

68  
201



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“OBTENCION E IDENTIFICACION DE UN CULTIVO MICROBIANO MIXTO QUE DEGRADA PETROLEO “MAYA”

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A  
P R E S E N T A :

**LEONOR ANGELICA GUERRERO ZUÑIGA**

DIRECTOR DE TESIS: Q.B.P. JUAN ANTONIO ZERMEÑO EGUIA LIS



**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**



FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

1997.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESSIS  
COMPLETA



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Obtención e identificación de un cultivo microbiano mixto que degrada petróleo "Maya"

realizado por la P. de B. Leonor Angélica Guerrero Zúñiga

con número de cuenta 8402594-4 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis	Q.B.P. Juan Antonio Zermeño Eguía Lís	<i>J.A. Zermeño</i>
Propietario	Dra. Susana Saval Bohórquez	<i>Susana Saval</i>
Propietario	Biol. Francisco Vélazquez Cruz	<i>F. Vélazquez</i>
Suplente	Biol. Francisco Reynaldo Miguel Gómez	<i>F. R. Miguel</i>
Suplente	Biol. José Gonzalo Ricardo Wong	<i>J. G. Ricardo</i>

FACULTAD DE CIENCIAS  
U.N.A.M.

Comité Departamental de Biología

M. en C. Alejandro Martínez Mena

DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biotecnología de la Subdirección de Protección Ambiental del Instituto Mexicano del Petróleo, bajo la dirección del Q.B.P. Juan Antonio Zermeño Erguía - Lis y el asesoramiento externo de la Dra. Susana Saval Bohórquez del Instituto de Ingeniería, UNAM. Este trabajo se desarrolló dentro del proyecto: FIES-95-108-VI, denominado "Biorremediación de suelos contaminados con petróleo".

---

A mí madre, a mis hermanos,  
que como fiel tribu de la hermandad,  
hicimos honor a lo que recibimos,  
sangre, nombre y lengua;  
a la leal de la perseverancia y del amor,  
Doña Leonor, y a su descendencia,  
que a pesar de sinuosidades y escollos,  
sigue con dignidad y con tesón por la vida.

A Enrique, mi hermano,  
que en su memoria encuentro  
a la serenidad y la reconciliación,  
a la nostalgia y al dolor;  
al fiel del clan y de la tribu filial,  
que con su inusitado espíritu de lucha,  
hizo esperar a la soberana muerte,  
en tanto se doblegaba la esperanza leve.

---

A la UNAM por permitirme el honor de ser universitaria.

A el Instituto Mexicano del Petróleo por darme la oportunidad de cumplir con esta meta.

A cada uno de los sinodales por sus críticas y observaciones tan acertadas.

A todo el personal del Area de Normatividad y Remediación Ambiental, por su ayuda y motivación para la realización de este trabajo.

Especialmente a el Ing. Carlos F. Valdés Olmedo, por su gran apoyo y comprensión.

A la Dra. Susana Saval Bohórquez, por su atención y aportaciones al trabajo.

---

**A todos mis amigos que por su invaluable empuje y cariño,  
hicieron realizable éste logro.**

---



## INDICE

	Pág.
Resumen .....	1
I. Introducción .....	2
II. Antecedentes .....	5
III. Hipótesis .....	8
IV. Objetivos .....	9
V. Metodología .....	10
V.1. Obtención del cultivo mixto de la columna de aclimatación .....	10
V.1.1. Observación microscópica del cultivo mixto .....	10
V.2. Aislamiento de cada grupo microbiano a partir del cultivo mixto en un medio de cultivo específico .....	10
V.2.1. Descripción de la morfología microscópica y colonial de cada una de las cepas aisladas .....	11
V.2.2. Procedimiento para la conservación del cultivo mixto .....	11
V.3. Identificación bioquímica de las diferentes cepas aisladas .....	13
V.4. Cinética de crecimiento microbiano en petróleo Maya .....	18
V.5. Determinación de la relación entre el valor absoluto de HTP y el peso en gramos del petróleo Maya .....	19
V.6. Evaluación de la capacidad de degradación del cultivo mixto, con la adición de un tensoactivo y la aplicación de un proceso físico de "sonicación" .....	20
V.7. Extracción y cuantificación de petróleo residual, mediante el Método 418.1 modificado .....	23
V.8. Análisis Estadístico .....	24
VI. Resultados .....	26
VI.1. Observación microscópica del cultivo mixto .....	26
VI.2. Aislamiento de los distintos grupos microbianos del cultivo mixto .....	26
VI.3. Identificación bioquímica de las diferentes cepas aisladas.....	28
VI.3.1. Descripción y clasificación taxonómica de los distintos especies identificadas .....	32
VI.4. Cinética de crecimiento microbiano preliminar en petróleo Maya .....	43
VI.5. Cuantificación de los HTP residuales, mediante el método 418.1 modificado. ....	44
VI.6. Análisis Estadístico .....	46
VII. Discusión .....	48
VIII. Conclusiones .....	50
IX. Referencias bibliográficas .....	51
Anexos .....	53

---

## RESUMEN

A partir de muestras de suelos contaminados con hidrocarburos, se obtuvo un Cultivo Microbiano Mixto constituido por distintas cepas de bacterias y levaduras, de las cuales cuatro son bacterias Gram-negativas, identificadas como: *Citrobacter diversus* (Braak) Werkman y Gillen 1932; *Serratia marcescens* Bizio, 1823; *Pseudomonas pseudomallei* (Zopf) Redfeare, Palleroni y Stainer, 1966; *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula, 1900; una del tipo Gram-positiva, *Brevibacterium sp* (Breed) Collins *et al.*, 1983; y dos levaduras: *Candida tropicalis* y *Candida sp.*

Dicho cultivo posee la capacidad de biodegradar petróleo Maya, utilizándolo como una principal fuente de carbono y energía.

La eficiencia de degradación se evaluó a nivel de matraz agitado durante un periodo de 28 días, mediante un diseño experimental en el que se contemplaron tres concentraciones de petróleo Maya (0.5, 1.0 y 2.0%), la adición de un tensoactivo de origen químico Biotrex y la aplicación de un proceso físico de sonicación, con la finalidad de mejorar el proceso de biodegradación al incrementar la emulsificación del petróleo en el medio líquido.

De los resultados de la evaluación se encontró que el cultivo mixto es capaz por sí solo de llevar a cabo la biodegradación a una concentración óptima de petróleo Maya del 1.0%, con un porcentaje de degradación del 35%.

## I. INTRODUCCION

Desde tiempos muy antiguos existen registros de afloramientos ó derrames naturales de crudo. En el Medio Oriente y América estos registros hablan de la existencia de pequeñas lagunas de petróleo crudo o "chapopote", como lo llamaron los nativos que poblaron lo que ahora es la República Mexicana y el Sur de los Estados Unidos de América (Geyer, 1979).

La cantidad estimada de hidrocarburos derramados en forma natural, es mucho mayor que la cantidad de éstos que permanecen en el medio ambiente, y es que la naturaleza ha podido controlar esta contaminación a través de mecanismos definidos de "autolimpieza". Por muchos años, los volúmenes de hidrocarburos que han ingresado al ambiente, se han eliminado, evitando su acumulación y efectos nocivos inherentes (Schwartz y Leathen, 1976; Miguet, 1973).

Algunos investigadores pioneros en los estudios de la microbiología del petróleo, detectaron la presencia de microorganismos con capacidad de metabolizarlos y desde entonces, se ha podido elucidar que estos microorganismos y su capacidad biodegradativa, juegan un papel principal dentro de los mecanismos de "autolimpieza" de lugares contaminados con hidrocarburos (Schwartz y Leathen, 1976; Shennan y Levi, 1974).

Además de la biodegradación, otros procesos como la evaporación, disolución y foto oxidación, serán los que ayuden a la naturaleza a eliminar los hidrocarburos contaminantes del ambiente. Sin embargo, el manejo de petróleo en cantidades cada vez mayores, ha traído desde aproximadamente 30 años, problemas cada vez mayores de contaminación por accidente en las maniobras de transporte o derrames accidentales (Bartha, 1977; IMP, 1979).

Como resultado, en algunas áreas donde se realizan actividades petroleras ya se ha excedido la capacidad de los mecanismos naturales de autolimpieza y por consiguiente, el crudo y sus derivados han comenzado a acumularse en reservorios naturales, causando problemas de contaminación e impactos negativos en el medio ambiente (Charter y Somerville, 1978; Sharpley y Kaplan, 1976; Connel, 1980).

La tendencia actual para acelerar los mecanismos naturales de autolimpieza así como la búsqueda de soluciones a problemas ambientales, se ha enfocado fundamentalmente hacia el aspecto microbiológico y las tendencias

específicas que tienden a favorecer la degradación biológica de los hidrocarburos. (IMP, 1983). Tal es el caso de la biorremediación la cual ha surgido recientemente como una

alternativa tecnológica para la limpieza de suelos y acuíferos contaminados. Esta puede ser aplicada exitosamente cuando los contaminantes son compuestos orgánicos, ya que son biodegradables, como es el caso de los hidrocarburos. La biorremediación no es algo nuevo, si no que es un proceso que se ha dado a lo largo de la vida del planeta, gracias a la actividad de los microorganismos que se encuentran en el suelo, los cuales se encargan de reciclar la materia y la energía. La biorremediación no viola la primera ley de la termodinámica, es decir que no destruye los contaminantes, los transforma en otros compuestos, por ejemplo en bióxido de carbono cuando hay una completa mineralización. Lo que si es deseable es que dicha transformación, ocurra hacia compuestos menos tóxicos (Saval, 1997).

Se puede afirmar que el campo de la investigación básica efectuada sobre las bases de los procesos de biorremediación ya está cubierto (Bartha, 1977) lo que deja una excelente alternativa para la aplicación de todos los conocimientos y experiencias acumuladas. Esta aplicación contempla tres áreas fundamentales:

- La modificación de las condiciones ambientales factibles de modificarse.
- La inoculación efectiva con cultivos mixtos o cultivos de un solo microorganismo.
- La modificación en el comportamiento del crudo contaminante haciéndolo más biodisponible.

En este marco, algunos investigadores se han dado a la búsqueda de microorganismos que al aplicarlos sobre algún derrame de crudo puedan limpiarlo eficientemente (Atlas, 1977; Bartha, 1977; Friello 1976).

Otros trabajan sobre el estudio de las implicaciones ecológicas que traerían consigo estas prácticas y otros más están dedicados a mejorar las técnicas existentes, desarrollando nuevos fertilizantes oleofílicos, buscando nuevos cultivos o bien, estudiando la manera de estimular la microflora autóctona de diversos ecosistemas contaminados con hidrocarburos (Anderson y Coats, 1994; Atlas, 1977).

Algunos estudios microbiológicos en este aspecto, indican un aumento del número de microorganismos con capacidad biodegradativa (principalmente bacterias y hongos), con máxima actividad en los primeros meses después del ingreso del crudo, cuando se nota una disminución importante de los hidrocarburos presentes. Así se considera que el proceso natural de biodegradación es efectivo, y al desarrollar inoculantes con microorganismos autóctonos, a la vez que modificar algunas condiciones ambientales, se estará en

condiciones de acelerar, en un momento dado, este proceso de biodegradación (IMP, 1983).

En México existen diversos sitios contaminados con petróleo los cuales se encuentran principalmente al norte del Estado de Tabasco y al sur del Estado de Veracruz, por lo que actualmente se realizan proyectos de investigación en el Instituto Mexicano del Petróleo trabajando en forma conjunta con otras Instituciones de Investigación. Uno de los objetivos de estos proyectos es el desarrollar las bases científicas y tecnológicas para generar tecnologías basadas en procesos de biorremediación aplicados en suelos contaminados con petróleo, ya que actualmente en México, no existe un proceso biológico que resulte eficiente para la descontaminación de suelos contaminados por hidrocarburos.

El presente estudio, pretende obtener y conservar un cultivo microbiano mixto, constituido por diferentes especies microbianas, con capacidad de biodegradar petróleo Maya después de una aclimatación sucesiva; lo que recae en la importancia que tiene la selección y aclimatación de cepas susceptibles de metabolizar sustancias difíciles de degradar como una parte importante de un proceso de biorremediación.

## II. ANTECEDENTES

En el ambiente natural, la biodegradación de hidrocarburos se efectúa con la intervención de diferentes poblaciones microbianas. Es conocido el efecto del crudo sobre algunos ambientes, en el sentido de que estimula el crecimiento y la diversidad de algunas poblaciones microbianas.

Dado que en el petróleo crudo hay una mezcla de cientos de substratos hidrocarbonados, es posible explicar que en los ambientes con un ingreso persistente de petróleo crudo, la población microbiana que utiliza hidrocarburos tenga una diversidad amplia bien establecida y forme parte de la microflora indígena de ese ambiente.

En realidad, el ambiente tropical que prevalece en las zonas petroleras de México, así como las chapopoterías (afloramientos naturales de crudo) desde hace miles de años, ha favorecido la presencia de una flora con capacidad biodegradativa bien establecida. Por lo que algunas investigaciones, actualmente están dirigidas hacia la estimulación de la biodegradación en suelo y en volúmenes limitados en agua dulce (IMP, 1983).

Si se muestrean este tipo de ambientes, es posible separar las poblaciones en cultivos mixtos, por enriquecimiento en un medio mineral con petróleo como única fuente de carbono y energía. El aislamiento de cultivos puros puede realizarse cuando se busca algún microorganismo que tenga alguna capacidad metabólica específica, sin embargo, conviene conservar los cultivos mixtos, activos, en las condiciones de laboratorio más semejantes a las ambientales; con la finalidad de producir masivamente los microorganismos hidrocarbonoclasticos propios de las zonas contaminadas, para que al aplicarlos nuevamente a su lugar de origen, lentamente con la modificación de los factores limitantes, contribuyan a la aceleración del proceso natural de biodegradación (IMP, 1983).

No obstante, en un intento por hacer más rápido y efectivo el proceso de biodegradación, ya existen se han desarrollado algunas metodologías sencillas y reproducibles, para que cualquier laboratorio de microbiología bien equipado, pueda aislar y reproducir masivamente los microorganismos autóctonos y adecuarlos para la inoculación en su propio ambiente. A la vez, se han determinado las condiciones que más favorecen la actividad microbiana, para reproducirlas "in situ" (IMP, 1983).

Keiji *et al.* en 1997, realizaron un aislamiento de un consorcio microbiano denominado SM8 para analizar la biodegradación de cuatro muestras de crudo (Arabian ligero, Dubai, Maya y Shenglei) en comparación con la bacteria *Acinetobacter sp*; encontrando que el grado de degradación está en función de los distintos compuestos del crudo y donde la fracción saturada es más susceptible a la biodegradación que la fracción aromática, en las cuatro muestras de crudo.

Chhatre *et al.* en 1996, con la finalidad de determinar el potencial de degradación de un consorcio microbiano con petróleo crudo Bombay pesado y del Golfo, realizaron un aislamiento de cinco bacterias, y encontraron que cuatro de ellas pudieron degradar el 70% del crudo, mientras que la quinta bacteria produjo un "biosurfactante", ramnolípido, que emulsificaba el crudo eficientemente permitiendo que se llevará a cabo efectivamente la degradación por los otros miembros del consorcio. El amplio rango de la capacidad hidrocarbonoclastica de estas bacterias seleccionadas del consorcio permitió llevar a cabo la degradación tanto de la fracción aromática como alifática del petróleo crudo, en un periodo de 72 días.

Igualmente, IMP en 1983, a partir del aislamiento de distintos cultivos mixtos los cuales fueron separados en sus cepas componentes, con el fin de caracterizarlos, encontraron distintas cepas de bacterias, levaduras y hongos filamentosos, a partir de muestras de la zona de Tampico. Los géneros encontrados fueron: *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Acinetobacter*.

