentadas		Pigmentadas (indicar color)		
TEXTURA:					
	Lisa		Rugosa		
ELEVACIÓN:	Plana 	Elevada 	Convexa 	Pulvinada 	Umbilicada 
CONSISTENCIA:					
	Dura	Suave	Mucoide		

Fuente: Pirez y Mota, 2008.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Preparación y obtención de medios de cultivo.

Para el aislamiento de cada una de las cepas, se utilizó el medio Métodos Estándar mismo que se elaboró en condiciones asépticas en el laboratorio (Figura 15), se procuró usar el medio de cultivo durante los primeros 3 días o de forma inmediata de lo contrario, se aseguró almacenar las placas invertidas en refrigeración. Estas condiciones previenen el deterioro, la deshidratación y adicionalmente, deben colocarse apartadas de la luz, usualmente son puestas en contenedores como bolsas de plástico, papel o celofán.

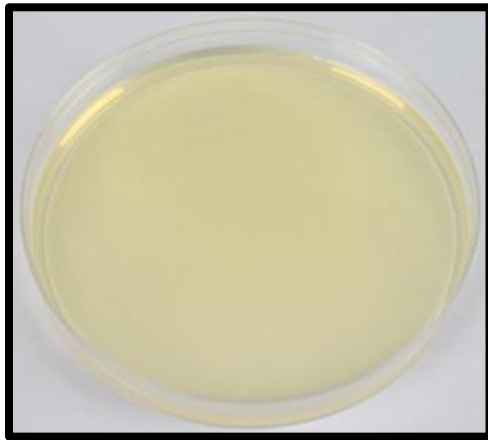


Figura 15. Medio LB en caja Petri sin contaminación.

Se eligió el medio Luria Bertani LB, ya que este caldo es nutricionalmente rico diseñado para el crecimiento de cultivos de cepas recombinantes puras (Miller, 2018).

4.2 Recolección de cepas y microbiota bacteriana

A inicios del proyecto de investigación la estudiante M. Domínguez, entregó una caja Petri con cinco cepas puras y definidas en medio LB, cada cultivo contaba con una clave de asignación y descripción general electrónica sobre las condiciones de desarrollo. Los cultivos se consideraron frescos (24 horas de siembra) y la caja se almacenó a 4°C (Figura 16).

Como diversos candidatos bacterianos han sido obtenidos de ambientes saturados o impactados con diversos contaminantes, posteriores análisis confirman la capacidad de

ciertas especies para degradar, acumular o disminuir la toxicidad y concentración de



Figura 16. Resiembra y activación de cuatro cepas bacterianas.

agentes tóxicos. El suelo contaminado crea la oportunidad de establecer comunidades microbianas relevantes, por ejemplo, Labra-Cardón, (2012) obtuvo 23 aislados bacterianos a partir de suelo rizosférico contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo. Para aumentar el número de cepas se colectó de una muestra de suelo contaminado visiblemente con hidrocarburos que fue obtenida de un taller mecánico de motos. Con la muestra homogeneizada (Figura 17) se generaron las alícuotas correspondientes para la siembra y obtención de cepas bacterianas.

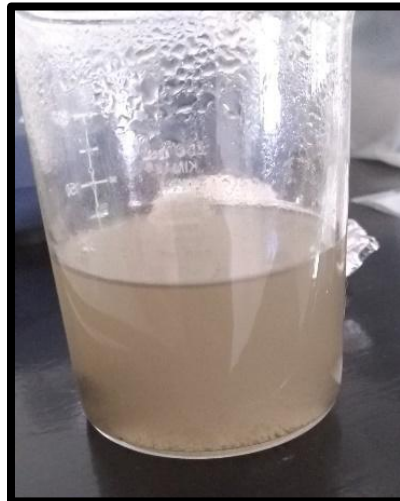


Figura 17. Homogenización de la muestra.

4.3 Crecimiento del cepario

La microbiota bacteriana, tanto la proporcionada como la aislada, se adaptó favorablemente a condiciones de laboratorio, esto fue en fotoperiodo natural y temperatura ambiente. Para asegurar las condiciones estériles de crecimiento, todos los cultivos en caja Petri se incuban en embalajes de cartón y bolsas plásticas. Contreras (2013) señala que el intervalo de adaptación a un nuevo ambiente sucede en los primeros 5 días de cultivo. Para estas cepas, se observó que algunas cepas crecían en 24 horas y otras requerían hasta 48 horas de adaptación a los nutrientes del medio (Figura 18).

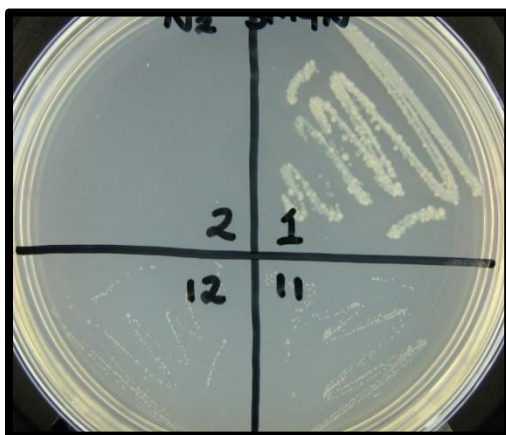


Figura 18. Crecimiento dispar de los microorganismos.

Cuando proliferaba otro tipo de microorganismos (no bacterias) se resembleda nuevamente, ya que esto indicaba contaminación y posible pérdida de la cepa (Figura 19).

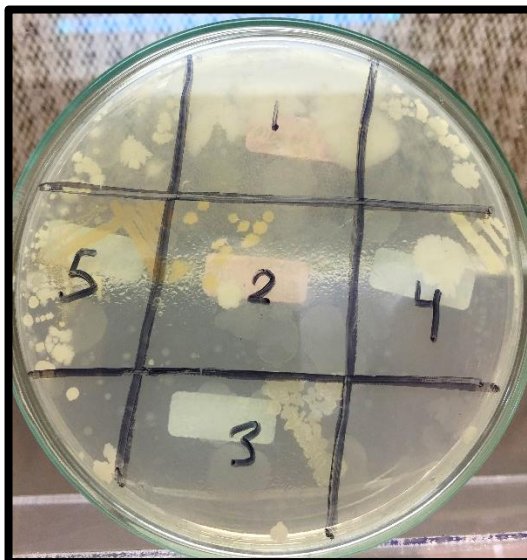


Figura 19. Presencia de microorganismos ajenos al cepario.

