

IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DOMINANTES EN UN CONSORCIO MICROBIANO EFICIENTE EN LA DEGRADACIÓN DE DIÉSEL

Dominant species identification of a microbial consortium efficient in diesel degradation

María del Refugio CASTAÑEDA-CHÁVEZ¹, Brenda Yazmín LÓPEZ-SÁNCHEZ¹,
Christian REYES-VELÁZQUEZ¹, Fabiola LANGO-REYNOSO¹ y Manuel Alejandro LIZARDI-JIMÉNEZ^{2*}

¹ Tecnológico Nacional de México / Instituto Tecnológico de Boca del Río. Laboratorio de Investigación de Recursos Acuáticos. C. P. 94290. Boca del Río, Veracruz, México.

² CONACYT - Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Facultad de Derecho, LGAC Estudios Sociales, MDH, C.P. 87210 San Luis Potosí, SLP.

*Autor para correspondencia: malizardiji@conacyt.mx

(Recibido: enero 2021; aceptado: junio 2021)

Palabras clave: biorremediación, hidrocarburos, identificación microbiana, riqueza de especies

RESUMEN

Este estudio muestra las especies microbianas dominantes que conforman un consorcio eficiente en el proceso de degradación de hidrocarburos obtenido de un cenote localizado en Playa del Carmen, en el Caribe Mexicano. Los microorganismos que conforman el consorcio se identificaron mediante diferentes pruebas bioquímicas y fenotípicas. Adicionalmente, se analizaron los índices de número de especies presentes. Se identificaron cinco géneros de bacterias y se logró discernir entre aquellas tolerantes a la presencia de hidrocarburos y las que degradan hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). El 38 % de las bacterias identificadas pertenecieron a las Enterobacteriales, entre ellas: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* y *Proteus mirabilis*; donde *E. coli* es la única bacteria no reportada como hidrocarbonoclasta, pero es tolerante a los hidrocarburos. El 23 % de las bacterias identificadas correspondió a Vibrionales: (*Vibrio cholerae pacini*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*). El 15 % correspondió a Lactobacillales (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y *Streptococcus bovis*). Por último, *Pseudomonas aeruginosa* y *Burkholderia cepacia* representaron el 8 %. Además, se encontró una riqueza microbiana total de especies (OTU) de 6 en los medios agar MacConkey y Endo, así como un índice de Chao1 de 21; ambos correspondientes a las enterobacterias. La identificación de las bacterias y especies dominantes que constituyen al consorcio de este estudio, contribuyen y fortalecen la riqueza del conocimiento para establecer condiciones de crecimiento que permitan lograr una mayor degradación de HAP.

Key words: bioremediation, hydrocarbons, microbial identification, species richness

ABSTRACT

This study shows the dominant microbial species of a microbial consortium efficient in the hydrocarbon degradation, which was obtained from a sinkhole (cenote) in the Mexican Caribbean in Playa del Carmen. The microbial consortium was characterized and identified. The indices of the number of species were also analyzed. Five genera of bacteria corresponding to the consortium were identified, and it was possible to discard those that were only tolerant to hydrocarbons from those that degraded them. The 38 % of bacteria corresponded to Enterobacteriales (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Proteus mirabilis*); *E. coli* is the only not being reported as hydrocarbonoclast but tolerant to hydrocarbons. The 23 % corresponded to Vibrionales (*Vibrio cholerae pacini*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus*). The 15 % corresponded to Lactobacillales (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, and *Streptococcus bovis*). Lastly, *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* represented 8 % of the total. The observed total microbial species richness (OTU) was 6 in the MacConkey agar and Endo agar media, as well as a Chao1 index of 21, both corresponding to enterobacteria. The identification of the bacteria and dominant species in the consortium carried out in this study contributes to the knowledge for establishing growth conditions to achieve a more significant degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons.

INTRODUCCIÓN

Las actividades petroleras a lo largo del tiempo han originado problemas ecológicos, sociales y económicos que se han acumulado de manera importante.

En México, desde antes de la expropiación petrolera en 1938 la demanda interna del petróleo ya presentaba señales de un aumento importante. En 1940 se presentó un incremento en el volumen de producción de la industria nacional (Uthoff 2010), lo que provocó que la empresa Petróleos Mexicanos (PEMEX) ocupara el tercer lugar a nivel mundial como productor de crudo, y se posicionara como uno de los pilares de la economía nacional (Pérez 2017). Sin embargo, fincar la economía nacional en la explotación de hidrocarburos ha generado un impacto importante ubicando a PEMEX como una empresa altamente contaminante (Lizardi-Jiménez y Mendezcarlo 2021).

Actualmente, la producción petrolera tiene serios conflictos con lo social y ambiental (Ulloa 2014). La contaminación con petróleo y sus derivados es reconocida como uno de los problemas con mayor impacto ambiental en diferentes regiones de México y del mundo (Scholz-Böttcher et al. 2008).

Los derrames de hidrocarburos son una de las principales fuentes de contaminación de suelos y aguas, que generan perturbaciones que afectan la estructura y bioprocesos de los ecosistemas. Las fugas de los buques transportadores de petróleo

producen mantos superficiales hidrofóbicos (Jain et al. 2011) que tienen impacto negativo sobre el plancton y la fauna marina.