En un proceso de biorremediación se involucran una serie de factores que determinan la actividad biológica de los microorganismos que participan en la degradación de los contaminantes en este caso de petróleo Maya. Estos factores que limitan la biodegradación de los hidrocarburos son principalmente: la disponibilidad de nutrientes (nitrógeno y fósforo) y la disponibilidad del sustrato (los hidrocarburos son insolubles en agua), además de la temperatura, pH y el oxígeno disponible.

La adición de tensoactivos (surfactantes) sintéticos ha resuelto satisfactoriamente el problema de la disponibilidad de los hidrocarburos incrementando la biodegradación de derivados del petróleo como es el caso del naftaleno con Tritón X-100 (Volkering *et al.*, 1995) o del pireno con Witcon SN 70 (Thibault y Anderson, 1996).

Por otra parte (Ronald, 1984) menciona que de algunas investigaciones realizadas con 24 surfactantes, solo 5 de ellos incrementaron el crecimiento de la levadura *Candida lipolytica*, mientras que los restantes fueron inhibitorios (especialmente los que contenían fenol). Sin embargo, el estudio se complica ya que *C. lipolytica* pudo utilizar algunos de los surfactantes, como el Tween, como sustrato de crecimiento.

Resultados preliminares sobre la aplicación del surfactante Biotrex, indican que en concentraciones de 2.5%, disuelve el 78% de petróleo Maya y en una concentración del 0.5% lo disuelve en un 28.15%, no resultando tóxico a ésta concentración (IMP, 1983).

El uso de surfactantes biológicos también ha producido resultados positivos, tal es el caso de la dispersión del octadeno con un ramnolípido producido por *Pseudomonas*, el cual tiene un potencial para facilitar la biorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos que tienen una limitada solubilidad con el agua (Chen y Taylor, 1995). En todos los casos el mecanismo ha sido desorber al contaminante de la fase sólida en la que se encuentra alojado.



### III. HIPOTESIS

En este proyecto se propone demostrar las siguientes hipótesis:

- El cultivo microbiano mixto originalmente aislado de suelos que se encuentran contaminados con hidrocarburos, tiene la capacidad de degradar a los hidrocarburos presentes en el petróleo Maya, utilizándolos como única fuente de carbono y energía.

- En la degradación del petróleo Maya por el cultivo mixto, la biodisponibilidad se puede favorecer, con la adición de un agente tensoactivo de origen químico, o bien con la aplicación de un proceso físico como es la "sonicación".

## **II. OBJETIVOS**

### **II.1. OBJETIVO GENERAL :**

Evaluar la capacidad de biodegradación de petróleo "Maya" por un cultivo microbiano mixto autóctono.

### **II.2. OBJETIVOS PARTICULARES:**

- Aislar un cultivo microbiano mixto, con capacidad de degradar petróleo Maya.
- Evaluar la eficiencia de biodegradación del petróleo Maya, por el cultivo microbiano mixto obtenido.
- Identificar las diferentes cepas pertenecientes al cultivo microbiano mixto.

### III. METODOLOGIA

#### **1. Obtención del cultivo mixto de la columna de aclimatación**

El inóculo con el cual se llevaron a cabo los ensayos, se aisló de suelos contaminados con petróleo y se propagó en el laboratorio, en una columna de vidrio empacada con piedra de tezontle con las siguientes características: dimensiones de 180 cm de alto por 0.8 cm de diámetro y la altura del empaque es de 140 cm, con un volumen de operación total de 900 ml. En la parte inferior de la columna se colocó un difusor de poro mediano para el suministro de aire.

Las condiciones de operación fueron las siguientes: La columna se mantuvo a temperatura ambiente, el pH se ajustó diariamente a 6.3, el aire se suministró de forma continua. Mientras que el medio de cultivo se recirculó de forma continua a través de una bomba peristáltica y se cambió cada 15 días, realizando observaciones diariamente al microscopio como control, con el fin de confirmar la presencia de los microorganismos.

La fuente de carbono fue el petróleo Maya, en una concentración del 1 % peso volumen.

#### **1.1. Observación microscópica del cultivo mixto**

Previo al aislamiento se realizó una observación microscópica, para reconocer los distintos tipos morfológicos de microorganismos existentes, en el cultivo mixto (bacterias, levaduras, hongos y actinomicetos). Aplicando una tinción de Gram (EPA, 1978), exclusivamente para el reconocimiento de las bacterias.

Este procedimiento se llevó a cabo 3 veces antes del recambio del medio de cultivo a la columna.

#### **2. Aislamiento de cada grupo microbiano a partir del cultivo mixto en un medio de cultivo específico**

Para confirmar la presencia de los distintos grupos microbianos que constituyentes del cultivo mixto, se realizó un aislamiento en placa por la técnica de estría cruzada (*Ver anexo 1*), en las condiciones descritas en el cuadro III.1., para cada uno de los grupos microbianos.

*Cuadro III.1.- Condiciones de aislamiento para los diferentes tipos morfológicos*

<b>GRUPO MICROBIANO</b>	<b>MEDIO DE CULTIVO</b>	<b>TEMPERATURA DE INCUBACION</b>	<b>TIEMPO DE INCUBACION</b>
HONGOS	Agar Dextrosa y Papa	28°C	24 hrs
LEVADURAS	Agar Extracto de Malta	30°C	24 hrs
ACTINOMICETOS	Medio mineral con agar específico para actinomicetos	37°C	24 hrs
BACTERIAS	Agar de Soya Tripticaseína	37°C	24 hrs

La composición y el método de preparación de cada uno de los medios empleados se describe en el *Anexo 1*.

### ***2.1 Descripción de la morfología microscópica y colonial de cada una de las cepas aisladas***

Una vez concluido el tiempo de incubación de las placas de agar correspondientes a cada grupo microbiano se realizó la descripción de la morfología colonial y microscópica, de cada una de las diferentes colonias observadas, con un microscopio electrónico Olympus, modelo BH-2. Para observar microscópicamente a los microorganismos se realizó una tinción de Gram.

Cada una de las distintas observaciones, fueron registradas fotográficamente, con una cámara adaptada a el mismo microscopio electrónico.

### ***2.2 Procedimiento para la conservación del cultivo mixto***

Una vez realizado el aislamiento de las diferentes cepas del cultivo mixto, se mantuvieron temporalmente en tubos de agar inclinado antes de su conservación de acuerdo con el grupo microbiano aislado.

A estos microorganismos se les conservó en viales a -82°C, en presencia de una solución amortiguadora. Por su alta viscosidad esta solución impide el daño físico a las bacterias y levaduras durante su conservación al generarse cristales de hielo, de tamaño reducido que no dañan la estructura celular, además de que contiene los elementos mínimos requeridos para la conservación de las

células de. La conservación en viales tiene como objeto preservar viable a los microorganismos por un largo tiempo y mantener así sus características, puesto que con las resiembras algunas de ellas pueden cambiar o perderse.

El procedimiento fue el siguiente:

1. Se preparó una solución amortiguadora o de conservación de microorganismos (*para su composición ver Anéxo 1*).
2. Se tomaron cinco ml del medio de conservación con una pipeta automática marca Oxford, para volúmenes macros de 5 a 10 ml con incrementos de 0.2 ml y reproducibilidad de  $\pm 0.5\%$ ; agregándose a cada tubo para en seguida resuspender totalmente la cepa.
3. Posteriormente se vaciaron en un vial, haciendo una mezcla de ellas.
4. Finalmente se selló el vial a presión y se le asignó un registro, guardándolo en una Ultracongeladora "Ultra - Low Freezer".

### 3. Identificación bioquímica de las diferentes cepas aisladas

Una de las metodologías para la identificación de un microorganismo se basa en la determinación de sus características metabólicas para ciertos sustratos, las cuales se identifican mediante la utilización de pruebas bioquímicas específicas.

Las pruebas bioquímicas son pruebas simples que están diseñadas para indicar en forma clara y precisa la presencia o ausencia de una enzima o grupo de ellas, así como de metabolitos específicos.

Con la finalidad de identificar cada una las cepas que constituyen al cultivo microbiano mixto, se utilizaron los siguientes equipos comerciales de identificación de pruebas bioquímicas, denominados *Sistema de Identificación API*, certificados por ISO 9002:

- **API Coryne**: para bacilos Gram-positivos.
- **API 20 E**: para Enterobacteriaceae y otros bacilos Gram-negativos.
- **API 20 Caux**: para levaduras.

El **API Coryne**, es un sistema de identificación en 24 horas de bacterias corineformes aisladas en clínica, mediante *tests* estandarizados y miniaturizados, unidos a una base de datos especialmente adaptada. Para realizar las pruebas se utilizó una galería compuesta por 20 microtubos que contenían sustratos deshidratados para el estudio de enzimas o la fermentación de azúcares. Los *tests* enzimáticos se inocularon con una suspensión densa para rehidratar los sustratos enzimáticos.

Las reacciones producidas durante el período de incubación se tradujo en cambios de coloración espontánea o revelados por la adición de reactivos. Los *tests* de fermentación de carbohidratos se inocularon con un medio enriquecido (conteniendo un indicador de pH) para rehidratar los sustratos azucarados. La fermentación de carbohidratos produjo una acidificación que se traduce en un viraje espontáneo del indicador coloreado.

Después de la incubación, 24 horas a 35-37°C, la lectura de las reacciones se realizó visualmente con la tabla de lectura con la ayuda del ATB Plus.

El **API 20 E**, es un sistema para la identificación de las Enterobacteriaceae y otros bacilos Gram-negativos, mediante 23 *tests* bioquímicos estandarizados y miniaturizados, y una base de datos. Para realizar estas pruebas se utilizó una galería que consta de 20 microtubos que contenían los sustratos deshidratados. Los *tests* se inocularon con una suspensión bacteriana para rehidratar los medios. Durante la incubación el metabolismo de la bacteria produjo cambios de color espontáneos o bien al añadir reactivos.

La lectura de las reacciones se hizo de acuerdo a el programa informático de identificación, de este sistema.

El **API 20 Caux**, es un sistema de identificación precisa de levaduras. Para realizar las pruebas de identificación se utilizó una galería compuesta por 20 cúpulas que contenían substratos deshidratados que permitieron efectuar 19 tests de asimilación. Las cúpulas fueron inoculadas con un medio semisólido donde sólo crecieron las levaduras que fueron capaces de utilizar el substrato correspondiente.

La lectura de estas reacciones se hizo por comparación con los controles de crecimiento.

En el *Anexo 2*, se encuentra los procedimientos de identificación bioquímica para cada grupo microbiano.

La secuencia para la identificación de los distintos microorganismos (bacterias: Gram-positivas y Gram-negativas así como levaduras), se encuentran resumidas en las Figuras: II.1., II.2. y II.3.

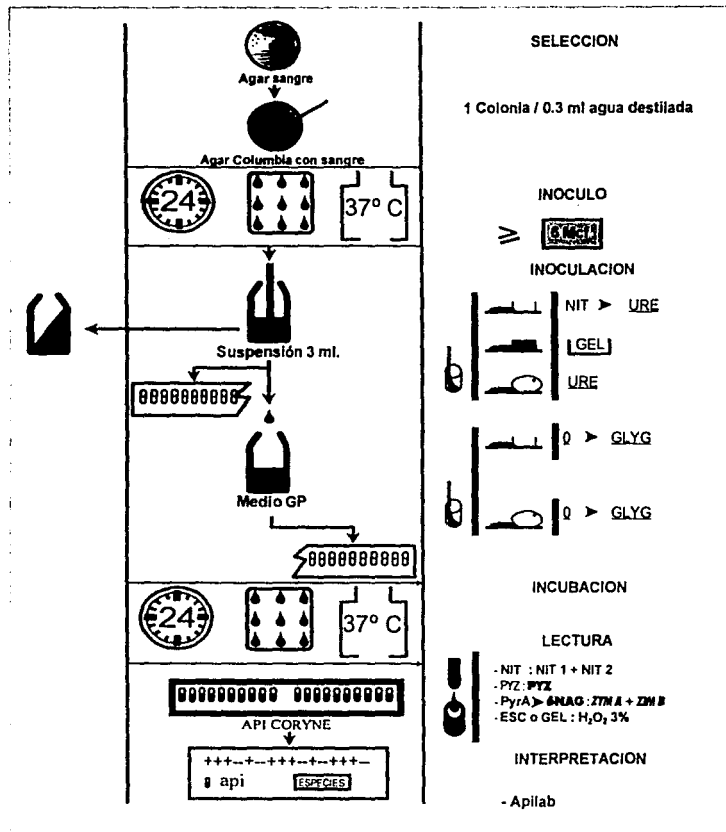


Fig. II.1 Diagrama de secuencia de las pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias Gram- positivo.



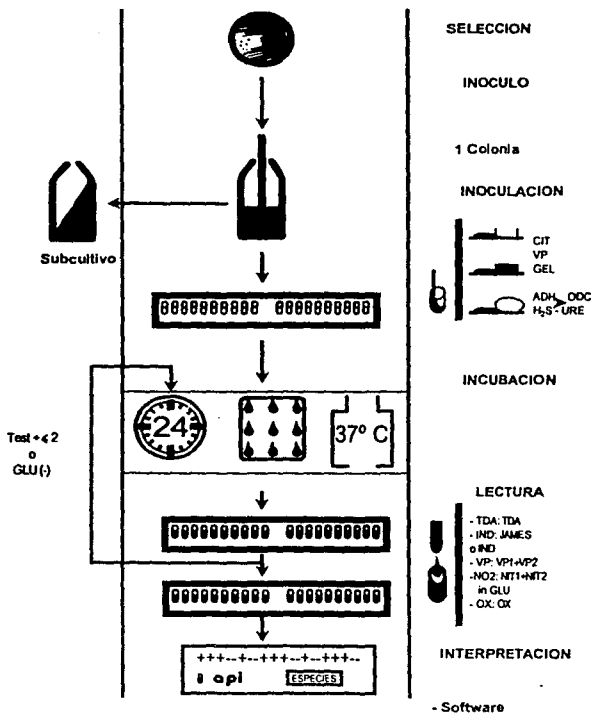


Fig. II.2. Diagrama de secuencia de las pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias Gram-negativo

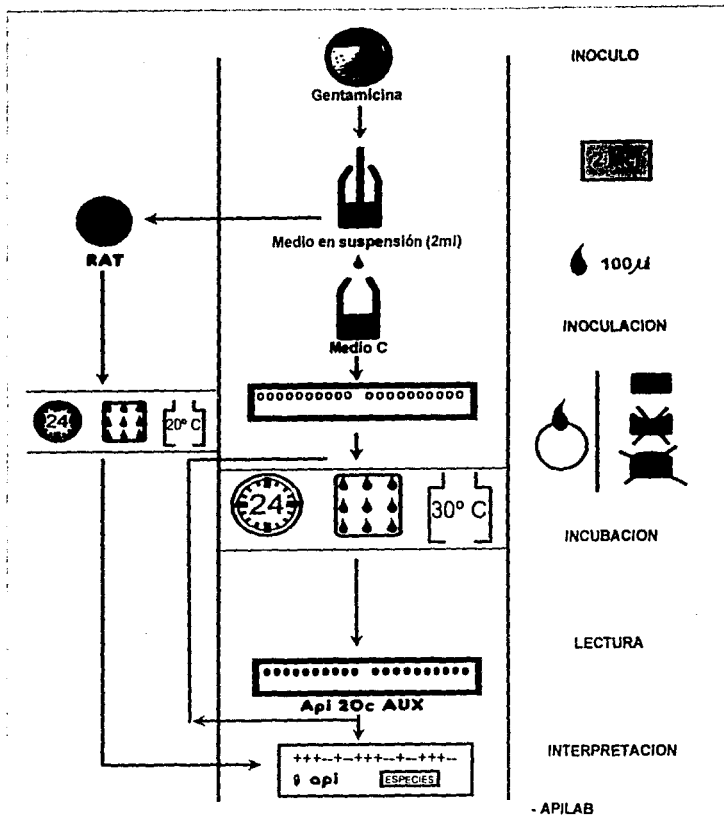


Fig. 11.3 Diagrama de secuencia de las pruebas bioquímicas para la identificación de levaduras .