4.4 Verificación de cultivos puros.

Posterior a cada resiembra se visualizaban las cajas a las 12, 24 y 48 horas de cultivo. Únicamente se transferían las colonias bacterianas que se mostraban separadas del resto de la población en la caja Petri (Figura 20), para extraer exitosamente un fenotipo bacteriano, algunas cepas se resembraron hasta seis veces. Aunado a esto, se confirmaba si en las últimas resiembras existía el crecimiento de una sola especie, dicha confirmación se analizaba colocando a cada caja bajo la lupa y luz del cuenta colonias marca SOL-BAT, si no se observaba otro fenotipo unido a la colonia o presencia de satélites (bacterianos) se consideraba a la cepa en estatus, cultivo puro.

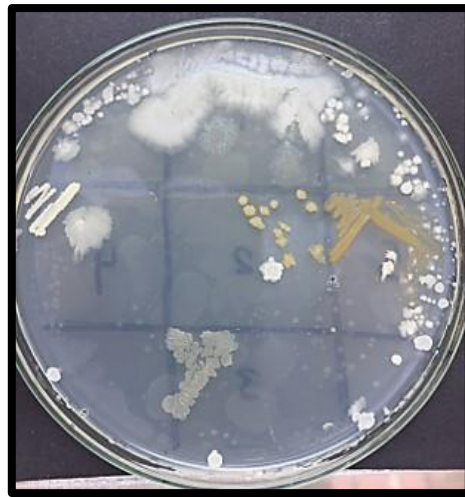


Figura 20. Crecimiento de bacterias y hongos en medio Métodos Estándar.

El conocer el tiempo y desarrollo de cada cepa aislada, permitió agrupar de cuatro a dos bacterias por caja Petri (Figura 21). Cada reunión concentraba cepas con similares características, es decir sin producción de exopolisacáridos y parecidos tiempos de crecimiento.



Figura 21. Crecimiento de cepas definidas en una caja Petri.

Los microorganismos del cepario eran resembrados y reactivados cada 25 días bajo las mismas condiciones de cultivo. Se aclimataron y resguardaron un total de cinco cepas en la tabla 9 se indican las claves (CB= Cepa bacteriana, T3= Taller de muestreo y 01= Número de cepa) usadas como nombres de asignación a cada cepa y sus características morfológicas.

Tabla 9. Morfología del cepario aclimatado.

Clave	Forma	Transparencia	Brillo	Color	Textura
CB-T3/01	Irregular-ondulado	Opaca	Sin brillo	Blanco hueso	Lisa
CB-T3/02	Irregular-ondulado	Transparente	Sin brillo	Beige	Rugosa
CB-T3/03	Irregular-ondulado	Opaca	Sin brillo	Vainilla	Lisa
CB-T3/04	Irregular-ondulado	Opaca	Sin brillo	Beige	Rugosa
CB-T3/05	Irregular-ondulado	Transparente	Sin brillo	Blanco hueso	Rugosa

4.5 Ensayos en caja Petri con los monocíclicos aromáticos

Las cinco cepas se depositaron y crecieron en medio semisólido Métodos Estándar, la disposición de las cepas está señalada en la figura 22. Los experimentos para evaluar la tolerancia a BTEX se monitorearon durante 8 días.

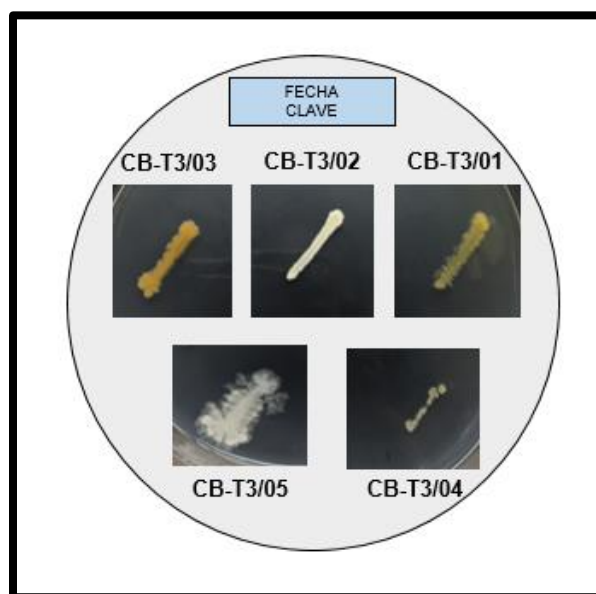


Figura 22. Disposición espacial de las cepas en los ensayos

A continuación, se explicará el comportamiento de las bacterias en cada compuesto. Se indicará en una imagen, que concentra las tres réplicas sembradas y el grado de tolerancia.

4.5.1 Tolerancia a Benceno

Se observa que la cepa CB-T3/05 (Figura 23) se desarrolla con dificultad y exhibe baja o nula tolerancia al compuesto. El resto de las cepas indicó un crecimiento similar al control positivo.



Figura 23. Crecimiento de cepas bacterianas expuestas a Benceno.

Woolrich (2016) confirma que el Benceno es uno de los más compuestos aceptados y/o tolerados por diversas cepas, en un ensayo evaluó 51 aislados y observó que 23 diferentes microorganismos soportaron concentraciones superiores a 260 000 ppm.

En este estudio se observa que más del 70% de las cepas analizadas, no presentaron afectaciones o diferencias morfológicas y por ende crecimiento similar al control positivo. Cabe señalar que la réplica 3, tiene un error en la disposición de la cepa CB-T3/05 y CB-T3/04, están invertidas.

4.5.2 Tolerancia a Tolueno

Todas las cepas reflejaron una respuesta moderadamente menor que al Benceno a pesar de que el Tolueno es menos tóxico que el Xileno y Benceno (Corona, 2018), similarmente la cepa CB-T3/05 presenta dificultad de crecimiento, Además, se observa que no existe crecimiento continuo en la zona de punción, incluso en una réplica el

crecimiento es apenas perceptible. Rodríguez (s.f.) sugiere que la adición de un cosustrato permitiría la aceptación y degradación del Tolueno. Sin embargo, en este proyecto no se evaluó la importancia de las fuentes de carbono como sinergia al grado de tolerancia bacteriana (Figura 24).