#### **4. Cinética preliminar de crecimiento microbiano en petróleo Maya**

Con el propósito de observar el comportamiento del cultivo microbiano mixto, y poder establecer las condiciones del sistema como son: concentración del inóculo, temperatura y agitación, se realizó una cinética preliminar de crecimiento microbiano a nivel de matraz mediante el siguiente procedimiento:

1. Se tomó una alícuota de 20 ml del inóculo de la columna que contenía el cultivo microbiano mixto y petróleo Maya como fuente de carbono.
2. Posteriormente se centrifugó a una velocidad de 25000 r.p.m., durante 15 minutos con una centrifuga modelo APIVD, ASMED, después se desechó el sobrenadante y se lavó el paquete celular con solución salina (NaCl al 0.85%) y se centrifugó nuevamente. Después el inóculo fue ajustado a una densidad óptica de 0.2 de absorbancia a 660 nm, con un espectrofotómetro modelo Spectronic 20D, Milton Roy.
3. Se prepararon tres series de matraces con deflectores de 250 ml, con 100 ml de medio de cultivo Lebac (IMP, 1983) y con 0.1 g de petróleo Maya, agregándole el 10% de inóculo más el surfactante (Biotrex) en una concentración del 0.5%.
4. Entonces se incubó en agitación constante a 100 r.p.m. a una temperatura de 30° C, durante un periodo de 216 horas.
5. Finalmente los matraces se sacaron de la agitadora cada 24 horas, para evaluar el crecimiento de la población mediante el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC/ml), utilizando la técnica de vaciado en placa (*Ver Anexo 1*).

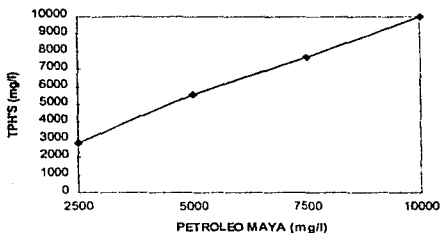
Los resultados de esta cinética nos permitió establecer las condiciones en las cuales se llevaría a cabo la evaluación de la capacidad de degradación del cultivo en petróleo Maya.

### 5. Determinación de la relación entre el valor absoluto de HTP y el peso en gramos del petróleo Maya

La metodología propuesta en el presente trabajo para evaluar la degradación del petróleo Maya, fue mediante la cuantificación de HTP por el Método 418.1 (IMP QA 619) en el laboratorio Espectrofotometrías del IMP. De tal manera que para conocer la relación entre los HTP y los gramos de petróleo Maya, se envió a analizar una serie de muestras que se tomaron como referencia, cuya cantidad de crudo Maya fue de: 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 gr.

Una vez obtenidos los resultados de los valores de HTP correspondientes a cada una de las muestras, cuya cantidad de petróleo Maya fue de: 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 g., se encontró el equivalente del valor absoluto de HTP a un gramo de petróleo maya, como se representa en la Gráfica III.1.

Gráfica III. 1. Relación entre los valores absolutos de HTP y los gramos de petróleo Maya



HTP (mg/l)	CRUDO (mg/l)
2.788	2.500
5.554	5.000
7.728	7.500
9.998	10.000

El coeficiente de correlación encontrado de los datos anteriores fue de: 0.9985, lo cual muestran la confiabilidad entre ambos datos.

## **6. Evaluación de la capacidad de degradación del cultivo mixto, con la adición de un tensoactivo y la aplicación de un proceso físico de "sonicación"**

Para evaluar la capacidad de degradación del cultivo microbiano mixto obtenido a partir de la selección de las cepas degradadoras, se propuso un diseño experimental el cual contempla el desarrollo de tres tratamientos y un control, con sus respectivos blancos.

Un paso importante para llevar a cabo la degradación del petróleo es que éste se encuentre emulsificado, con el fin de que sea transportado más fácilmente al interior de las células para su posterior biodegradación.

En el presente trabajo, la emulsificación del petróleo se realizó en dos formas, una mediante la adición de un tensoactivo de naturaleza química (Biotrex) en una concentración del 0.5%, y la otra por "sonicación", con la finalidad de mejorar la biodisponibilidad.

El sistema utilizado en el diseño experimental, fueron matraces Erlenmeyer de 250 ml con un volumen de 100 ml de medio de cultivo en agitación (150 r.p.m.) con una agitadora New Brunswick Scientific, modelo G-53, durante un tiempo de incubación de 28 días, dentro de un cuarto oscuro a una temperatura de 30°C.

El inóculo del cultivo mixto para el sistema antes mencionado se preparó de acuerdo a el siguiente procedimiento:

1. De cada tubo inclinado el cual contenía cada una de las cepas, se preparó una suspensión con solución salina.
2. Posteriormente se mezclaron en un solo recipiente todas las suspensiones.
3. Finalmente se ajustó la suspensión total a una absorbancia de 660 nm y mediante el conteo directo de microorganismos en una cámara de Petroff-Hausser y en placa mediante la técnica de vaciado en placa.
4. La concentración final de microorganismos en el sistema fue entre:  $1E+07$  y  $1E+09$  UFC/ml.

La evaluación de la capacidad de degradación del Cultivo Mixto se realizó de acuerdo al diseño experimental, representado en el cuadro III.2.

**Cuadro III.2.- Diseño experimental de la evaluación de la capacidad degradadora del cultivo microbiano mixto, con la adición de un tensoactivo y la aplicación de un proceso físico de sonicación**

Conc. de Petróleo Maya en %	Control Tensoactivo(-) Sonicación (-)	Tratamiento A Tensoactivo(+) Sonicación (-)	Tratamiento B Tensoactivo(-) Sonicación (+)	Tratamiento C Tensoactivo(+) Sonicación (+)
<i>a</i> (0.5%)	Ctrl <i>a</i>	A <i>a</i>	B <i>a</i>	C <i>a</i>
<i>b</i> (1%)	Ctrl <i>b</i>	A <i>b</i>	B <i>b</i>	C <i>b</i>
<i>c</i> (2%)	Ctrl <i>c</i>	A <i>c</i>	B <i>c</i>	C <i>c</i>

La descripción de cada uno de los tratamientos del diseño experimental es la siguiente:

- **Control** : Se prepararon tres series de matraces con 100 ml de medio de cultivo IMP Lebac, y se les agregó petróleo Maya en una concentración del: 0.5, 1 y 2% respectivamente, más 2.1 ml de inóculo.
- **Tratamiento A** : Se prepararon tres matraces, con 100 ml de medio de cultivo IMP Lebac, y petróleo Maya en concentraciones similares al tratamiento anterior, más 2.2 ml de inóculo y se le agregó el tensoactivo (Biotrex) en una concentración del 0.5%.
- **Tratamiento B** : Se prepararon tres series de matraces, con 100 ml de medio de cultivo IMP Lebac y petróleo Maya en concentraciones similares al tratamiento anterior, más 2.4 ml de inóculo. Cada matraz fue sometido a "sonicación" durante de 30 minutos.
- **Tratamiento C** : Se prepararon tres series de matraces, con 100 ml de medio de cultivo IMP Lebac más petróleo Maya en concentraciones similares a el

tratamiento anterior, con 2.3 ml de inóculo. Igualmente cada matraz fue sometido a "sonicación" durante 30 minutos y se le adicionó el tensoactivo Biotrex en la misma concentración.

Para cada tratamiento y concentración se corrió un blanco el cual no contenía microorganismos.

El volumen de inóculo para cada tratamiento se ajustó previamente, con la finalidad de obtener una concentración de  $5.5 \times 10^9$  UFC/ml, la cual se obtuvo durante la cinética de crecimiento microbiano.

Todos los tratamientos se incubaron en agitación constante (100 r.p.m.), a temperatura ambiente durante 28 días.

## **7. Extracción y cuantificación del petróleo residual, mediante el método 418.1 modificado**

La extracción del petróleo residual se llevó a cabo una vez cumplidos los 28 días del periodo de incubación de cada una de los matraces correspondientes a cada tratamiento.

A continuación se describe la técnica empleada para la extracción del petróleo (Odu, 1977), la cual fue modificada con el propósito de obtener mejores resultados:

1. El contenido de cada matraz se agregó a un embudo de separación, con el fin de separar la fase acuosa de la orgánica.
2. Posteriormente se adicionaron al embudo 40 ml de diclorometano, del cual se tomó una pequeña porción para disolver el petróleo adherido a las paredes del matraz, siendo este devuelto al mismo embudo.
3. Se agitó fuertemente, y se dejó reposar durante 12 horas aproximadamente, hasta observar que se rompiera la emulsión formada entre el solvente y la fase acuosa.
4. En un matraz redondo de fondo plano de boca esmerilada, se recibió una primera fracción orgánica a través de un embudo el cual contenía fibra de vidrio y un gramo de sulfato de sodio anhidro, esto con la finalidad de absorber el exceso de humedad de la muestra.
5. Nuevamente se agregó diclorometano al embudo de separación, para poder extraer por completo todo el petróleo agitando nuevamente y dejando reposar de 30 a 60 minutos recibiendo en el mismo matraz la segunda fracción orgánica y desechando la fase acuosa.
6. El diclorometano se eliminó por evaporación utilizando un evaporador rotatorio, Verdampfer VV1.
7. El petróleo concentrado en el matraz se resuspendió y aforó a 50 ml con tetracloruro de carbono.
8. Dicho volumen se vació a un frasco de vidrio color ámbar lavado previamente con mezcla crómica, sellado perfectamente y etiquetado.
9. Finalmente cada una de las muestras se enviaron a analizar al Laboratorio de Espectrofotometrías del IMP, con el propósito de cuantificar la biodegradación del petróleo Maya mediante el método IMP-QA619 (Método 418.1 modificado).



## 8. Análisis Estadístico.

Para este experimento el tratamiento estadístico se realizó mediante el método de *análisis de varianza bifactorial (ANOVA)*, con el paquete estadístico SAS versión 6.02 y el Statgraphics versión 5.

Para probar el efecto de los distintos tratamientos en la degradación de HTP, empleando distintas concentraciones de petróleo Maya, se propuso un diseño experimental con 2 factores de 4 y 3 niveles respectivamente y todas las interacciones posibles.

Los factores y sus respectivos niveles fueron los siguientes:

- **TRATAMIENTO :**

- **Control:** sin tensoactivo ni sonicación
- **A:** con tensoactivo sin sonicación
- **B:** con sonicación sin tensoactivo
- **C:** con tensoactivo y sonicación.

- **CONCENTRACION :** petróleo Maya a 0.5%, 1.0% y 2.0%.

La **variable de respuesta** fue: La fracción de HTP degradada.

La fracción se calculó como el resultado del cociente de los valores de HTP, correspondientes a la diferencia del blanco y la concentración final obtenida para cada uno de los matraces entre el valor del blanco respectivo, es decir:

$$\text{Fracción de HTP degradada: } \frac{\text{ppm del blanco} - \text{ppm de cada matraz}}{\text{ppm del blanco}}$$

Con estos resultados se realizó el análisis estadístico.

Bajo el diseño planteado para este experimento, se plantearon las siguientes hipótesis:

**Hipótesis nula ( $H_0$ ):** No existe diferencia significativa entre los factores planteados con respecto a la fracción de HTP degradada.

**Hipótesis alterna ( $H_a$ ):** Si existe diferencia significativa entre los factores planteados con respecto a la fracción de HTP degradada.

**Nota:** Se considera que se rechazará la hipótesis nula a un nivel de significancia estadística de  $P < 0.05$ .

## VI. RESULTADOS

### **1. Obtención del cultivo microbiano mixto**

#### **1.1. Observación microscópica del cultivo mixto mediante tinción de Gram**

Se observó en el cultivo mixto, la presencia abundante de bacterias Gram-negativo y en menor proporción bacterias Gram-positivo y levaduras.

No se observó la presencia de estructuras relacionadas con hongos, como fragmentos de hifas, ni de esporas.

#### **2. Aislamiento de los distintos grupos microbianos del cultivo mixto.**

En total se aislaron 7 cepas de las cuales 2 son levaduras y 4 correspondientes a bacterias Gram-negativo predominando en forma de bacilos y bacilos cortos, y 1 tipo de bacilos Gram-positivo.

A continuación en el cuadro VI.1, se describe la morfología colonial y microscópica de las siete cepas aisladas, las cuales conforman el cultivo mixto.

**Cuadro VI.1. Morfología colonial y microscópica de cepas aisladas en agar TSA y YM**

CLAVE DE LA CEPA	MORFOLOGIA COLONIAL	MORFOLOGIA MICROSCOPICA
T-I	Forma circular. Bordes regulares. Elevación abovedada. Luz transmitida opaca. Apariencia húmeda. Color blanca. Consistencia cremosa.	Bacilos largos, rectos y curvos, en cadenas. Gram-positivo
T-II	Forma circular. Bordes regulares. Elevación abovedada. Luz transmitida translúcida. Apariencia húmeda. Color blanca. Consistencia cremosa.	Cocos y bacilos rectos en cúmulos. Gram-negativo
T-III	Forma circular. Bordes regulares. Elevación convexa baja. Luz transmitida opaca. Apariencia húmeda. Color: rojo. Consistencia cremosa.	Cocos en cúmulos y cadenas. Gram negativo
T-IV	Forma circular. Bordes regulares. Elevación abovedada. Luz transmitida opaca. Apariencia húmeda. Color beige. Consistencia cremosa.	Bacilos largos y cortos, rectos y ligeramente curvados en cúmulos. Gram negativo
T-V	Forma circular. Bordes irregulares. Elevación convexa baja. Luz transmitida opaca. Apariencia húmeda. Color café. Consistencia cremosa.	Bacilos largos, rectos en cadenas. Gram negativo
A	Forma circular. Bordes regulares. Superficie rugosa. Luz transmitida opaca. Color blanca.	Levaduras
B	Forma elíptica. Bordes regulares. Superficie rugosa. Luz transmitida opaca. Color blanca.	Levaduras con pseudohifas

### **3. Identificación Bioquímica de las diferentes cepas aisladas**

La identificación de los microorganismos se realizó mediante la base de datos electrónica de cada uno de los sistemas de identificación API, esto es haciendo una comparación por medio de una computadora, entre el perfil numérico que se obtiene a partir del conjunto de reacciones positivas y la base de datos antes mencionada.

Las pruebas bioquímicas que ayudaron a la identificación de los distintos microorganismos aislados, de acuerdo al *Sistema de Identificación API* se encuentran resumidos en las tablas VI.1, VI.2 y VI.3., para las bacterias Gram-positivo, Gram-negativo y levaduras respectivamente.

Tabla VI.1. Resultados de las pruebas bioquímicas que ayudaron a la identificación de la bacteria Gram-positivo, T-1

REACCIONES	RESULTADOS CEPA T-1	SUMA
Reducción de nitratos	-	0
Pirazinamidasa	-	
Pirrolidoniil Arilamidasa	-	
Fosfatasa Alcalina	-	0
beta glucuronidasa	-	
beta glucosidasa	-	
alfa glucosidasa	+	1
N-acetil-β Glucosaminidasa	-	
Esculina (β glucosidasa)	-	
Ureasa	-	0
Gelatina (hidrólisis)	-	
Control (fermentación)	-	
Glucosa	-	0
Ribosa	-	
Xilosa	-	
Manitol	-	0
Maltosa	-	
Lactosa	-	
Sacarosa	-	4
Glicogeno	-	
Catalasa	+	

Con base en los resultados obtenidos a partir de las pruebas bioquímicas, la cepa T-1 corresponde presuntivamente al género: *Brevibacterium* sp. (Breed) Collins *et al.*, 1983.

Tabla VI.2. Resultados de las pruebas bioquímicas que ayudaron a la identificación de las bacterias Gram-negativo: T-II, T-III, T-IV y T-V

SUBSTRATO	RESULTADO CEPA T-II	SUMA	RESULTADO CEPA T-III	SUMA	RESULTADO CEPA T-IV	SUMA	RESULTADO CEPA T-V	SUMA
Ornitofenogalactosido	+		+		-		-	
Arginina	+	3	-	5	+	2	+	2
Lisina	-		+		-		-	
Ornitina	+		+		-		-	
Citrato sódico	-	1	+	3	+	2	+	2
Tiosulfato sódico	-		-		-		-	
Urea	-		-		-		-	
Triptófano	-	4	-	6	-	0	-	0
Triptófano	+		-		-		-	
Piruvato sódico	-		+		+		-	
Gelatina de Kohn	-	4	+	6	-	5	+	2
Glucosa	+		+		+		-	
Manitol	+		+		-		-	
Inositol	-	5	+	7	-	4	-	0
Sorbitol	+		+		+		-	
Ramnosa	+		-		-		-	
Sacarosa	+	7	+	6	+	2	-	0
Melibiosa	+		+		-		-	
Amigdalina	+		+		-		-	
Arabinosa	+	3	-	1	-	4	-	4
Citocromo oxidasa	-		-		+		+	

En el Anexo 2 se encuentra la tabla de lecturas donde se mencionan el tipo de enzima correspondiente a cada sustrato.

Los resultados de la identificación correspondiente a cada cepa son:

Cepa T-II: corresponde a *Citrobacter diversus* (Braak) Werkman y Gillen, 1932.

Cepa T-III: corresponde a *Serratia marcescens* Bizio, 1823.

Cepa T-IV: corresponde a *Pseudomonas pseudomallei* (Zopf) Redfearn, Palleroni y Stainer, 1966.

Cepa T-V: corresponde a *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula, 1900.

Tabla VI.3. Resultados de las pruebas bioquímicas que ayudaron a la identificación de las levaduras: A y B

PRUEBA	LEV. A REAC. 24 H	LEV. A REAC. 48 H	SUMA	LEV. B REAC. 24 H	SUMA
O	-	-		-	
Glucosa	-	+	6	+	2
Glicerol	-	+		-	
2 keto-D- gluconato	-	-		+	
L-arabinosa	-	-	0	-	5
D-xilosa	-	-		+	
Adonitol	-	-		-	
Xilitol	-	-	0	-	4
Galaactosa	-	-		+	
Inositol	-	-		-	
Sorbitol	+	-	0	+	6
$\alpha$ -metil D- glucosamina	-	-		+	
N-acetil-D- glucosamina	-	+		+	
Celobiosa	-	-	1	-	1
Lactosa	-	-		-	
Maltosa	-	-		+	
Sacarosa	-	-	0	+	7
Trehalosa	-	-		+	
Melezitosa	-	-		+	
Rafinosa	-	-	0	-	1

Los resultados de la identificación correspondiente a cada levadura son:

Cepa **A**: corresponde a *Candida tropicalis*

Cepa **B**: corresponde a *Candida sp.*



### 3.1. Descripción y clasificación taxonómica de los distintas especies identificadas

A continuación se presenta la clasificación taxonómica, según (Manual Bergey's, 1994), de los distintos géneros de bacterias identificados. Así como una breve descripción de las características más importantes de cada uno de ellos.

**Reino:** Procariotae  
**División II:** Bacteria  
**Grupo 20:** Bacilos irregulares no esporulantes Gram-positivo  
**Familia:** Brevibacteriaceae  
**Género:** *Brevibacterium*

Las células en cultivos jóvenes crecen como bacilos irregulares, miden de 0.6-1.2 x 1.5-6  $\mu\text{m}$ , arreglados solos o en pares y frecuentemente angulados para crear formas de "V". Pueden ramificarse, pero sin formar un micelio. En cultivos viejos, los bacilos se segmentan como pequeños cocos. Son Gram-positivos pero fácilmente decolorizados. No son móviles, no esporulantes, no producen ácidos grasos. Son aerobios estrictos; muestran colonias amarillo-anaranjadas o pigmentos púrpuras. Son quimioorganotróficos, con metabolismo respiratorio. Poco o nada de ácido es producido por glucosa u otros carbohidratos. Tiene una respuesta positiva a la catalasa, la gelatina y caseína son usualmente hidrolizados, frecuentemente producen metanetiól de la L-metionina. La temperatura óptima bajo la que crecen es entre 20-35°C. Están ampliamente distribuidos por ejemplo en productos lácteos, o encontrados en la piel del humano.

Con base a la identificación realizada, *Brevibacterium sp.* presentó las siguientes características: Colonia blanca de consistencia cremosa opaca, con crecimiento de bacilos largos, rectos y curvos, arreglados angularmente en pares formando cadenas y "V". Gram-positivo. No son móviles. Con respuesta positiva a la  $\alpha$ -glucosa y a la catalasa. Temperatura óptima a la que crecieron 37°C (Ver figuras: VI.1 y VI.2).

**Reino:** Procariotae  
**División II:** Bacteria  
**Grupo 5:** Bacilos facultativos anaeróbicos Gram-negativos.  
**Subgrupo 1:** Familia: Enterobacteriaceae  
**Género:** *Citrobacter*

Bacilos rectos que miden aproximadamente 1 $\mu\text{m}$  de diámetro y 2-6 $\mu\text{m}$  de longitud. Crecen solos o en pares. Son Gram-negativo. Usualmente tienen movilidad por flagelos peritricos. Son anaerobios facultativos

quimioorganotróficos, tienen ambos metabolismos por respiración y fermentación. La temperatura óptima a la que crecen es 37°C. La D-glucosa y otros carbohidratos son catabolizados con la producción de ácido y gas. Respuesta a la oxidasa: negativa, a la catalasa: positiva, al metil rojo: positiva, usualmente a al citrato: positiva, al Voges-Proskauer: negativa y a la lisina descarboxilasa: negativa. Reducen nitratos. Usualmente fermentan carbohidratos incluyendo L-arabinosa, celobiosa, glicerol maltosa y D-xilosa: Se desarrollan en las heces fecales de humanos y animales, probablemente como habitantes internos de los intestino. Frecuentemente se aíslan de especies clínicas como patógenos oportunistas también pueden encontrarse en el suelo, agua, alimentos y aguas residuales.

Con base en la identificación de *Citrobacter diversus*, esta presentó las siguientes características: Colonia de forma circular, blanca, translúcida de consistencia cremosa. Coco-bacilos rectos, arreglados en cúmulos, solos o en pares. Gram-negativo. No se les registró movimiento. Con respuesta positiva a:  $\beta$ -galactosidasa, glucosa, lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa, triptófano desaminasa, manitol, sorbitol, ramnosa, sacarosa, melibiosa, amigdalina y arabinosa. Temperatura óptima de crecimiento 37°C (Ver figuras: VI.3 y VI.4).

**Reino:** Procariotae  
**División II:** Bacteria  
**Grupo 4:** Bacilos anaeróbicos facultativos Gram-negativo  
**Subgrupo 4A:** Familia: Enterobacteriaceae  
**Género:** *Serratia*

Bacilos rectos, miden de 0.5-0.8 $\mu$ m de diámetro y 0.9-2.0 $\mu$ m de longitud. Son Gram-negativo. Presentan movilidad por flagelos peritricos. Son anaerobios facultativos quimioorganotróficos, tienen ambos metabolismos por respiración y fermentación. Crecen a una temperatura entre 30-37°C. La D-glucosa y otros carbohidratos son catabolizados con la producción de ácido y frecuentemente con gas. Presentan una respuesta a el Indol negativa, a la prueba de Simmons positiva; a la de Voges-Proskauer, usualmente es positiva. La mayoría de las especies tienen una respuesta positiva a la lisina descarboxilasa y a la ornitina descarboxilasa. No producen H<sub>2</sub>S; no hidrolizan urea. La gelatina es generalmente hidrolizada. La mayoría produce fuertemente D-nasa e hidroliza granos de aceite.

Reduce nitratos. Fermentan carbohidratos por todas o la mayoría de las rutas incluyendo maltosa, D-manitol, D-manosa, salicina sucrosa incluyendo trealosa. Se desarrollan en algunos humanos, en suelo, en la superficie de las plantas y en otros sitios ambientales y en el tracto digestivo de roedores e insectos. *Serratia marcescens* es un patógeno prominentemente oportunista en hospitales, causando septicemia e infecciones en las vías urinarias.

Con base en la identificación de *Serratia marcescens*, esta presentó las siguientes características: Colonia de forma circular, roja, opaca de consistencia cremosa. Coco-bacilos con arreglo en cadena. Gram-negativo. No se les registró movimiento. Temperatura óptima de crecimiento 37°C. Respuesta positiva a:  $\beta$ -galactosidasa, glucosa, sacarosa, melibiosa, amigdalina, lisina, ornitina, citrato sódico, producción de acetoina, gelatinasa, manitol, inositol, sorbitol (Ver figuras: VI.5 y VI.6).

**Reino:** Procariotae  
**División II:** Bacteria  
**Grupo 4:** Bacilos y Cocos microaerofílicos aeróbicos Gram-negativo  
**Subgrupo 4A:** Familia: Pseudomonadaceae  
**Género:** *Pseudomonas*

Bacilos rectos o ligeramente curvados, no helicoidales, miden aproximadamente 0.5-1.0 x 1.5-5.0  $\mu\text{m}$ . Algunas especies acumulan poli- $\beta$ -hidroxibutirano o carbono como material de reserva, aparentemente como inclusiones sudanofílicas. Ellos no producen prosteca y no están rodeados por una envoltura. Sus células tiñen Gram-negativo. Presentan movimiento por uno o varios flagelos localizados en la parte polar; raramente son inmóviles. En algunas especies también se pueden formar flagelos laterales de longitud corta. Tienen respiración aeróbica estricta típica de su metabolismo con oxígeno con un electrón aceptor en la terminal; en algunos el nitrato puede ser usado como un aceptor alternativo de electrones, permitiendo que ocurra el crecimiento anaeróbico. La mayoría de las especies requieren de compuestos orgánicos para su crecimiento. Tienen una respuesta positiva o negativa a la oxidasa, positiva a la catalasa y son quimioorganotróficos; algunas especies son quimiolitotróficos facultativos, son capaces de usar  $\text{H}_2$  o CO como fuente de energía. Están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Algunas especies son patógenas de los humanos, animales y plantas.

Con base en la identificación de *Pseudomonas pseudomallei*, ésta presentó las siguientes características: Colonia de forma circular, beige, opaca de consistencia cremosa. Bacilos largos y cortos, rectos y ligeramente curvados, arreglados en cúmulos. Gram-negativo. No se les registró movimiento. Con respuesta positiva a: arginina, citrato sódico, producción de acetoina, glucosa, sacarosa, sorbitol y citocromo oxidasa. Temperatura óptima a la que crecieron 37°C (Ver figuras: VI.7 y VI.8).

*Pseudomonas aeruginosa*, presentó las siguientes características: Colonia de forma circular, café, opaca de consistencia cremosa. Bacilos largos y rectos. Gram-negativo. No se les registró movimiento. Con respuesta positiva a: arginina, citrato sódico, gelatinasa al citocromo oxidasa. Temperatura óptima a la que crecieron 37°C (Ver figuras: VI.9 y VI.10).

A continuación se presenta la clasificación correspondiente a los géneros de levaduras identificadas, según Margulis, 1980.

**Reino: Monera**  
**Phylum: Ascomycetos**  
**Clase: Hemiascomicetes**  
**Género: Candida**

***Candida tropicalis***, presentó las siguientes características: Colonia de forma circular, blanca, opaca de superficie rugosa. Levaduras. Después de 48 horas con reacción positiva a: glucosa, glicerol, N-acetil-D-glucosamina. Temperatura óptima de crecimiento 30°C (*Ver figuras: VI.11 y VI.12*).

***Candida sp.***, presentó las siguientes características: Colonia de forma elíptica, blanca, opaca de superficie rugosa. Levaduras con pseudohifas. Después de 48 horas con reacción positiva a: glucosa, 2 keto-D-gluconato, D-xilosa, galactosa, sorbitol, maltosa, sacarosa, trehalosa, melezitosa y N-acetil-D-glucosamina. Temperatura óptima de crecimiento 30°C (*Ver figuras: VI.13 y VI.14*).