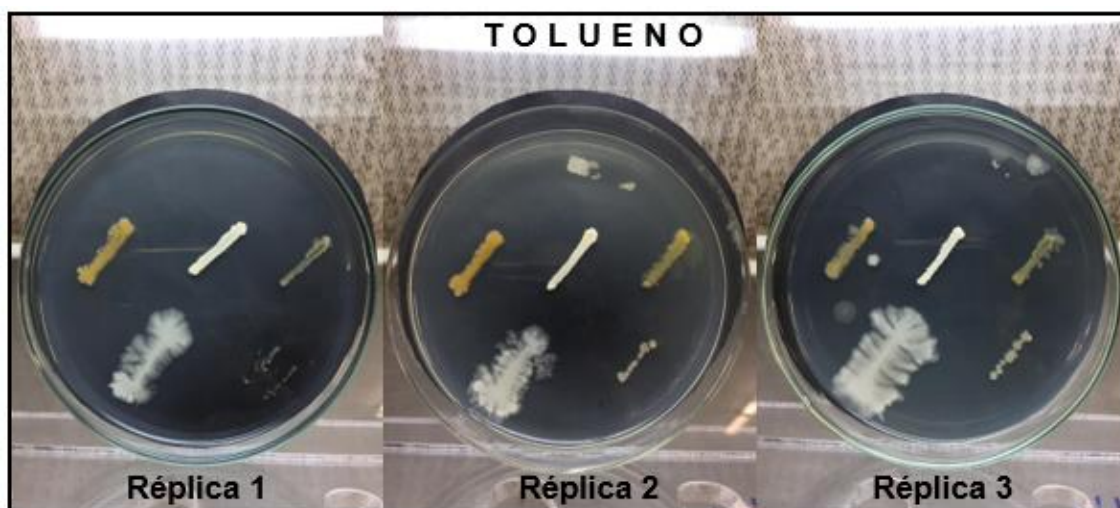


Figura 24. Crecimiento de cepas bacterianas expuestas a Tolueno.

4.5.3 Tolerancia a Xileno

En la figura 25 se muestra el comportamiento de las cepas en presencia de Xileno, la cepa CB-T3/01 generó un tipo de exopolisacárido, esta es una conducta frecuente en las bacterias cuando necesitan protegerse frente a un agente externo (Lasa et al., 2005) este fenómeno se pudo observar en dos réplicas.

Los BTEX comparten similitudes, por ejemplo, son agentes no polares de carácter lipofílico y todos comparten como base un anillo aromático bencénico (García-Zárata, 2013), a pesar de esto Suárez (2004) menciona que algunas cepas que son capaces crecer en uno de estos compuestos podría no hacerlo en los restantes incluso bajo las mismas condiciones, es el caso de la cepa CB-T3/04 la cual indica intolerancia. Las cepas CB-T3/02, CB-T3/03 y CB-T3/05 continuaron presentando crecimiento abundante en las tres réplicas.

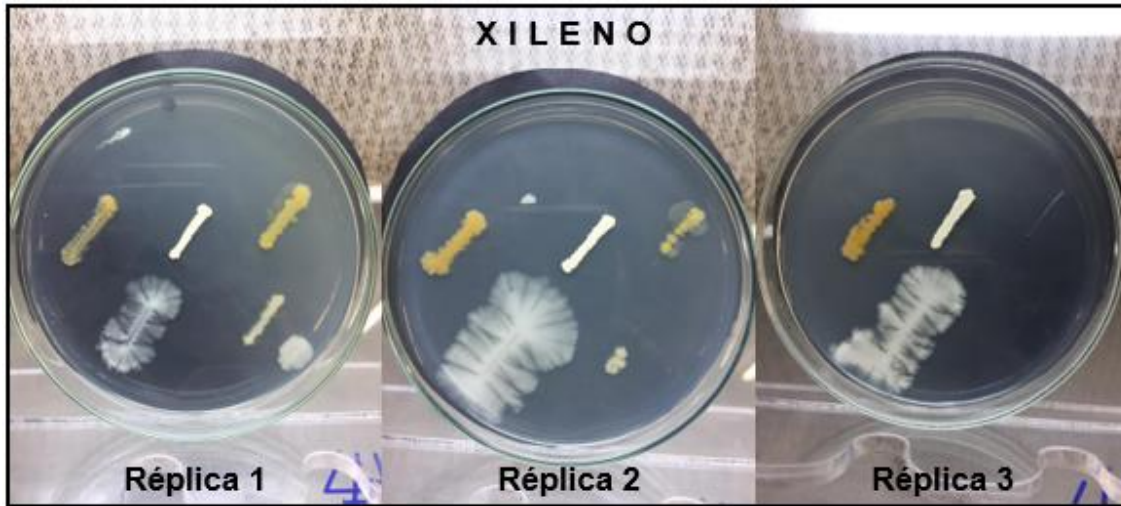


Figura 25. Crecimiento de cepas bacterianas expuestas a Xileno.

4.5.4 Tolerancia a Nitrobenceno

De acuerdo con estudios realizados, Bustamante (2020) indica que si sobrepasamos los 10 microlitros de nitrobenceno disminuye el crecimiento de las cepas, lo que deduce que se adicionó una concentración tóxica ya que las bacterias no toleraron altas concentraciones (50 microlitros) del compuesto (Figura 26).

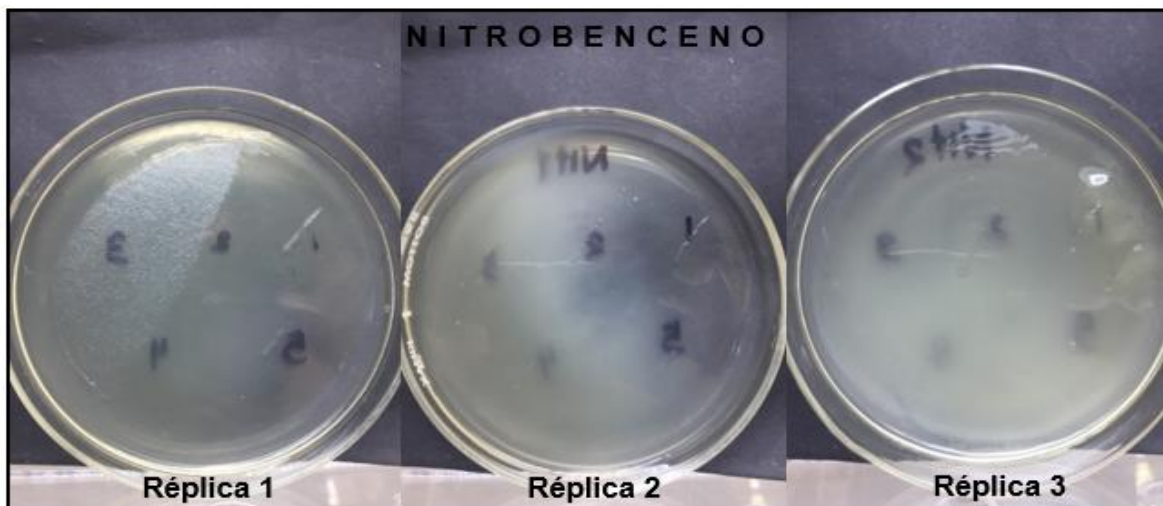


Figura 26. Crecimiento de cepas bacterianas expuestas a Nitrobenceno.