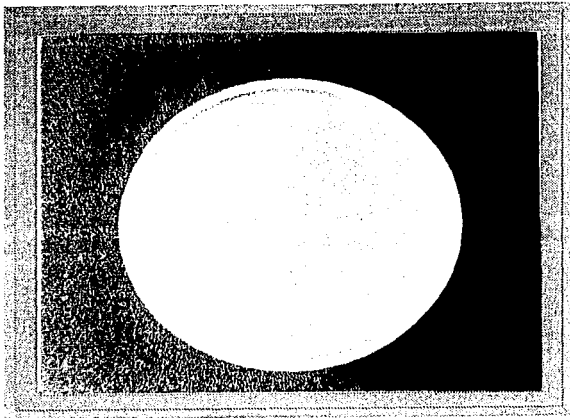


Figura VI.1.- Morfología colonial de *Brevibacterium sp.*

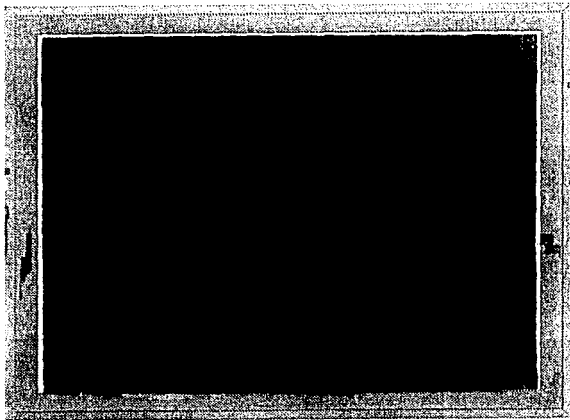


Figura VI.2.- Morfología microscópica de *Brevibacterium sp.*

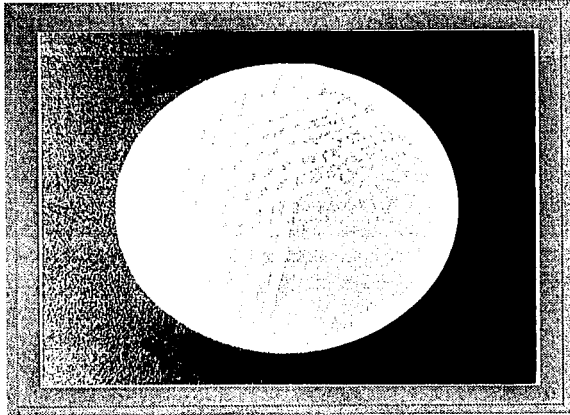


Figura VI.3.- Morfología colonial de *Citrobacter diversus*

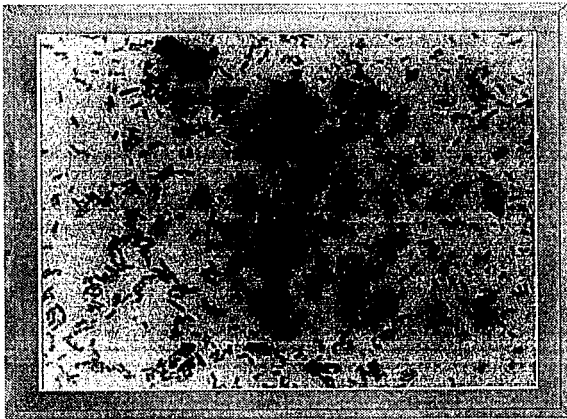


Figura VI.4.- Morfología microscópica de *Citrobacter diversus*

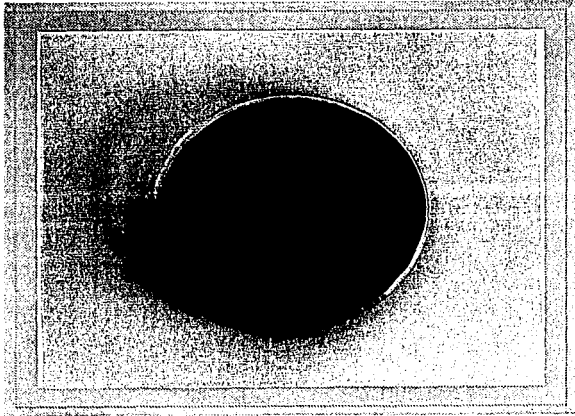


Figura VI.5.- Morfología colonial de *Serratia marcescens*

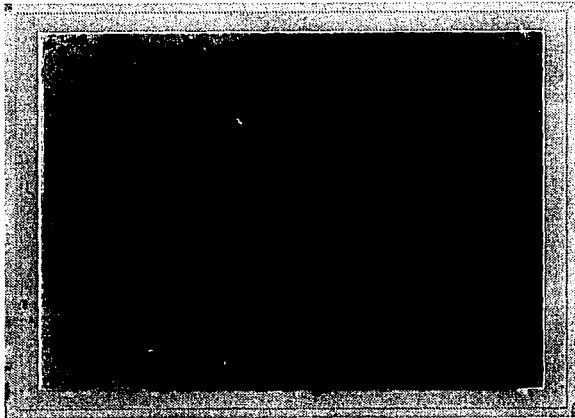


Figura VI.6.- Morfología microscópica de *Serratia marcescens*

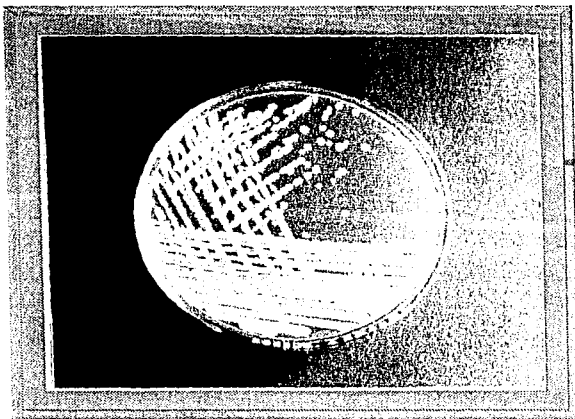


Figura VI.7.- Morfología colonial de *Pseudomonas pseudomallei*

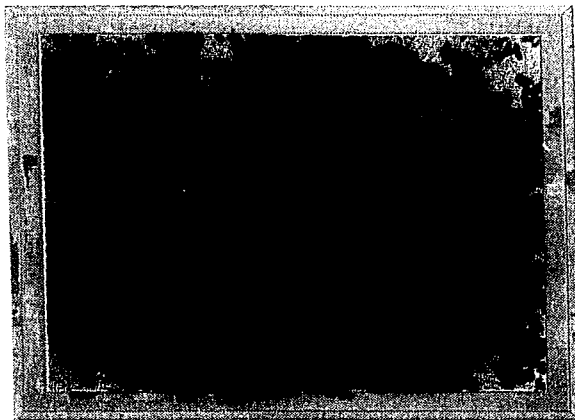


Figura VI.8.- Morfología microscópica de *Pseudomonas pseudomallei*



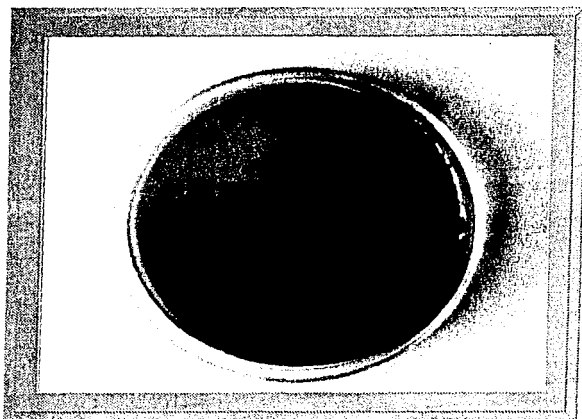


Figura VI.9.- Morfología colonial de *Pseudomonas aeruginosa*



Figura VI.10.- Morfología microscópica de *Pseudomonas aeruginosa*

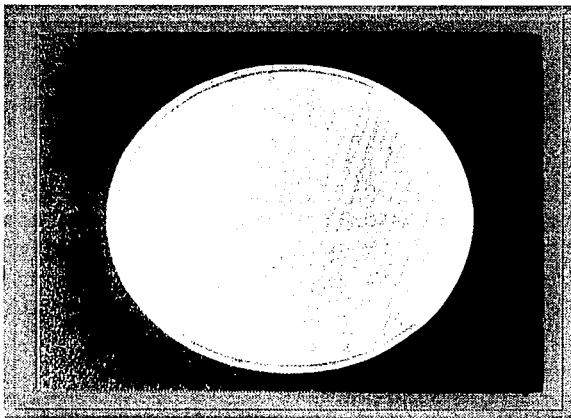


Figura VI.11.- Morfología colonial de *Candida tropicalis*

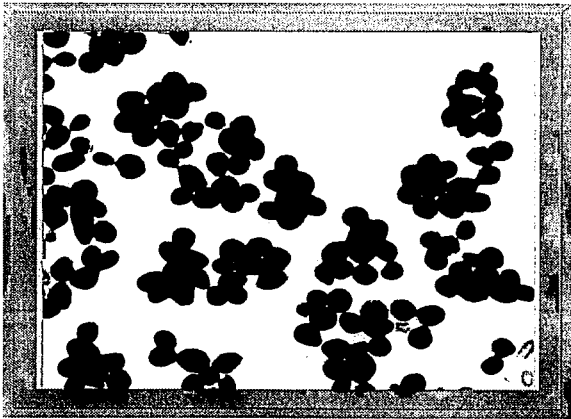


Figura VI.12.- Morfología microscópica de *Candida tropicalis*

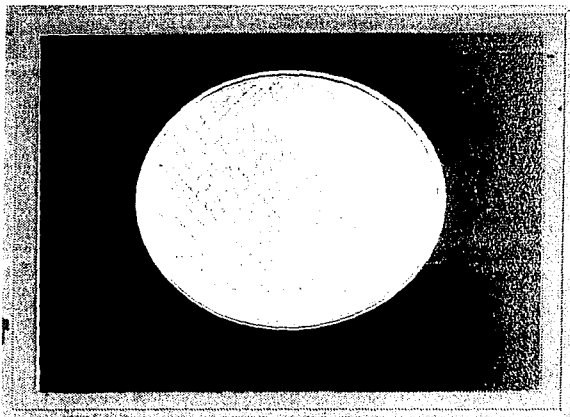


Figura VI.13.- Morfología colonial de *Candida sp.*



Figura VI.14.- Morfología microscópica de *Candida sp.*

#### 4. Cinética de crecimiento microbiano preliminar en petróleo Maya

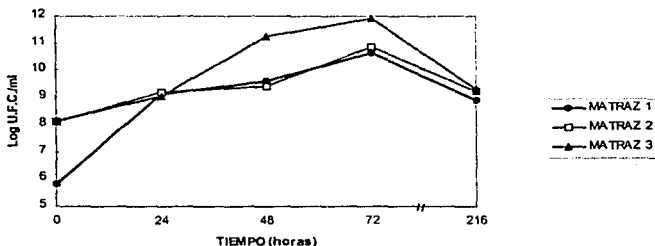
Los resultados obtenidos de la concentración microbiana se encuentra en las tablas VI.4. y VI.5., y su tendencia a través del tiempo se representa en la gráfica VI.1. Donde se observa que el cultivo mixto que crece en petróleo Maya no requiere de una fase de adaptación previa, iniciando su crecimiento de manera inmediata hasta un lapso de 72 horas, de acuerdo con los datos determinados para la velocidad de crecimiento específico máximo aparente.

Tablas VI.4. y VI.5. Crecimiento microbiano en UFC/ml

				Log del valor promedio			
TIEMPO (hr)	MATRAZ 1 (UFC/ml)	MATRAZ 2 (UFC/ml)	MATRAZ 3 (UFC/ml)	TIEMPO (hr)	MATRAZ 1	MATRAZ 2	MATRAZ 3
0	6.80E+05	1.29E+08	1.40E+08	0	5.8325	8.1089	8.1446
24	1.34E+09	1.53E+09	1.09E+09	24	9.1271	9.1847	9.0390
48	3.86E+09	2.54E+09	1.74E+11	48	9.5860	9.4040	11.2405
72	4.62E+10	7.85E+10	8.20E+11	72	10.6642	10.8949	11.9138
216	7.70E+08	1.67E+09	1.97E+09	216	8.8855	9.2227	9.29334
360	2.48E+09	1.73E+09	1.93E+09	360	9.3945	9.2380	9.28566

A partir de estos datos se calcularon las velocidades de crecimiento específico como  $\mu_{max}$  aparente, para cada una de las cinéticas:  $\mu_1$  (0-24 h) para el matraz 1:  $0.1372 \text{ h}^{-1}$ ,  $\mu_2$  (48-72) para el matraz 3:  $0.621 \text{ h}^{-1}$  y  $\mu_3$  (24-48) para el matraz 1:  $0.0917 \text{ h}^{-1}$ .

Gráfica VI.1. Cinéticas de crecimiento microbiano en petróleo Maya



### **5.- Cuantificación de los HTP residuales, mediante el método 418.1 modificado**

Una vez cumplidos los 28 días del periodo de incubación de todos los matraces, se llevó a cabo la cuantificación de los HTP residuales mediante el método 418.1, a partir de estos resultados se calculó la fracción de HTP degradada, para cada uno de los matraces correspondientes a cada tratamiento y concentración diferente.

Como ya se había mencionado anteriormente, la fracción de HTP biodegradada, se obtuvo a partir del cociente de los valores de HTP degradados, correspondientes a la diferencia del blanco y la concentración final obtenida para cada una de los matraces entre el valor del blanco respectivo, es decir:

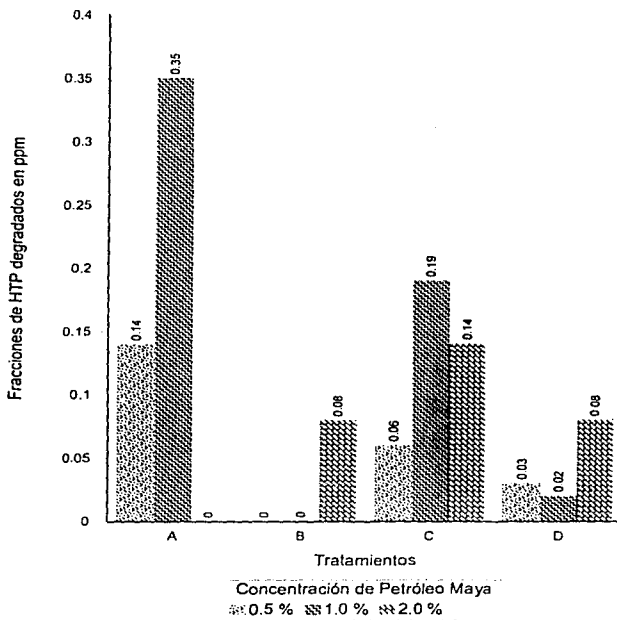
$$\text{Fracción de HTP degradada: } \frac{\text{ppm del blanco} - \text{ppm de cada matraz}}{\text{ppm del blanco}}$$

Estos resultados nos mostraron los valores de degradación llevada a cabo por el factor biológico.

La gráfica VI.2., muestra los resultados del promedio de las fracciones de HTP degradadas, con base en los distintos tratamientos y concentraciones de petróleo Maya. Se observa que el valor promedio más alto de 0.35 ppm, corresponde a la mayor biodegradación de petróleo Maya a una concentración del 1.0%, la cual se llevó a cabo con el tratamiento control, que involucra solamente la acción del cultivo mixto, sin la adición del tensoactivo ni la aplicación de la sonicación.

Así mismo se observa que en el mismo tratamiento control, bajo la concentración del 2% de petróleo, los valores de la fracción de HTP degradada fueron 0, igual que en el tratamiento A en el cual se adicionó el tensoactivo a una concentración del 0.5% y 1.0%, lo cual quiere decir, que a estos dos niveles no hubo biodegradación.

Gráfica VI.2.- Resultados de los valores promedio de las fracciones de HTP degradadas con 4 diferentes tratamientos



	Control	Tratamiento A	Tratamiento B	Tratamiento C
Tensoactivo	-	+	-	+
Sonicación	-	-	+	+

## 6. Análisis Estadístico

Con base en el análisis de varianza (ANOVA) realizado, los resultados fueron los siguientes:

La tabla VI.4, de Análisis de varianza nos muestra que hubo un efecto tanto de los distintos tratamientos como de la concentración de petróleo sobre la fracción de HTP degradada, es decir:

- Por lo menos alguno de los tratamientos como la sonicación y el tensoactivo Biotrex, ejercieron un efecto sobre la disminución en la concentración de HTP; a un nivel de significancia de 0.0001, por lo que se rechaza la hipótesis nula.
- Las distintas concentraciones de petróleo Maya tienen un efecto distinto en la degradación del petróleo Maya a un nivel de significancia de 0.001.
- La interacción entre tratamiento-concentración, muestra igualmente efectos significativos con respecto a la disminución en la concentración de HTP a un nivel de significancia del 0.0001.

Posteriormente en la tabla VI. 5., aparecen las interacciones entre los factores tratamiento y concentración, donde se observa que la mayor media (0.3500), se presentó en el control a una concentración de petróleo Maya del 1%. Lo cual significa que el cultivo mixto, puede llevar a cabo por sí solo la degradación del petróleo Maya, utilizando una concentración óptima del 1% y no a una concentración mayor, posiblemente debido a otros factores no probados en este experimento.

*Tabla VI.4. Análisis de Varianza con la estimación de las diferencias significativas, a distintos intervalos de confianza*

<b>Análisis de Varianza</b>					
Variable de respuesta: Fracción de HTP degradada					
Fuente	Grados de libertad	Anova SS	Media	F de tablas	Pr < F
TRAT	3	0.1144	0.0381	15.67	0.0001
CONC	2	0.0454	0.0227	9.33	0.0010
TRAT*CONC	6	0.1877	0.0312	12.86	0.0001

*Tabla VI.5. Descripción de la interacción\* entre los factores: tratamiento y concentración*

Nivel de tratamiento	Nivel de [%]	Núm. de datos	Medias	SD
control	0.5	3	0.1400	0.0300
control	1	3	0.3500	0.1500
control	2	3	0.0000	0.0000
tratamiento a	0.5	3	0.0000	0.0000
tratamiento a	1	3	0.0000	0.0000
tratamiento a	2	3	0.0833	0.0208
tratamiento b	0.5	3	0.0600	0.0173
tratamiento b	1	3	0.1900	0.0173
tratamiento b	2	3	0.1400	0.0300
tratamiento c	0.5	3	0.0300	0.0100
tratamiento c	1	3	0.0233	0.0230
tratamiento c	2	3	0.0866	0.0321

*\*La interacción entre los factores tiene un nivel de significancia del 0.0001.*



## VII. DISCUSION

La identificación y conservación de los distintos microorganismos degradadores de petróleo Maya a partir del cultivo mixto, nos permitirá en lo sucesivo contar con un inóculo constante de tal forma que asegure que en cada uno de los experimentos que se realicen, se obtengan en promedio los mismos porcentajes de degradación.

Las distintos géneros de bacterias y levaduras, constituyentes del cultivo mixto, frecuentemente aparecen implicados en la biodegradación de hidrocarburos, por la habilidad que poseen para crecer en distintos compuestos contaminantes, utilizándolos como única fuente de carbono y energía (Atlas, 1984; Berguey's, 1994; Cabridenc, 1985; Chhatre *et al.*, 1996; Kokub, 1990; Walter, 1997).

Las cepas de *Pseudomonas* son considerablemente miembros comunes y predominantes de poblaciones seleccionadas de fuentes naturales, tales como suelo, aguas contaminadas y sedimento con una versatilidad metabólica para crecer en un amplio rango de hidrocarburos, tal es el caso particular de *Pseudomonas aeruginosa*, quien posee la capacidad para producir un tensoactivo, el cual juega un papel crucial en el proceso de biodegradación, por la efectividad para emulsificar el crudo, haciéndolo disponible para los demás miembros del consorcio microbiano (Chhatre *et al.*, 1996, Walter, 1997 y Zhang, 1992).

La gráfica de la cinética de crecimiento preliminar muestra que el cultivo mixto, obtenido directamente de la columna de aclimatación, presentó una respuesta inmediata de manera exponencial, alcanzando su máximo a las 72 hrs, con una  $\mu_{max}$  aparente de  $0.1372 \text{ h}^{-1}$  en el intervalo de 0-24 hrs en el matraz 1. A partir de este punto los organismos disminuyeron su velocidad de crecimiento y la población se mantuvo prácticamente constante hasta las 216 hrs. Esta conducta de crecimiento concuerda con los resultados obtenidos por Kokub, 1990, quien presenta el comportamiento de un cultivo mixto ante distintos tipos de petróleo, el cual no presentó una fase de retraso con ninguno de los tipos de petróleo probados, probablemente, porque estos microorganismos fueron crecidos previamente en el mismo sustrato, lo que indica que pudieron haber tenido una adaptación para utilizar el petróleo como fuente de carbono, así lo señala este autor.

En cuanto a los resultados que muestra la gráfica VI.2, sobre los valores de las fracciones de HTP degradadas, con la aplicación de diferentes tratamientos y concentraciones de petróleo se tiene lo siguiente:

- El aumento de la biodegradación por el cultivo mixto, se vio favorecido bajo las concentraciones del 0.5% y 1% de petróleo Maya, mientras que a una mayor concentración la actividad biodegradativa disminuyó en forma drástica, debido probablemente a una toxicidad provocada por la concentración del petróleo, o bien porque hubo una limitaciones de oxígeno, o, también pudo haber ocurrido que el sustrato no se encontraba emulsificado siendo nula su disponibilidad y por lo tanto se necesitaría de la presencia de un tensoactivo que permitiera la emulsificación del petróleo y así favorecer el proceso de biodegradación.
- El tensoactivo no ejerció un efecto positivo en la degradación del petróleo, probablemente porque este pudo ser utilizado como fuente de carbono y energía, lo que impidió que los microorganismos utilizaran el petróleo como tal.
- El efecto de la sonicación favoreció la biodegradación presentando un aumento hasta la concentración del 1%, mientras que a la concentración del 2% vuelve a disminuir, posiblemente porque este ya no tuvo la capacidad de incrementar aún más la dispersión del petróleo en el medio por lo que no se favoreció la biodisponibilidad.
- Así mismo, se observó que la presencia del tensoactivo y la aplicación de la sonicación paralelamente no ejercen un efecto significativo en la biodegradación del petróleo Maya por el cultivo mixto.

Por todo lo anterior se recomienda la realización de mayores estudios que permitan determinar si es posible incrementar el proceso de biodegradación.

Con respecto a el análisis estadístico sobre la evaluación de la capacidad degradadora del cultivo mixto, se observó que el mayor porcentaje de degradación biológica alcanzado en un periodo de 28 días, fue del 35% a una concentración de petróleo Maya del 1.0%, sin la adición del tensoactivo Biotrex, ni la aplicación de la sonicación. Estos resultados coincide con los porcentajes de biodegradación del 19% al 34%, obtenidos con el consorcio microbiano denominado SM8, empleado por Keiji *et al*, 1997, con cuatro diferentes muestras de crudo, siendo una de ellas de petróleo Maya.

## VIII. CONCLUSIONES

Se dispone de una metodología de trabajo que resultó apropiada para el aislamiento de microorganismos degradadores de petróleo.

A partir de trabajo realizado se obtuvo un cultivo microbiano mixto con capacidad de degradar petróleo Maya.

De este cultivo mixto, se aislaron 7 cepas de microorganismos, de las cuales 4 son bacterias Gram-negativas, 1 Gram-positiva y 2 levaduras.

Los microorganismos fueron identificados como: *Citrobacter diversus*, *Serratia marcencens*, *Pseudomonas pseudomallei*, y *Pseudomonas aeruginosa*, las cuales son bacterias Gram-negativas; y *Brevibacterium sp* que es una bacteria Gram-positiva. *Candida tropicalis* y *Candida sp.* corresponden a las levaduras. Dichos microorganismos pertenecen a los géneros reportados como capaces de metabolizar hidrocarburos.

Al evaluar la eficiencia de degradación del cultivo microbiano mixto, se alcanzó un máximo porcentaje de biodegradación del 35%, con una concentración óptima de petróleo Maya del 1.0%, siendo estos resultados de gran interés al pensar en la gran versatilidad metabólica que posee el cultivo mixto.

Los resultados encontrados en este estudio, sobre la capacidad de biodegradación que posee el cultivo mixto y a su origen a partir de suelos contaminados por hidrocarburos, indican que es factible eliminar estos contaminantes a través de la aplicación de métodos biológicos, los cuales únicamente emplean nutrientes y microorganismos, además, dependiendo del tipo de contaminante presente es posible eliminarlos hasta bióxido de carbono y agua, lo cual representa una gran ventaja desde el punto de vista ambiental y económico sobre otras tecnologías de tipo físico o fisicoquímico.

Así mismo, es importante considerar que en los suelos de México contaminados con crudo, es frecuente encontrar una población microbiana autóctona hidrocarbonoclástica, la cual podría incrementarse o estimularse con la aplicación de este tipo de cultivos mixtos, logrando así mejores resultados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Anderson T.A. y Coats J.R. 1994. Bioremediation through rizosphere technology. *ACS Symposium Series 563. American Chemical Society.*
- 2.- Atlas R.M. 1977. Degradation and mineralización of petroleum in seawater. *Critical Rev in Microbiol Control*, 5: 371-386.
- 3.- Atlas R.M. 1981. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environmental Perspective. *Microbiological Reviews*, 45: 180-209.
- 4.- Atlas R.M. 1984. *Petroleum Microbiology*, p 692.
- 5.- Bartha R. y Atlas R.M. 1977. Biodegradation of petroleum in seawater low. *Adv. in Appl. Microbiol*, 22:225-256.
- 6.- Connel D.W., Miller G.J. 1980. *CRC Critical Reviews in Environ Control*, 11 (9): 37-104.
- 7.- Chhatre S., Purohit H., Shanker R., y Khanna P. 1996. Bacterial consortia for crude oil spill remediation. *Wat. Sci. Tech*, 34: 187-193.
- 8.- Charter K.W.A. & Somerville, H.J. 1978. The oil Industry and Microbial Ecosystems. IP.
- 9.- Chen Ch. and Taylor, R.T. 1995. Thermophilic biodegradation of BTEX by two *Thermus* species. *Biotechnol. Bioeng*, 48: 614-624.
- 10.- EPA. 1978. Microbiological Methods for Monitoring the Environment. U.S. págs: 65-70.
- 11.- FIES-95108-VI. 1996. Bioremediación de suelos contaminados con petróleo.
- 12.- Friello D.A. y cols. 1976. En. Proceedings of the 3<sup>rd</sup>. Int. Biodegr. Symp. *Applied Science Publ.*, pp 205-214.
- 13.- Geyer R. A. 1979. Ecología. *Ciencia y Desarrollo*, 29: 101-108.
- 14.- González R. O. 1991. Aplicaciones de modelos lineales a Biotecnólogos usando SAS. UAM, pp 34-37.

- 15.- Holt J. G. et al. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 787 p.
- 16.- I.M.P., 1979. Informe técnico sobre la perforación del Pozo Ixtoc I: *Impacto Ambiental y conclusiones preliminares*, 59 p.
- 17.- IMP, 1983. Utilización de crudo interemperizado. *Informe G-1715.9.*, 60 p.
- 18.- Keiji S., Masami I., Toshitsugu S., and Shigeaki K. 1997. Physicochemical Properties and Biodegradability of Crudo Oil. *Environ. Sci. Technol.*, **31**: 45-51.
- 19.- Margulis L. y Schwartz K. V. 1980. *Cinco reinos*, 335 p.
- 20.- Miget R. 1973. *En: Microbial degradation of oil pollutants*. Center for Wetland Resources Publications LSU-SG-73-01, pp 291-309.
- 21.- Odu C.T.I., Inst. Petrol. Technical paper IP 77-005, 1977.
- 22.- Saval B. S. 1997. La biorremediación como alternativa para la limpieza de sitios contaminados con hidrocarburos. *Seminario Internacional sobre restauración de sitios contaminados*. México, pág.: 18.
- 23.- Schwartz R.D., Leathen W. W. 1976. *En: Industrial Microbiology*, pp 384-411.
- 24.- Sharpley J.M., Kaplan A.M. 1976. *Proceedings of the 3<sup>rd</sup> Int Biodegr. Symp. Applied Science Publishers LTD*, **57**: 423-446.
- 25.- Shennan J. L., Levi J.D. 1974. *Progress in Industrial Microbiology*, **13**: 1-57.
- 26.- Thibault S. L., Anderson M. A. y Frankenberger W. T. 1996. Influence of surfactants on pyrene desorption and degradation in soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 283-287.
- 27.- Volkering F. 1995. Breure, A.M., van Andel, J.G. and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1699-1705.
- 28.- Walter M. V., Nelson E. C., Firmstone D. G., Martin M. J., Clayton S., Simpson y Spaulding S. 1997. Surfactant Enhances Biodegradation of Hydrocarbons: Microcosm and Field Study. *Journal of Soil Contamination*, **6**: 61-77.
- 29.- Zhang Y. y Miller R.M. 1992. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by *Pseudomonas rhamnolipid* surfactant (biosurfactant). *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**:3276-3282.

## **ANEXO 1**

- MEDIO DE CULTIVO LEBAC

Composición del medio:

Ingredientes	g/l
Sulfato de amonio	7
Fosfato monopotásico	5.7
Fosfato dipotásico	2.3
Sulfato de magnesio hepta hidratado	2.25
Extracto de levadura	0.1

*Método de preparación:*

Pesar todos los ingredientes y disolver en agua destilada, usando un agitador con calor. Adicionar el agar al final en baño María, ajustando el pH a 7.0-7.2. Esterilizar en autoclave de 118 a 121 °C, (no más de 15 libras de presión durante 15 minutos).

- MEDIO DE CULTIVO TSA PARA BACTERIAS

Composición del medio:

Ingredientes	g/l
Peptona de Caseína	15
Peptona de Soya	5
Cloruro de sodio	5
Agar	15

pH final: 7.3 ± 0.2

*Método de preparación:*

Resuspender 40 gr. del medio el cual ya viene preparado, en un litro de agua destilada. Mezclar bien. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante 1 minuto. Después de que se haya disuelto, distribuir y esterilizar en autoclave de 118 a 121 °C, (no más de 15 libras de presión) durante 15 minutos.

- **MEDIO DE CULTIVO PARA ACTINOMICETOS**

*Composición del medio:*

Ingredientes	g/l
Almidón soluble o glicerol	10.0
Caseína(libre-vitamina)	0.3
Nitrato de sodio	2.0
Fosfato de dipotasio	2.0
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.05
Carbonato de Calcio	0.02
Sulfato de fierro heptahidratado	0.01
Agar	15.0

*Método de preparación:*

Pesar todos los ingredientes y disolver en agua destilada, usando un agitador con calor. Esterilizar en autoclave de 118 a 121 °C, (no más de 15 libras de presión durante 15 minutos.

- **MEDIO YM PARA LEVADURAS**

*Composición del medio:*

Ingredientes	g/l
Sacarosa	10
Peptona	5
Extracto de malta	3
Extracto de levadura	3
Agar	17

*Método de preparación:*

Se pesan los ingredientes y se disuelven en agua, esterilizando en autoclave de 118 a 121 °C, (no más de 15 libras de presión durante 15 minutos.



- **MEDIO DE CONSERVACION**

Este medio se utilizó para resuspender el crecimiento de bacterias y levaduras de tubos de agar TSA y agar YM inclinados respectivamente, para introducirlo en viales que fueron sellados y guardados en un Ultra congelador a -82°C. Como medio de conservación de los microorganismos.

*Composición del medio de conservación:*

Ingredientes	g/l
Fosfato de potasio	3
Citrato de sodio	7
Sulfato de magnesio	0.5
Glicerol	50% v/v

*Método de preparación:*

Pesar todos los ingredientes y disolver en agua destilada, usando un agitador, ajustando el pH a 7.0 y esterilizar en autoclave de 118 a 121 °C, (no más de 15 libras de presión durante 15 minutos.

- **TECNICA DE SEMBRADO POR ESTRIA CRUZADA**

*Procedimiento:*

*El procedimiento se lleva a cabo bajo condiciones estériles.*

1. Fundir el medio de cultivo a una temperatura de 44 - 46 °C, y se esteriliza en una autoclave de 118 a 121 °C, (no más de 15 libras de presión durante 15 minutos y se deja enfriar.
2. Posteriormente se adicionan cerca de 15 ml a cada caja de Petri estéril y se deja solidificar y secar completamente, para obtener buenos resultados de sembrado.
3. Se toma una asa bacteriológica y se esteriliza al rojo vivo en una flama.
4. Se enfría el asa moviéndola un poco y se toma una pequeña muestra de la colonia o del inóculo.

5. El sembrado por estría cruzada tiene un diseño particular. El primer "estriado" se realiza en 1/3 del superficie del agar.
- Una vez que se estría en el primer extremo, se rota un cuarto la caja en sentido de las manecillas del reloj, en tres pasos esterilizando el asa en cada paso. El objetivo es simplemente depositar en cada paso menos células sobre la superficie. Después de la incubación estas células se desarrollarán dentro de una correcta separación de colonias puras de bacterias, teóricamente hasta presentarse una sola colonia (EPA, 1978).
  - TECNICA DE VACIADO EN PLACA

*Procedimiento:*

El procedimiento se deberá llevar a cabo bajo condiciones estériles.

1. Con una pipeta bacteriológica de 1 ml, se prepara una muestra inicial a una dilución del  $10^{-2}$ .
2. Apartir de esta dilución se preparan diluciones de  $10^{-4}$  a  $10^{-10}$  según se requiera.
3. Se agita vigorosamente el tubo con la dilución requerida y se transfieren 0.5 ml en dos cajas de petri.
4. Se vacía de 12 a 15 ml de el agar fundido enfriado a 44-46 °C dentro de cada caja de petri. La mezcla de agar y el inóculo se mueve en rotación con cuidado para evitar se derrame el agar. Una recomendación de la técnica es hacer cinco rotaciones hacia la izquierda y cinco hacia la derecha, cinco hacia adelante y cinco hacia atrás.
5. Invertir las cajas e incubar al tiempo y temperatura especificados.
6. Después de la incubación se habrá llevado a cabo el aislamiento de las colonias en la superficie y sub-superficie en algunas de las placas.