Puntualizando, de las cepas evaluadas con los monocíclicos, la cepa CB-T3/04 indicó ser más susceptible a estos solventes. Por el contrario, la cepa CB-T3/01 presentó un rendimiento similar para todos los ensayos quiere decir que su margen de adaptación es

versátil para este tipo de compuestos. También, la cepa CB-T3/05 (barra azul) mostró amplio margen de tolerancia en casi todos los compuestos destacándose como la cepa con el mejor crecimiento (Figura 27). Por último, se destaca que el nitrobenceno resultó ser un compuesto tóxico a concentraciones de 50 microlitros por caja Petri para todas las cepas aisladas.

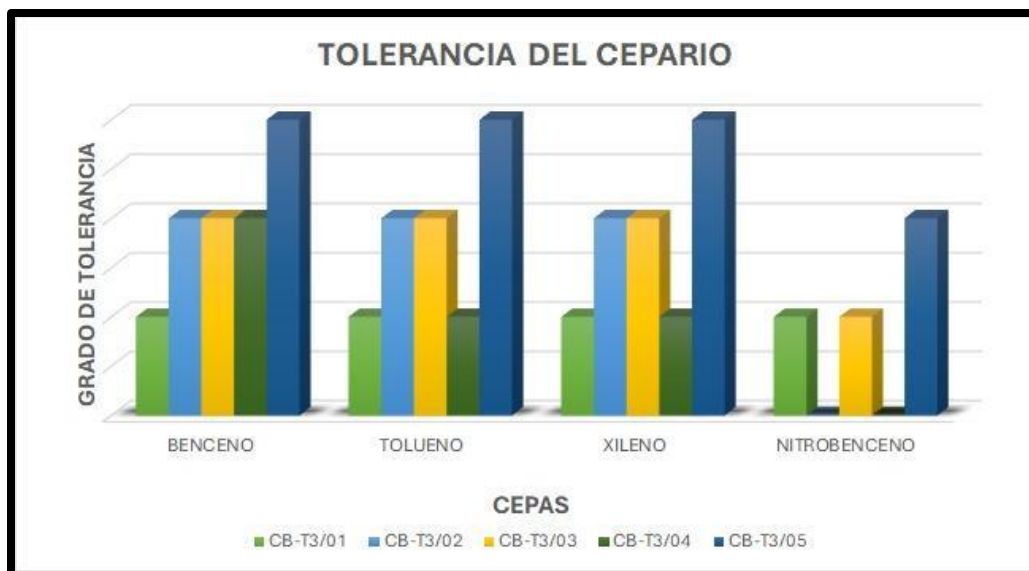


Figura 27. Respuesta de tolerancia en bioensayos con BTX y Nb.

Esta cepa es una candidata de estudios posteriores que confirmen la tolerancia y capacidad de usar a los BTEX como alimento. ya que en ocasiones la tolerancia es solo una capacidad de sobrevivir temporalmente a ciertas condiciones, van Schie y Young (2000) mencionan que este comportamiento puede estar relacionado con mecanismos que desarrollan los propios microorganismos para resistir a las concentraciones de los compuestos.

4.6 Degradación de monocíclicos aromáticos – BTX y Nb.

Independientemente del resultado anterior, en donde no se registró tolerancia al nitrobenceno, se consideró evaluarlo nuevamente junto al resto de los compuestos. Como fue señalado en la metodología, se adicionaron a cada tubo de ensayo medio mineral (sin fuente de carbono) y como sustrato el monocíclico aromático (BTEX), estos compuestos fueron analizados por separado. Se establecieron y evaluaron las cinéticas de degradación durante ocho días. Diariamente era monitoreada la presencia de turbidez que indicaba el crecimiento en cada réplica.

Bejarano (2014) confirma que el crecimiento bacteriano está limitado por el sustrato, y menciona que dicho crecimiento está dictaminado también por la concentración del metabolito que, para este caso fue cada monocíclico. Por ello se puede concluir que, si se observa turbidez en los tubos y no en los controles negativos, se confirma crecimiento bacteriano dado por el consumo de cada BTEX, es decir degradación de los compuestos.

Durante los primeros cuatro a cinco días de agitación, no se observó crecimiento, Supo (2020), durante el diseño y adaptación de un fotorreactor indicó que la degradación de benceno con concentraciones iniciales bajas es más lenta en comparación con la degradación con concentraciones iniciales altas, en caso de escalamiento se debe considerar que la carga inicial de contaminante puede acelerar el proceso de reacción y a la vez decrecer hasta una posible inhibición.

Además, solo dos de las cepas (CB-T3/01 y CB-T3/05) presentaron crecimiento en tolueno, Rangel y colaboradores (2010) reportaron degradación de tolueno por la bacteria *Pseudomona aeruginosa* en concentraciones de 0.14M con una degradación de 58.14% pero en las primeras 72 horas, sin embargo, en este estudio no se observó a los tres días de iniciado, la turbidez que indicaría la degradación de estos compuestos. Por último, el xileno fue degradado por las cepas CB-T3/02, CB-T3/03 y CB-T3/05 (Tabla 10).

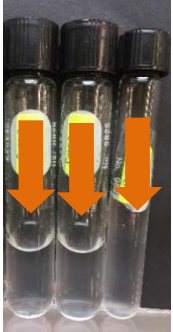
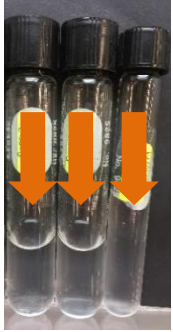


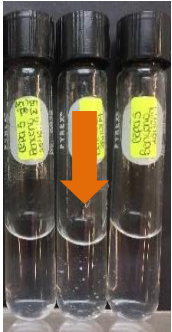
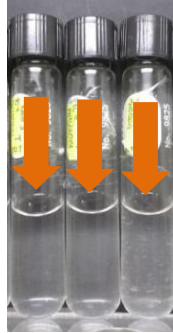
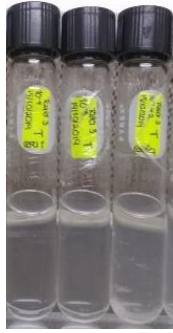

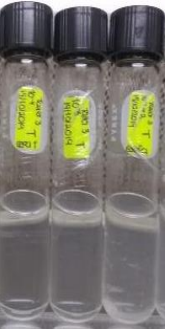
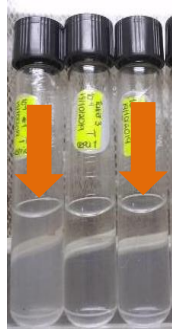




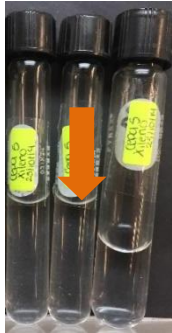
Tabla 10. Resultados finales de cepas con capacidad de degradación.