## **ANEXO 2**

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

• PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACION BIOQUIMICA PARA  
ENTEROBACTERIACEAE Y OTROS BACILOS GRAM - POSITIVOS.

**SISTEMA DE IDENTIFICACION  
DE BACTERIAS CORINEFORMES**

Ficha Técnica  
Version A

**RPI CORYNE** es un sistema de identificación en 24 horas de bacterias corineformes aisladas en clínica, mediante tests estandarizados y miniaturizados, unidos a una base de datos especialmente adaptada.

**Principio**

La galería RPI CORYNE está compuesta por 20 microtubos que contienen sustratos deshidratados para el estudio de enzimas o la fermentación de azúcares. Los tests enzimáticos se inoculan con una suspensión densa que rehidrata los sustratos enzimáticos.

Las reacciones producidas durante el periodo de incubación se traducen en cambios de coloración espontánea o revelados por la adición de reactivos. Los tests de fermentación se inoculan con un medio enriquecido (conteniendo un indicador de pH) que rehidrata los sustratos azucarados. La fermentación de carbohidratos entraña una acidificación que se traduce en un viraje espontáneo del indicador coloreado.

Después de la incubación, 24 horas a 35-37°C, la lectura de las reacciones se realiza visualmente con la tabla de lectura e identificación obtenida con la ayuda del programa **ATB Plus**, del Catálogo Analítico RPI CORYNE o de la Tabla de Identificación.

- La caja RPI CORYNE permite realizar 12 tests. Se compone de :
  - 12 galerías RPI CORYNE
  - 12 ampollas de Suspension Medium, 3 ml
  - 12 ampollas de GP Medium
  - 1 ampolla McFarland Standard, punto 8
  - 12 cámaras de incubación
  - 12 hojas de resultados
  - 1 ficha técnica
- Para utilizar RPI CORYNE, es necesario disponer de :
  - Reactivos NIT 1 (# 7 044 0) y NIT 2 (# 7 045 0), ZVM R (# 7 047 0) y ZVM B (# 7 048 0), PVZ (# 7 059 0)
  - Agua oxigenada (3 %)
  - Aceite de parafina (# 7 010 0)
  - Pipetas (# 7 030 0) ó Pipetas (- # 7 025 0)
  - Escobillonas estériles (# 7 081 0)
  - Catálogo Analítico RPI CORYNE (# 2 099 0) o programa **ATB Plus** (# 4 000 4)
  - Gradilla para ampollas (# 7 020 0)

El material de laboratorio siguiente :

- Estufa a 37°C, nevera, mechero Bunsen, rotulador.

**Conservación**

Las galerías y medios se conservan a 2-8°C hasta la fecha de caducidad indicada en el envase.

Los reactivos se conservan igualmente a 2-8°C, excepto ZVM R, que se conserva a 8-30°C (a 2-8°C, ZVM R produce un precipitado que no altera las propiedades y desaparece a 80°C).

El reactivo ZVM B es sensible a la luz : envolver el frasco en papel aluminio.

El reactivo PVZ es muy sensible al aire : transferirlo al frasco cuentalgotas y conservarlo siempre bien cerrado.

**Composición de medios y reactivos**

• Suspension Medium			
Agua destilada estéril		3	ml
• GP Medium			
Cistina		0,50	g
Triptona		20	g
Cloruro sodico		5	g
Sulfito sodico		0,50	g
Rojo fenol		0,17	g
Agua destilada	qsp	1000	ml
pH = 7,8			
• Reactivo NIT 1		0,8	g
Acido sulfanilico		100	ml
Acido acético 5N	qsp		
• Reactivo NIT 2		0,8	g
N-N-Dimetil-1-naftilamina		100	ml
Acido acético 5N	qsp		
• Reactivo ZVM R		25	g
Tri-hidroxi-metil-amino-metano		11	ml
Acido clorhídrico (37%)		10	g
Lauril sulfato		10	g
Agua destilada	qsp	100	ml
• Reactivo ZVM B		0,35	g
Fast Blue BB		100	ml
2-metoxi-etanol	qsp		
• Reactivo PVZ		1	g
FeCl <sub>2</sub>		6	g
Conservador		1	g
Solvente orgánico	qsp	100	ml

## Técnica

### 1. Selección de colonias

- Aislar y verificar la pertenencia de la cepa al grupo de bacilos Gram positivos, no esporulados, aero-anaerobios facultativos.
- Anotar el tipo de hemólisis.
- Tomar una colonia bien aislada y realizar un subcultivo en una placa de Columbia con sangre de cordero o bien realizar una suspensión bacteriana emulsionando una colonia en 3 ml de agua destilada y seguidamente inocular una placa de Columbia con sangre de cordero.
- Incubar la placa 24 horas a 35-37°C.

### 2. Preparación de la galería

- Preparar una cámara de incubación (fondo y tapa).
- Anotar la referencia de la cepa en la lengüeta lateral.
- Repartir aproximadamente 5 ml de agua en los alveolos del fondo.

### 3. Preparación del Inóculo

- Abrir una ampolla de Suspensión Medium.
- Con la ayuda de un oscobillón estéril, tomar todo el cultivo y realizar una suspensión bacteriana con una turbidez igual al punto 6 de la escala McFarland, comparando dicha suspensión con el patrón de turbidez que se incluye en la caja.

### 4. Inoculación de la galería

- Once primeros tests de la galería (NIT a GEL) : repartir la suspensión anterior, evitando la formación de burbujas (inclinar la cámara de incubación hacia delante) :
  - Para los tests NIT a ESC, depositar 150 µl en cada cúpula (3 gotas de pipeta Pasteur ó 6 gotas de Pipettes).
  - Para el test URE, llenar únicamente la parte del tubo.
  - Para el test GEL, llenar el tubo y la cúpula.
- Nueve últimos tests de la galería (O a GLYG) :
  - Traspasar aproximadamente 0,5 ml de la suspensión anterior a una ampolla de GP Medium. Homogeneizar muy bien.
  - Repartir esta nueva suspensión únicamente en los tubos.
- Recubrir los tests subrayados con aceite de parafina, formando un menisco ligeramente convexo (URE, O a GLYG).
- Tapar la cámara de incubación.
- Incubar 24 horas a 35-37°C.

### 5. Lectura de la galería

- Añadir los reactivos :
  - test NIT : 1 gota de NIT 1 y NIT 2
  - test PYZ : 1 gota de PVZ
  - test PyrA, PAL, B GUR, B GAL, α GLU, B NAQ : 1 gota de ZYM R y ZYM B.
- Esperar 10 minutos, después, leer las reacciones con la ayuda de la tabla de lectura. Si fuera necesario, exponer la galería a una lámpara (1000 W) 10 segundos para decolorar el reactivo en exceso de los títulos PyrA a B NAQ.
- Realizar el test CATalasa (utilizarlo como test 21) : añadir una gota de agua oxigenada al 3% en el test ESC o GEL. Esperar 1 minuto. La aparición de burbujas corresponderá a una reacción positiva.
- Anotar las reacciones en la hoja de resultados.

### 6. Interpretación

La identificación puede obtenerse :

- con el programa ATB Plus o el Catálogo Analítico RPI CORNE.
- Para ello, codificar las reacciones obtenidas en un perfil numérico : en la hoja de resultados, los tests están separados en grupos de tres y un valor 1, 2 ó 4 está indicado para cada uno. Sumando en cada grupo los valores correspondientes a las reacciones positivas, se obtiene un perfil numérico de 7 cifras.
- con la Tabla de identificación : comparar las reacciones anotadas en la hoja de resultados con las de la tabla.
- puede consultar al Servicio de Ayuda al Diagnóstico API.



4 212 720 Actinomyces pyogenes

### 7. Eliminación del material utilizado

Después de su utilización, ampollas, pipetas y galerías, deben ser incineradas o decontaminadas por autoclavado o inmersión en agua de lejía.

### Limitaciones

El sistema RPI CORNE está destinado a la identificación de bacterias coryneformes (género *Corynebacterium* y géneros próximos) aislados en afecciones humanas y veterinarias.

La interpretación de los resultados de la galería, debe ser realizada por un analista y deberá tener en cuenta el origen de la muestra, los aspectos micro y macroscópicos y el contexto clínico.

Técnica	p. 16
Tabla de Identificación	p. 17
Bibliografía	p. 18

TESTS	REACCIONES	RESULTADOS	
		NEGATIVO	POSITIVO
NIT	Reduccion de Nitratos	NIT 1 + NIT 2 (10 mn)	
		incoloro rosa muy pálido	rosa intenso rojo
PYZ	Pirazinamidasa	PYZ (10 mn)	
		incoloro marrón muy pálido naranja muy pálido	marrón naranja
PyrA	Pirrolidoniil Arilamidasa	ZVM R + ZVM B (PyrA → B NAG) (10 mn)	
		incoloro naranja pálido	naranja
PAL	Fosfatasa Alcalina	incoloro beige-púrpura pálido naranja pálido	púrpura
B GUR	beta GlucURonidasa	incoloro gris pálido beige pálido	azul
B GAL	beta GALactosidasa	incoloro beige-púrpura pálido	púrpura
a GLU	alfa GLÚcosidasa	incoloro beige-púrpura pálido verde pálido	púrpura
B NAG	N-Acetil-B Glucosaminidasa	incoloro beige-púrpura pálido marrón pálido gris pálido	marrón
ESC	ESculina (B Glucosidasa)	incoloro gris	negro
URE	UREasa	amarillo naranja	rojo rosa
<u>GEL</u>	GELatina (Hidrólisis)	sin difusión de pigmento	difusión de pigmento negro
<u>O</u> <u>GLU</u> <u>RIB</u> <u>XYL</u> <u>MAN</u> <u>MAL</u> <u>LAC</u> <u>SAC</u> <u>GLYG</u>	Control (Fermentación) GLUCOSA RIBOSA Xilosa MANitol MALtosa LACTosa SACarosa GLICogeno  (Fermentación)	rojo naranja	amarillo amarillo- naranja
CAT	CATalasa (test ESC o GEL)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% 1 mn	
		ausencia de burbujas	presencia de burbujas

• **PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACION BIOQUIMICA PARA  
ENTEROBACTERIACEAE Y OTROS BACILOS GRAM-NEGATIVOS.**



**SISTEMA DE IDENTIFICACION PARA  
ENTEROBACTERIACEAE Y OTROS  
BACILOS GRAM-NEGATIVOS.**

 Ficha técnica  
Version C

API 20 € es un sistema para la identificación de las Enterobacteriaceae y otros bacilos Gram-negativos y no exigentes, mediante 23 tests bioquímicos estandarizados y miniaturizados, y una base de datos. La lista completa de las bacterias que pueden identificarse utilizando este sistema aparece en la tabla de identificación (p. 22 de la ficha técnica).

**Principio**

La galería API 20 € consta de 20 microtubos que contienen los sustratos deshidratados. Los tests se inoculan con una suspensión bacteriana que rehidrata los medios. Durante la incubación el metabolismo de la bacteria produce cambios de color espontaneos o bien al añadir reactivos.

La lectura de las reacciones se hace de acuerdo con la tabla de lectura y la identificación mediante la tabla de identificación, API 20 € Index o el programa informático para identificación.

- La caja API 20 € permite realizar 25 identificaciones. Se compone de:
  - 25 galerías API 20 €
  - 25 cámaras de incubación
  - 25 hojas de resultados
  - 1 sistema de cierre
  - 1 ficha técnica.

- Para emplear API 20 € es preciso disponer de:
  - Medio de suspensión, 5 ml (ref. 20 110)
  - Cojo de reactivos (ref. 20 120)
  - o reactivos individuales (ref. 70 400 a 70 460 y ref. 70 540)
  - Reactivo Zn (ref. 70 380)
  - Reclite de porafino (ref. 70 100)
  - Pipetas o PSipetas (ref. 70 250)
  - API 20 € Index (ref. 20 190) o Programa informático para identificación
  - Gredillo (ref. 70 200)

En algunas ocasiones también se precisa:

- Medio API OF. Test para determinar el metabolismo fermentativo y oxidativo de la glucosa
- Medio API M. Test para determinar la movilidad de las bacterias aero-anaerobias.

Material de laboratorio:

- Estufa (35-37°C), nevera, mechero Bunsen, rotulador.

**Conservación**

Las galerías API 20 € se presentan en un sobre de aluminio. Después de la apertura del mismo, conservar las galerías restantes cerrando dicho sobre con la ayuda del sistema de cierre (incluido en el envase): colocar el extremo del sobre entre las dos piezas del sistema de cierre y apretar suavemente a fondo sobre toda la abertura. Las galerías pueden conservarse así durante 10 meses a 2-8°C (hasta la fecha de caducidad indicada en el envase).

Todos los reactivos se conservan igualmente a 2-8°C y 1 mes después de su apertura.

El reactivo OX es muy sensible a la luz: conservar envuelto en papel aluminio.

**Composición de los medios y reactivos**

- Medio de suspensión (ref. 20 110): agua desmineralizada.
- Reactivo TDA (ref. 70 400) para la detección de la triptófano desaminasa:
 

Percloruro férrico	3,4 g
Agua desmineralizada	100 ml
- Reactivo para la detección del Indol:
 

JAMES (ref. 70 540)	
Compuesto J 2183	0,5 g
HCl N	100 ml
ó	
IND	
Paradimilaminobenzaldehído	5 g
Alcohol isoamilico	75 ml
HCl 37%	25 ml
- Reactivos de Voges Proskauer para la detección de acetoina:
 

VP 1 (ref. 70 420)	40 g
Hidroxido potásico	100 ml
Agua desmineralizada	
VP 2 (ref. 70 430)	
α naltol	6 g
Etanol	100 ml
- Reactivo de Griess para los nitritos:
 

NIT 1 (ref. 70 440)	
Acido sulfanilico	0,8 g
Acido acético 5N	100 ml
NIT 2 (ref. 70 450)	
N-N-dimetil-α-naftilamina	0,6 g
Acido acético 5N	100 ml
- OX (ref. 70 460) para detectar oxidasa
 

Tetrametil-p-fenilendiamina	1 g
Alcohol isoamilico	100 ml

## Instrucciones

### 1. Preparación de la galería

- Preparar una cámara de incubación con su tapa correspondiente y repartir 5 ml. de agua en los alveolos para proporcionar una atmósfera húmeda.
- Anotar la referencia de la muestra en la lengüeta lateral de la cubeta.
- Colocar la galería en la cámara de incubación.
- Paralelamente, realizar el TEST DE LA OXIDASA:
  - colocar un trozo de papel de filtro sobre un portaobjetos
  - humedecer el papel con una gota de agua
  - añadir una gota de reactivo OX
  - si en el intervalo de 1 o 2 minutos aparece una tonalidad púrpura oscura, se tratará de una reacción positiva.

**NOTA:** API 20 € debe utilizarse con los bacilos Gram negativos y no exigentes. Los microorganismos difíciles y exigentes para los cuales se necesita tener precauciones especiales de manipulación (ej. : *Brucella* y *Francisella*) no forman parte de la base de datos API 20 €. Excluir o confirmar su presencia.

### 2. Preparación del Inoculo

- Abrir una ampolla de Medio de Suspensión API 20 € (ref. 20 110) o agua destilada estéril.
- Por medio de una pipeta Pasteur estéril tomar una colonia bien aislada.
- Realizar una suspensión homogénea de las bacterias en el medio.

### 3. Inoculación de la galería

- Llenar el tubo y la cúpula de los tests [CIT], [VP], [GEL], con la suspensión anterior.
- Llenar los tubos pero no las cúpulas de los demás tests.
- Llenar la cúpula de los tests ADH, LDC, ODC, URE, H<sub>2</sub>S con aceite de parafina para obtener anaerobiosis.
- Cerrar la cámara de incubación e incubar a 35-37°C. durante 18-24 H.