Clave	Tolerancia				Degradación		
	Benceno	Tolueno	Nitrobenceno	Xileno	Benceno	Tolueno	Xileno
CB-T3/01	+	+	+	+	+++	+++	-
CB-T3/02	++	++	-	++	+++	-	+++
CB-T3/03	++	++	+	++	++	-	++
CB-T3/04	++	+	-	+	++	-	-
CB-T3/05	+++	+++	++	+++	-	++	++

+= crecimiento en placas de medio LB más hidrocarburo. -= ausencia de crecimiento.

Los resultados del ensayo de degradación se observan en la tabla 11, en la que solo presentaron resultados los compuesto, Benceno, Tolueno y Xileno, se descartó el compuesto Nitrobenceno dado que las cepas no tuvieron respuestas. Para señalar los tubos con mayor turbidez, se auxilia la tabla con flechas.

Tabla 11. Bioensayos en tubos de ensayo

						COMPUESTOS MONOCÍCLICOS					
						CB-T3/01	CB-T3/02	CB-T3/03	CB-T3/04	CB-T3/05	
RÉPLICAS Y BIOENSAYOS DE DEGRADACIÓN						Benceno					
											
						Tolueno					
											
						Xileno					
											

4.7 Descripción del cepario

La descripción de los microorganismos (como las bacterias) requiere de estudios de morfología colonial y celular, estas caracterizaciones forman parte de claves establecidas por los laboratorios para la identificación de microorganismos (Holdeman et al., 1997 citado por Rodríguez et al., 1996).

Durante la observación de las colonias se determina su tamaño, borde, apariencia y color (Raymundo et al., 2021) además de, tipo de crecimiento, producción de mucus y elevación de los cultivos puros en los aislados a caracterizar (Granda et al., 2010).

Para este cepario, las colonias puras se observaron bajo/contra luz permitiendo diferenciar las características: tamaño, forma, borde, transparencia, brillo, color, textura, elevación y consistencia. Cada cepa fue anotada y detallada en fichas de registro (Anexo 12), la descripción final y disposición en la caja de criopreservación para una cepa se señala en la tabla 12, como ejemplo se muestra la cepa CB-T3/01.

Tabla 12. Descripción de las cepas.

CELDA: 01			
		CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS COLONIALES	
Clave	CB-T3/01		
Origen biológico	Suelo	FORMA	Irregular-ondulado
Origen geográfico	Misantla viejo, Veracruz-Llave, México.	TRANSPARENCIA	Opaca
Condiciones de crecimiento	24-35°C	BRILLO	Sin brillo
Medio de cultivo:	Luria-Bertani; Métodos estándar.	COLOR	Blanco hueso
Aislado por	Martha Domínguez Cruz, Instituto Tecnológico Superior de Misantla.	TEXTURA	Lisa
TOLERANCIA		DEGRADACIÓN	
Benceno	Tolueno	Benceno	Tolueno
+	+	+++	+++
	Nitrobenceno	Xileno	Nitrobenceno
	+	+	-
	Xileno	Xileno	Xileno
	+	+	-

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

A pesar de no contar con parámetros controlados, se acondicionaron y aclimataron las cepas recibidas por parte de la alumna Domínguez y aisladas en este trabajo bajo las condiciones del laboratorio LIAAp en el que se resguardó un cepario con las fichas informativas y claves de registro.

Se caracterizaron morfológicamente y evaluaron sobre su capacidad de tolerancia y crecimiento un total de cinco cepas contra cuatro monocíclicos aromáticos Benceno (B), Tolueno (T), Xileno (X) y Nitrobenceno (Nb).

El Nitrobenceno fue un compuesto no tolerante por las bacterias.

La cepa CB-T3/05 puede considerarse como un candidato en procesos de degradación para los compuestos benceno, tolueno y xileno además de otros monocíclicos aromáticos.

Durante la elaboración del trabajo se presentó una emergencia de salud internacional (Pandemia COVID) que en consecuencia por no poder asistir a la resiembra y activación de cepas llevó a la pérdida de células viables.

CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍAS

1. Abed, R. M., Safi, N. M., Köster, J., De Beer, D., El-Nahhal, Y., Rullkötter, J., & García-Pichel, F. (2002). Microbial diversity of a heavily polluted microbial mat and its community changes following degradation of petroleum compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1674-1683.
2. Aburto, A., & Ball, A. S. (2009). Bacterial population dynamics and separation of active degraders by stable isotope probing during benzene degradation in a BTEX-impacted aquifer. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 25(3).
3. Acevedo García, J. (2009). *Evaluación del riesgo para la salud humana asociado a la exposición a BTEX en las gasolineras de Quito* (Bachelor's thesis, Quito: USFQ, 2009).
4. Acosta Ovallos, A. K. (2019). *Evaluación de técnicas de conservación para microorganismos de importancia en microbiología industrial en el Cepario de la Universidad de Santander*.
5. Acuña, A., Pucci, G., Morales, M. J., & Pucci, O. (2010). Biodegradación de petróleo y sus derivados por la comunidad bacteriana en un suelo de la Patagonia Argentina. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 30(1), 29-36.
6. Aldazábal, C., Manrique, J., Ortelli, M., Martínez, H., & Calabrese, U. (2005). Criterios para la vigilancia biológica en la exposición laboral al tolueno. *Ciencia y trabajo*, 17, 114- 117.
7. Altamirano Meza, C. (2017). *Determinación de benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX) en aire ambiente del Distrito Metropolitano de Quito mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama* (Bachelor's thesis, PUCE).
8. Álvarez, C. I. e. m. e. n. t. e. Bacterias que generan electricidad. *El País*, 41-42.
9. Antonio, G. Z. M., Evarista, A. G. M., Mariana, V. C., Jacobo, S. M., & Natalia, R. r. exposición a btx en población escolar por proximidad geográfica con gasolineras.
10. Antonio, G. Z. M., Evarista, A. G. M., Mariana, V. C., Jacobo, S. M., & Natalia, R. r. exposición a BTEX en población escolar por proximidad geográfica con gasolineras.
11. Apella, C. M., & Araujo, Z. P. (2005). Microbiología del agua. Conceptos Básicos. *Tecnologías Solares para la Desinfección y Descontaminación del Agua*, 33- 50.
12. Araujo, I., Montilla, M., Cárdenas, C., Herrera, L., Angulo, N., & Morillo, G. (2006). Lodos estabilizados y cepas bacterianas en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Interciencia*, 31(4), 268-275.
13. Arroyo, M. A. R. O. T. O., Quesada, J., Quesada, R., & Geocisa, J. (2004). Aplicación de

- sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos. *Geocisa. División de Protección Ambiental, Guadalajara-México*, 4(5), 297-305.
14. Arteaga, P. M. D. L. C. (2017). Propiedades del benceno y sus usos en la industria. *Con-Ciencia Boletín Científico de la Escuela Preparatoria No. 3*, 4(7).
 15. Barrios-San Martín, Y., Acosta, S., Sánchez, A., Toledo, A., González, F., & García, R. M. (2012). Estudio y selección de bacterias aerobias degradadoras de hidrocarburos del petróleo aisladas de costas de Cuba. *Biotecnología Aplicada*, 29(2), 80-86.
 16. Bejarano Bohórquez, D. N. (2014). *Cinética de biodegradación de fenol, a partir de un cultivo de pseudomonas aeruginosa aislada mediante selección, en consorcio con Chlorella vulgaris como matriz de inmovilización* (Bachelor's thesis, Bogotá-Uniandes).
 17. Bermúdez Acosta, J. (2012). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos a partir del uso de un consorcio bacteriano autóctono en la zona costera de Punta Majagua. Cienfuegos, Cuba* (Doctoral dissertation, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas).
 18. Bezos, A. H. Seguridad medioambiental para proyectos de Shale Gas.
 19. Bracconi, G. R., Medina, A. P., Blanco, S. M., Winder, A. M., Porras, O. M., & Espinoza, J. T. (2017). Evaluación de la exposición a benceno en trabajadores de diferentes áreas laborales. *Salud Uninorte*, 33(3), 363-372.
 20. Bracho, M., Díaz, L., & Soto, L. M. (2011). Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y heterocíclicos por *Pseudomonas* spp. *Ciencia*, 12(4).
 21. Brito, O. O., Ize, I., & Gavilán, A. (2003). La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México. *Gaceta ecológica*, (69), 83-92.
 22. Bustamante Sandoya, G. F. (2020). *Selección de microorganismos con capacidad de biorremediación provenientes de aguas residuales del río Quevedo, provincia de Los Ríos, año 2020* (Master's thesis, Quevedo: UTEQ).
 23. Cabrera, e. t. d. i. r. anexo j: impactos ecológicos de la contaminación en el área de concesión.
 24. Cardona, S., & Iturbe, R. (2003). Biodegradación de diésel mexicano por un consorcio de bacterias de un suelo agrícola. *Dyna*, 70(138), 13-25.
 25. Cavazos-Arroyo, J., Pérez-Armendáriz, B., & Mauricio-Gutiérrez, A. (2014). Afectaciones y consecuencias de los derrames de hidrocarburos en suelos agrícolas de Acatzingo, Puebla, México. *Agricultura, sociedad y desarrollo*, 11(4), 539-550.
 26. CINVESTAV-Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares (2021, 27 de agosto) Colección del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería CDBB (cinvestav.mx)
 27. Corona Galicia, A. M. (2018). Evaluación de cepas bacterianas promotoras del crecimiento

vegetal para degradar hidrocarburos ligeros y compuestos aromáticos (BTX) (Bachelor's thesis, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla).

28. Cueto Rojas, H. F. (2008). Pruebas de biofertilización de arroz utilizando un consorcio microbiano fotosintético fijador de nitrógeno.
29. De Yuso Ariza, A. M. (2012). *Desarrollo de carbones activados a partir de residuos lignocelulósicos para la adsorción y recuperación de tolueno y n-hexano* (Doctoral dissertation, Universidad San Jorge).
30. Escolar Quereda, P. (2020). Estudio de la exposición a xileno en el laboratorio de anatomía patológica de un hospital público de la región de Murcia.
31. Fasce Clemente, B. S. (2016). Análisis y modelado de los procesos químicos asociados al cultivo de organismos fotosintéticos en fotobiorreactores (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València).
32. Ferré, C., Llopis Roca, F., Jacob, J., Juan i Pastor, A., Palom, X., Bardés, I., & Salazar Soler, A. (2011). Evaluación de la utilidad de la tinción de Gram del esputo para el manejo de la neumonía en urgencias. *Emergencias*, 2011, vol. 23, num. 2, p. 108-111.
33. Fessenden, R. J. (1983). Química orgánica.
34. Fontúrbel, F., & Ibañez, C. (2004). Fuentes de energía biológica: empleo del metabolismo microbiano para la descontaminación de aguas. *Rev. Biol. Org*, 17.
35. Frioni, L. (1999). *Procesos microbianos* (No. 631.46 FRI). Ed. de la Fundación Univ. Nacional de Río Cuarto.
36. Gallego Díez, M. L. (2014). Desarrollo de una metodología de muestreo y análisis mediante captadores pasivos y cromatografía gaseosa para determinar contaminantes hidrocarburos (BTEX) en aire.
37. García-Cruz, N. U., & Aguirre-Macedo, M. L. (2014). Biodegradación de petróleo por bacterias: algunos casos de estudio en el Golfo de México. *Golfo de México: Contaminación e Impacto Ambiental, Diagnóstico y Tendencias; Botello, AV, Rendón von Osten, J., Benítez, JA, Gold-Bouchot, G., Eds*, 641-652.
38. García-Zarate, M. A. (2013). Aplicación de SIG para detectar zonas de vulnerabilidad y riesgo por la ubicación de estaciones de servicio en la zona urbana. Caso estudio Ensenada, Baja California. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 9(1), 162-169.
39. García, L. (2013). *Implementación de un método de conservación de cepas bacterianas* (Doctoral dissertation, tesis de titulación]. México: Universidad Nacional Autónoma de México).
40. González-Rojas, E. H. (2011). Concepto y estrategias de biorremediación. *INGE@ UAN-*

Tendencias en la Ingeniería, 1(2).