### 4. Lectura de la galería

- Después de 18-24 H. a 35-37°C debe hacerse la lectura de la galería según la Tabla de lectura.
- Anotar en la hoja de resultados las reacciones espontáneas.
- Si la glucosa es positiva y/ o 3 o más tests son positivos: efectuar el relevado de los tests que requieren reactivos.
  - TEST VP: Añadir 1 gota de VP 1 y VP 2. Esperar 10 minutos. Un color rojo o rosa fuerte indican una reacción POSITIVA.
  - TEST TDA: Añadir una gota de reactivo TDR. Un color marrón oscuro indica una reacción POSITIVA.
- TEST IND:
  - Añadir una gota de reactivo JAMES: la aparición inmediata de una coloración rosa indica que la reacción es positiva
  - Añadir una gota de reactivo IND y esperar dos minutos: la aparición de un anillo rojo indica que la reacción es positiva.

TEST NO<sub>2</sub>: Añadir dos gotas de reactivo NIT 1 y NIT 2 en el tubo GLU. Esperar de 2 a 3 minutos. Un color rojo indica una reacción POSITIVA. Una reacción negativa puede deberse a la reducción de los nitratos a N<sub>2</sub> (acompañada muchas veces de la formación de burbujas); Añadir de 2 a 3 mg de reactivo de Zn. Si después de 5 minutos el tubo permanece amarillo indica una reacción POSITIVA. Si la reacción de color rosa o rojo la reacción es negativa.

- Si la glucosa es negativa y el número de tests positivos es inferior o igual a 2: no añadir reactivos.
  - Inocular 2 Medios RPI OF para comprobar el metabolismo de la glucosa.
  - Sembrar en Moc Conkey.
  - Comprobar la movilidad. Inocular 1 Medio RPI M.
  - Reincubar la galería 24 H. más.
  - Añadir los reactivos.
  - Anotar las reacciones de la galería y los resultados de los tests complementarios en la hoja de resultados.

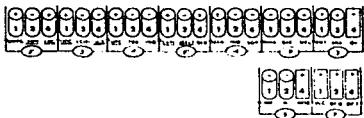
### 5. Identificación

- Mediante la TABLA DE IDENTIFICACION: Comparar las reacciones de la hoja de resultados con los de la tabla.
- Con el API 20 € Index o el programa informático para identificación: del conjunto de reacciones debe obtenerse un perfil numérico. En la hoja de resultados los tests están separados en grupos de tres y un valor 1, 2 ó 4 está indicado por cada uno. La galería API 20 € consta de 20 tests, los números en el interior de cada grupo corresponden a las reacciones positivas. El test de la oxidasa es el n° 21 y si es positivo se le asigna el valor 4. Sumando los valores de los tests positivos para cada grupo se obtiene un código de 7 cifras.

En algunos casos, el perfil de 7 cifras no discrimina suficientemente, debiendo realizarse los tests complementarios siguientes:

- Reducción de los nitratos a nitritos (NO<sub>2</sub>)
- Reducción de los nitratos a nitrógeno (N<sub>2</sub>)
- Movilidad (MOB)
- Cultivo en Mac Conkey (McC)
- Oxidación de la glucosa (OF-O)
- Fermentación de la glucosa (OF-F)

**Ejemplo:**



5 315 173-57: *Enterobacter gergoviae*

- **Servicio de consulta:** Permite a cada analista consultar cualquier perfil que no se encuentre presente en el API 20 E Index. En estos casos debe acompañar a la solicitud la siguiente información: Origen de la cepa, antecedentes del enfermo, morfología microscópica y macroscópica, serología...

**6. Esterilización**

Después de obtener la identificación correspondiente, todo el material empleado debe ser esterilizado mediante autoclave, incineración o inmersión en un germicida.

Técnica p. 21  
 Tabla de identificación p. 22  
 Bibliografía p. 24

**Control de calidad**

A los medios, gaterías y reactivos, se les realiza un control de calidad sistemático en los diferentes etapas de su fabricación. Para aquellos que desean hacer su propio control de calidad se recomienda utilizar las siguientes cepas.

1. *Klebsiella pneumoniae pneumoniae* NCTC 8172
2. *Enterobacter cloacae* ATCC 13047
3. *Proteus vulgaris* ATCC 13315
4. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145

	ONPG	ADH	LDH	DOC	DOC	GIT	HIS	URE	TOA	IND	VP1	EGEL	GLU	MAN	IND	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	APA	OX	
1.	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
2.	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
3.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
4.	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

**Limitaciones**

El sistem API 20 E está concebido para identificar bacilos Gram negativos y no exigentes incluídos en la base de datos (ver tabla de identificación en pag 22). No pueden identificarse los microorganismos que no estén incluídos en dicha base de datos.

La interpretación de los resultados debe ser realizada por un analista teniendo en cuenta el contexto clínico, el origen de la muestra estudiada y el aspecto macro y microscópico. Eventualmente deben tenerse en cuenta otros resultados incluído el antibiograma.

TESTS	SUBSTRATOS	REACCIONES/ENZIMAS	RESULTADOS	
			NEGATIVO	POSITIVO
ONPG	ortonitrofenil-galactosido	B-galactosidasa	incoloro	amarillo (1)
ADH	arginina	arginina dehidrolasa	amarillo	rojo/ naranja (2)
LDC	lisina	lisina descarboxilasa	amarillo	naranja
ODC	ornitina	ornitina descarboxilasa	amarillo	rojo/ naranja (2)
[ CIT ]	citrate sódico	utilización del citrato	verde pálido/ amarillo	azul-verde/ azul (3)
H <sub>2</sub> S	tiosulfato sódico	producción de H <sub>2</sub> S	incoloro/ grisáceo	depósito negro
URE	urea	ureasa	amarillo	rojo/ naranja
TDA	triptófano	triptófano desaminasa	<b>TDA / INMEDIATO</b>	
			amarillo	marrón oscuro
IND	triptófano	producción del indol	<b>JAMES / INMEDIATO o IND / 2 min</b>	
			<b>JAMES</b>	
			incoloro verde claro/ amarillo	rosa
			<b>IND</b> amarillo	<b>IND</b> anillo rojo
[ VP ]	piruvato sódico	producción de acetoina	<b>VP 1 más VP 2 / 10 minutos</b>	
			incoloro	rosado/ rojo
[ GEL ]	gelatina de Kohn	gelatinasa	no hay difusión de pigmento negro	difusión de pigmento negro
GLU	glucosa	fermentación/ oxidación (4)	azul/ azul verdoso	amarillo
MAN	manitol	fermentación/ oxidación (4)	azul/ azul verdoso	amarillo
INO	inosito	fermentación/ oxidación (4)	azul/ azul verdoso	amarillo
SOR	sorbitol	fermentación/ oxidación (4)	azul/ azul verdoso	amarillo
RHA	ramnosa	fermentación/ oxidación (4)	azul/ azul verdoso	amarillo
SAC	sacarosa	fermentación/ oxidación (4)	azul/ azul verdoso	amarillo
MEL	melibiosa	fermentación/ oxidación (4)	azul/ azul verdoso	amarillo
AMY	amigdalina	fermentación/ oxidación (4)	azul/ azul verdoso	amarillo
ARA	arabinosa	fermentación/ oxidación (4)	azul/ azul verdoso	amarillo
OX	sobre papel de filtro	citocromo oxidasa	<b>OX / 1-2 minutos</b>	
			incoloro	violeta
NO <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>	tubo GLU	producción de NO <sub>2</sub>	<b>NIT 1 más NIT 2 / 2-3 minutos</b>	
			amarillo	rojo
		reducción a gas N <sub>2</sub>	<b>Zn</b>	
			rojo	amarillo
MOB	RPI M o microscopia	movilidad	inmovil	movil
MCC	medio Mec Conkey	crecimiento	ausencia	presencia
OF	glucosa (RPI OF)	cerrado fermentación abierto oxidación	verde	amarillo
			verde	amarillo

1) Un amarillo muy pálido debe considerarse como positivo

2) Un color naranja después de 24 H. de incubación debe considerarse negativo

3) La lectura debe hacerse en la cupula (aerobiosis)

4) La fermentación empieza en la parte inferior de los tubos, la oxidación empieza en la cupula.

- **PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACION BIOQUIMICA PARA LEVADURAS.**

## SISTEMA DE IDENTIFICACION DE LEVADURAS

Ficha Técnica  
Version A

**API 20 C AUX** es un sistema de identificación precisa de las levaduras más corrientemente encontradas en microbiología clínica.

### Principio

**API 20 C AUX** está constituida por 20 cúpulas conteniendo substratos deshidratados que permiten efectuar 19 tests de asimilación. Las cúpulas son inoculadas con un medio semisólido y las levaduras crecen únicamente si son capaces de utilizar el substrato correspondiente.

La lectura de estas reacciones se hace por comparación con los controles de crecimiento, y la identificación se obtiene con la ayuda de la Tabla de Identificación, el Código Analítico, y el disquete **APILAB**.

- La caja **API 20 C AUX** permite realizar 25 identificaciones. Se compone de:
  - 25 galerías **API 20 C AUX**
  - 25 cámaras de incubación
  - 25 ampollas de **C medium**
  - 25 fichas de resultados
  - 1 ficha técnica
- **API 20 C AUX** se utiliza con:
  - **RAT Medium** (# 9 003 0)
  - **SABOURAUD Medium** (# 9 001 0)
  - Pipetas (# 7 030 0) o Pipettes (# 7 025 0)
  - **McFarland standard** (# 7 090 0) o **Densitometro** (# 1 550 0)
  - Catálogo Analítico **API 20 C AUX** (# 2 029 0) o Disquete **APILAB** (# 3 101 0, 3 104 0)
  - **Suspension Medium, 2ml** (# 7 060 0) o **No O,85 % Medium, 2ml** (# 2 008 0)
  - Gradillo para ampollas (# 7 020 0)

Otro material de laboratorio:

  - estufa (30°C), nevera, mechero Bunsen, rotulador

### Conservación

Las galerías **API 20 C AUX** y las ampollas **C medium** se conservan a 2-8°C hasta la fecha de caducidad indicada en cada envase.

### Lista de tests

GLU	GLUCosa	SOR	SORbitol
GLY	GLICeroI	MDG	α-Metil D-Glucoaida
2KG	2-Keto-D-Gluconato	NAG	N-Acetil-D-Glucosamina
ARA	L-ARAbinosa	CEL	CEllobiosa
XYL	D-XILOsa	LAC	LACtosa
ADD	ADONitroI	MAL	MALtosa
XLT	XILitroI	SAC	SACarosa
GAL	GALactosa	TRE	TREhalosa
INO	INOSitroI	MLZ	MeLeZitosa
		RAF	RAFInosa

### Composición de los medios

• <b>Suspension medium</b> (# 7 060 0)		
Agua destilada estéril	2	ml
• <b>C medium</b> (incluido en la caja)		
Sulfato de amonio	5,0	g
Fosfato monopotásico	0,31	g
Fosfato dipotásico	0,45	g
Fosfato disódico	0,92	g
Cloruro sódico	0,1	g
Cloruro cálcico	0,05	g
Sulfato de magnesio	0,2	g
Histidina	0,005	g
Triptofano	0,02	g
Melionina	0,02	g
Gelosa	0,5	g
Solución de Vitaminas	1	ml
Solución de oligoelementos	10	ml
Agua destilada qsp	1000	ml
pH final : 6,5-6,7		

Aunque este medio contiene agar no necesita fusión previa y so pipetea como un medio líquido.

Es aconsejable sacar las ampollas de la nevera y dejarlas a temperatura ambiente unos horas antes de su utilización. No agitar.

## Técnica

### 1. Preparación de la galería

- Preparar una cámara de incubación y preparar 5 ml aproximadamente en los alveolos para crear una atmósfera húmeda.
- Escribir la referencia de la cepa en la lengüeta lateral de la cámara.
- Sacar la galería de su bolsa hermética y colocarla en la cámara de incubación.

### 2. Preparación del Inóculo

- Abrir una ampolla de *Suspension Medium* (# 7 060 0) o de *NOC 0,85 Medium* (# 2 008 0) o utilizar un tubo conteniendo 2 ml de la misma solución sin aditivos.
- Realizar una suspensión con una turbidez igual al N<sup>o</sup> 2 de la escala de McFarland que se puede medir con la ayuda del *Densitometro ATB 1550* o *McFarland standard*; para ello coger una fracción de una colonia con la ayuda de una pipeta, por aspiración o por toques sucesivos.
- Depositar una gota de la suspensión de levaduras en el medio *ART Medium*.
- Abrir una ampolla de *C medium* y transferir 100 µl (3 gotas de pipeta Pasteur de la suspensión precedente). Homogeneizar con la pipeta evitando la formación de burbujas.

### 3. Inoculación

- Llenar las cúpulas con la suspensión obtenida en *C medium*. Evitar la formación de burbujas, apoyando la punta de la pipeta sobre el borde de la cúpula. Llenar hasta obtener un nivel horizontal o ligeramente convexo, nunca cóncavo. Las cúpulas incompletamente o demasiado llenas pueden dar resultados incorrectos.
- Cerrar la cámara de incubación e incubar 24-72 horas a 30°C.

### 4. Lectura de la galería

- Realizar la lectura después de 24, 48 o eventualmente 72 horas de incubación. Si los tests (y en particular la glucosa) no son muy netos, pasadas 48 horas, observar el crecimiento de las levaduras: la cúpula O sirve de control negativo. Una cúpula MAS TURBIA que el control indica una REACCION POSITIVA, y se anota en la hoja de resultados.

NOTA: en el caso de que la lectura no pueda hacerse a las 72 horas, es posible realizarla al cabo de 4 días.

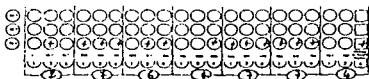
Con el fin de evitar cualquier contaminación, quitar la tapa de la cámara de incubación durante el periodo de lectura.

### 5. Identificación

- La identificación puede hacerse con la *Tabla de Identificación*. Comparar las reacciones anotadas en la *hoja de resultados*.
- El *Catálogo Analítico API 20 C AUX* y el disquete *APILAS* permiten la identificación con el perfil numérico.
- Los tests están separados por grupos de tres y un número 1, 2 o 4 se asigna para cada test. Sumando en el interior de cada grupo los números correspondientes a las reacciones positivas, se obtienen siete cifras que constituyen el perfil numérico.

NOTA: la presencia de hifas (micelio) o pseudohifas (*Pseudomicelio*) constituye el test N<sup>o</sup> 21 con valor 4.

Ejemplo:



2 764 774 *Trichosporon beigelli*

### 6. Eliminación del material utilizado

Después de su utilización, ampollas, cámaras, pipetas y galerías deben ser incineradas o descontaminadas por autoclaveado o *Inmersión* en agua de lejía.

### Limitaciones

El sistema *API 20 C AUX* está sobre todo destinado a la identificación de levaduras aisladas en clínica. Ocasionalmente puede ser necesario realizar otros tests complementarios.

La interpretación de estos tests debe hacerla un microbiólogo considerando el origen de la muestra estudiada.

### Control de calidad

Los medios y galerías son objeto de controles de calidad sistemáticos en las diferentes etapas de su fabricación. El laboratorio que lo desea puede realizar un control bacteriológico con las siguientes cepas:

- |                                    |            |
|------------------------------------|------------|
| 1. <i>Candida albicans</i>         | ATCC 14053 |
| 2. <i>Candida guilliermondii</i>   | ATCC 6250  |
| 3. <i>Candida pseudotropicalis</i> | ATCC 4135  |

	O	GLU	GLY	2KG	ARA	XVL	ADD	GAL	XLT	INO	SOR	MOG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MUZ	RAF	impure	
1.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Técnica

p. 11

Tabla de Identificación

p. 12

Bibliografía

p. 12