41. Granda Mora, K. (2010). *Caracterización e identificación de aislados de Rhizobium: comportamiento en genotipos de frijol común (Phaseolus vulgaris L.)* (Doctoral dissertation, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas).
42. Gutiérrez-Jiménez, J., Luna-Cazáres, L. M., Mendoza-Orozco, M. I., Díaz-Marina, J., Burguete-Gutiérrez, J. C., & Feliciano-Guzmán, J. M. (2015). Organización, mantenimiento y preservación de la Colección de Cultivos Bacterianos del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), México. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 35(2), 95-102.
43. Halden, R. U., Tepp, S. M., Halden, B. G., & Dwyer, D. F. (1999). Degradation of 3-phenoxybenzoic acid in soil by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* POB310 (pPOB) and two modified *Pseudomonas* strains. *Applied and environmental microbiology*, 65(8), 3354-3359.
44. Henao-Castro, A., González, N. C., Ch, E. M. A., & Santamaría, J. (2015). Bacterias autótrofas y heterótrofas asociadas a nieve marina lodosa en arrecifes con escorrentía continental. *Universitas Scientiarum*, 20(1), 9-16.
45. Jaramillo, G. E. E., Paba, G. M., & Ospino, M. C. (2010). Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en hábitats de ecosistemas costeros en la Bahía de Cartagena, Colombia. *Nova*, 8(13).
46. Kappelle, M. (2008). Diccionario de la Biodiversidad.
47. Karakashev, D., Batstone, D. J., & Angelidaki, I. (2005). Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors. *Applied and environmental microbiology*, 71(1), 331-338.
48. Labra-Cardón, D., Guerrero-Zúñiga, L. A., Rodríguez-Tovar, A. V., Montes-Villafán, S., Pérez-Jiménez, S., & Rodríguez-Dorantes, A. (2012). Respuesta de crecimiento y tolerancia a metales pesados de *Cyperus elegans* y *Echinochloa polystachya* inoculadas con una rizobacteria aislada de un suelo contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 28(1), 7-16.
49. Lasa, I., Del Pozo, J. L., Penadés, J. R., & Leiva, J. (2005, August). Biofilms bacterianos e infección. In *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* (Vol. 28, No. 2, pp. 163-175). Gobierno de Navarra. Departamento de Salud.
50. López-Jácome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., & Franco-Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en discapacidad*, 3(1), 10-18.

51. Lustosa, M. A., López, J. A., Freire, K. C. S., Padilha, F. F., Hernández-Macedo, M. L., & Cabrera-Padilla, R. Y. (2018). Petroleum hydrocarbon degradation by isolated mangrove bacteria. *Revista peruana de biología*, 25(4), 453-456.
52. Mello, J. M. M. D. (2007). Biodegradação dos compostos btex em um reator com biofilme.
53. Mellado, N. D. (2019). *Extracción de hidrocarburos aromáticos de corrientes de refinería con líquidos iónicos como disolventes. Determinación de los coeficientes de difusión, interacciones químicas y toxicidad* (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid).
54. Miller, J. M., Quinzin, M. C., Edwards, D. L., Eaton, D. A., Jensen, E. L., Russello, M. A., ... & Caccone, A. (2018). Genome-wide assessment of diversity and divergence among extant Galapagos giant tortoise species. *Journal of Heredity*, 109(6), 611-619.
55. Morales, M., Cruz, R., Romero, A., Hernández, S., & Le Borgne, S. Degradación de BTEX por un consorcio microbiano halófilo.
56. Morlett Chávez, J. A. (2009). *Análisis microbiológico y molecular de un consorcio y una cepa bacteriana presente en la biodegradación de los BTEX* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
57. Narváez-Flórez, S., L Gómez, M., & Martínez, M. M. (2008). Selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos aisladas a partir de sedimentos del caribe colombiano. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras-INVEMAR*, 37(1), 61-75.
58. Njobuenwu, D. O., Amadi, S. A., & Ukpaka, P. C. (2005). Dissolution rate of BTEX contaminants in water. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 83(6), 985-989.
59. Olguín, E. J., Hernández, M. E., & Sánchez-Galván, G. (2007). Contaminación de manglares por hidrocarburos y estrategias de biorremediación, fitorremediación y restauración. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 23(3), 139-154.
60. Osorio, E., & Mishell, S. (2021). Aislamiento, identificación y caracterización de microorganismos de interés industrial y ambiental para crear un cepario de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas (FICA) de la Universidad Internacional SEK.
61. Páez-Martínez, N., López-Rubalcava, C., & Cruz, S. L. (2003). Avances recientes en la investigación de los mecanismos celulares de acción de los disolventes de abuso. *Salud Mental*, 26(5), 43-50.
62. Pastor, G. P., & Otero, B. M. Diversidad bacteriana. Principales bacterias en patología humana.
63. Peinador, M. (1999). Las cianobacterias como indicadores de contaminación orgánica. *Revista de Biología Tropical*, 47(3), 381-391.
64. Pérez, M., & Mota, M. (2008). Morfología y estructura bacteriana. *Temas de bacteriología y*

virología médica.

65. Prenafeta-Boldú, F. X., Vervoort, J., Grotenhuis, J. T. C., & Van Groenestijn, J. W. (2002). Substrate interactions during the biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) hydrocarbons by the fungus *Cladophialophora* sp. strain T1. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 2660-2665.
66. Pucci, G. N., Acuña, A., Tonin, N., Tiedemann, M. C., & Pucci, O. H. (2010). Diversidad de bacterias cultivables con capacidad de degradar hidrocarburos de la playa de Caleta Córdova, Argentina. *Revista peruana de biología*, 17(2), 237-244.
67. Pullés, M. R. (2014). Microorganismos indicadores de la calidad del agua potable en Cuba. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 45(1), 25-36.
68. Ramírez Peña Herrera, V. E. (2012). Cuantificación de compuestos aromáticos (BTEX) en las emisiones gaseosas de fuentes móviles terrestres de gasolina en el Distrito Metropolitano de Quito.
69. Ramírez, O. M. A., Rivera, A. P. R., Marin, L. A., Rojano, B. A., Ruiz, O., & Gallo, S. A.
70. C. (2012). Biorremediación de un suelo con diésel mediante el uso de microorganismos autóctonos. *Gestión y ambiente*, 15(1), 27-39.
71. Rangel-García, M. D. L., Rodríguez-Martínez, J., Garza-García, Y., & Martínez-Hernández, J. L. (2010). Optimización de iones de hierro para la eliminación de pirocianina en la reacción de degradación de Tolueno, Benceno y Fenol por *Pseudomonas aeruginosa*. *Agrociencia*, 44(2), 235-247.
72. Raymundo, T., Montes-Fuentes, G., & Valenzuela, R. (2021). *Cookeina* colombiana (Sarcoscyphaceae, Ascomycota), una especie nueva del departamento Córdoba, Colombia. *Acta botánica mexicana*, (128).
73. Reyes-Reyes, M. A., Puentes-Cala, E. A., Casanova-Montes, E. L., López-Deluque, F., Panqueva-Álvarez, J. H., & Castillo-Villamizar, G. A. (2018). Inmovilización de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo crudo en matrices orgánicas naturales y sintéticas. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 34(4), 597-609.
74. Rodríguez, A. R. J., Corral, O. L., & Linares, L. F. Aislamiento de microorganismos termófilos con capacidad de degradar hidrocarburos.
75. Rodríguez, F., Díaz, T. E., Mackenzie, G. A., Guativa, L. E., & Afanador, C. (1996). Aislamiento, Patrón de Fermentación de Carbohidratos y Caracterización Morfológica de Bacterias Celulolíticas del Rumen de Bovinos Alimentados con Heno de Raigrás en Colombia. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 1(1), 23-28.

76. Segura, B. E. R., Mogollón, A. H., Zapata, A. O., Peña, E. G. V., Moran, P. P., & Madrid, J. O. (2016). Eficiencia de cepas bacterianas aisladas del manglar para biorremediar suelos contaminados con petróleo. *Química Viva*, 15(1), 20-30.
77. Silva, R. M. P., Pozo, M. I. C., de Oca, J. M. G. M., Rodríguez, A. Á., Viñas, M., & Moreno, D. C. (2008). Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 39(1), 044-051.
78. Silvana Álvaro, C. E., Martínez, M. A., & Arocena, L. A. (2014). Estudio comparativo del agregado de enmiendas orgánicas e inorgánicas en procesos de biorremediación de suelos no patagónicos contaminados con petróleo. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 80(4), 251-261.
79. Sosa, E. (2014). Los impactos ambientales de la explotación de hidrocarburos no convencionales. *Fundación Ambiente y Recursos Naturales FARN*, 66.
80. Stellman, J. M., Osinsky, D., & Markkanen, P. (2001). Guía de Productos Químicos. *OIT, Enciclopedia de la OIT. Madrid: OIT*.
81. Suarez Beltrán, R. M. (2013). Guía de métodos de biorremediación para la recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos.
82. Suárez Medellín, L. P. (2004). *Degradación de Tolueno y Xileno por bacterias nativas colombianas y detección de los genes toda y xylB* (Master's thesis, Maestría en Ciencias Biológicas).
83. Supo Quispe, L. A. (2020). Degradación del fenol en aguas residuales de baños químicos portátiles del sector construcción mediante *Pseudomonas aeruginosa*.
84. Tobares, L. (2003). Evolución histórica de la estructura molecular del benceno. *Problemas del Conocimiento en Ingeniería y Geología, I*, 130-147.
85. Torres Rodríguez, D. (2003). El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos.
86. Vallejo, V., Salgado, L., & Roldan, F. (2005). Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 7(2).
87. van Schie, P. M., & Young, L. Y. (2000). Biodegradation of phenol: mechanisms and applications. *Bioremediation Journal*, 4(1), 1-18.
88. Varela, G., & Grotiuz, G. (2006). Fisiología y metabolismo bacteriano. *Departamento de Bacteriología y virología, Instituto de Higiene. Universidad de Medicina de Montevideo*,

FEFMUR, Montevideo, Argentina, 43-57.

90. Woolrich Zavaleta, S. L. (2016). Caracterización de bacterias tolerantes a hidrocarburos aromáticos monocíclicos, BTX (benceno, tolueno y xilol) en la laguna de Mecoacan, Paraiso Tabasco, tesis licenciatura en biología
91. Zarate, M. A. G., García, M. E. A., Heuser, L. W. D., Canela, M. V., & Núñez, M. Q. (2015). Mapa cualitativo para el análisis de riesgo por BTEX por proximidad con gasolineras en la ciudad de Ensenada, Baja California, México. *Revista de Salud Ambiental*, 15(1), 4-12.

ANEXOS

Tabla 13. Descripción de las cepas.

CELDA: 02							
Clave	CB-T3/02			CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS COLONIALES			
Origen biológico	Suelo			FORMA	Irregular-ondulado		
Origen geográfico	Misantla viejo, Veracruz-Llave, México.			TRANSPARENCIA	Transparente		
Condiciones de crecimiento	24-35°C			BRILLO	Sin brillo		
Medio de cultivo:	Luria-Bertani; Métodos estándar.			COLOR	Beige		
Aislado por	Martha Domínguez Cruz, Instituto Tecnológico Superior de Misantla.			TEXTURA	Rugosa		
TOLERANCIA				DEGRADACIÓN			
Benceno	Tolueno	Nitrobenceno	Xileno	Benceno	Tolueno	Nitrobenceno	Xileno
++	++	-	++	+++	-	-	+++

CELDA: 03							
Clave	CB-T3/03			CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS COLONIALES			
Origen biológico	Suelo			FORMA	Irregular-ondulado		
Origen geográfico	Misantla viejo, Veracruz-Llave, México.			TRANSPARENCIA	Opaca		
Condiciones de crecimiento	24-35°C			BRILLO	Sin brillo		
Medio de cultivo:	Luria-Bertani; Métodos estándar.			COLOR	Vainilla		
Aislado por	Martha Domínguez Cruz, Instituto Tecnológico Superior de Misantla.			TEXTURA	Lisa		
TOLERANCIA				DEGRADACIÓN			
Benceno	Tolueno	Nitrobenceno	Xileno	Benceno	Tolueno	Nitrobenceno	Xileno
++	++	+	++	++	-	-	++

CELDA: 04							
Clave	CB-T3/04			CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS COLONIALES			
Origen biológico	Suelo			FORMA	Irregular-ondulado		
Origen geográfico	Misantla viejo, Veracruz-Llave, México.			TRANSPARENCIA	Opaca		
Condiciones de crecimiento	24-35°C			BRILLO	Sin brillo		
Medio de cultivo:	Luria-Bertani; Métodos estándar.			COLOR	Beige		
Aislado por	Martha Domínguez Cruz, Instituto Tecnológico Superior de Misantla.			TEXTURA	Rugosa		
TOLERANCIA				DEGRADACIÓN			
Benceno	Tolueno	Nitrobenceno	Xileno	Benceno	Tolueno	Nitrobenceno	Xileno
++	+	-	+	++	-	-	-

CELDA: 05							
Clave	CB-T3/05			CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS COLONIALES			
Origen biológico	Suelo			FORMA	Irregular-ondulado		
Origen geográfico	Misantla viejo, Veracruz-Llave, México.			TRANSPARENCIA	Transparente		
Condiciones de crecimiento	24-35°C			BRILLO	Sin brillo		
Medio de cultivo:	Luria-Bertani; Métodos estándar.			COLOR	Blanco hueso		
Aislado por	Martha Domínguez Cruz, Instituto Tecnológico Superior de Misantla.			TEXTURA	Rugosa		
TOLERANCIA				DEGRADACIÓN			
Benceno	Tolueno	Nitrobenceno	Xileno	Benceno	Tolueno	Nitrobenceno	Xileno
+++	+++	++	+++	-	++	-	++