Este tipo de contingencias ambientales impactan directamente en la biota de los ecosistemas, pues los hidrocarburos dañan a la flora, fauna y humanos, pero principalmente a los microorganismos, que representan una parte importante de los ecosistemas para los procesos biogeoquímicos (Zamora et al. 2012).

La biorremediación surge como una alternativa biotecnológica para reducir y mitigar los daños en aguas y suelos contaminados por los derrames de hidrocarburos (Lizardi-Jiménez et al. 2012). La aplicación de microorganismos, plantas o enzimas en la biorremediación, se basa en su capacidad de oxidar los hidrocarburos, degradándolos hasta metabolitos o compuestos transformables en dióxido de carbono, agua y biomasa (Bracho et al. 2004, Ferrera-Cerrato et al. 2006).

Gracias a las interacciones entre las diferentes especies de los consorcios microbianos, estos tienen una mayor capacidad de degradación de sistemas complejos debido a la cantidad de genes que codifican los diferentes sistemas enzimático de todo el conjunto de microorganismos (Ochoa y Montoya 2010). Es decir, las interacciones microbianas promueven la degradación de las mezclas complejas de hidrocarburos presentes en un sitio contaminado (Barrios-San Martín et al. 2012).

La aplicación biotecnológica del consorcio microbiano hidrocarbonoclasta obtenido de un cenote cercano a Playa del Carmen Quintana Roo, México (Lizardi- Jiménez et al. 2014), ha demostrado ser eficiente en el proceso de biodegradación de hidrocarburos, logrando una degradación de diésel del 98.47 ± 0.38 % de una concentración inicial de 13 g/L, en un biorreactor con agitación por aire. En este proceso solamente se identificaron tres géneros *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Diplococcus* (Medina-Moreno et al. 2014). La falta de identificación de otros géneros microbianos que conforman el consorcio es detrimental para el proceso de biorremediación, ya que desconocer las características óptimas para el crecimiento de microorganismos clave del ambiente contaminado con hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) evita poder establecer condiciones de operación que favorezcan el crecimiento y por ende la actividad metabólica de la remoción de los hidrocarburos. Como consecuencia, un proceso de biorremediación necesita operar en condiciones estandarizadas y posiblemente no óptimas. Es esperable que la identificación a nivel de especies que conforman el consorcio permita generar una base de datos con las condiciones de crecimiento de cada microorganismo, y así establecer condiciones generales que permitan el desarrollo de las especies clave para el proceso de biorremediación.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar los índices de riqueza microbiana de un consorcio microbiano hidrocarbonoclasta, mediante la caracterización e identificación de las especies mediante técnicas bioquímicas y fenotípicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Conorcio microbiano y cultivo en biorreactor madre

El consorcio bacteriano hidrocarbonoclasta utilizado en este estudio fue obtenido por Medina-Moreno et al. (2014) en un cenote de Playa del Carmen, Xca-Ha (20°39' 43.59" N, 87°4' 7.25" W). El consorcio se inoculó en un biorreactor de 1000 mL con agitación por aire por lote secuencial, con medio mineral (g/L): 6.75, NaNO₃ (J.T. Baker, 99.9 %); 2.15, K₂HPO₄ (J.T. Baker, 99.3 %); 1.13, KCl (J.T. Baker, 99.9 %), 0.54, MgSO₄·5H₂O (J.T. Baker, 100.1 %) (Medina-Moreno et al. 2005). El pH se ajustó a 6.5 con HCl 1.0 M.

Escalamiento descendente

Se tomó una muestra del consorcio inoculado en el biorreactor con agitación por aire para generar

un nuevo inóculo en un matraz aireado de 500 mL. La inoculación se llevó a cabo bajo condiciones asépticas en relación v/v, 90 % de agua de mar, 10 % de la biota del consorcio inoculado en un biorreactor madre (con agitación por aire) con 13 g/L de diésel (fuente de carbono), acidificando el cultivo a un pH de 6.5 con HCl 1.0 M. La fuente de nitrógeno fue de 6.75 g/L NaNO₃ (Lizardi-Jiménez et al. 2012) y la aireación fue por bombas de aire convencionales marca Elite modelo 801 (0.63 vvm). El matraz aireado se operó en periodos de 14 días (Medina-Moreno et al. 2014). Cada 14 días de operación, se adicionó nuevamente 13 g/L de diésel con densidad de 850 kg/m³ como fuente de carbono, así como medio para aforar el volumen del biorreactor; se ajustó el pH a 6.5 con HCl 1.0 M.

Se tomaron muestras (10 mL) del matraz y se centrifugaron siguiendo los parámetros establecidos por Lizardi-Jiménez et al. (2012) a 4000×g durante 30 min a 4 °C. Se obtuvieron tres fases: diésel, acuosa y sólida. Los sólidos suspendidos (SS) se lavaron con una solución isotónica (NaCl 0.9 %). Se analizó la densidad óptica en un espectrofotómetro UV visible UV-Vis Thermo Scientific™ Evolution™ 260 Bio para medir los SS a una absorbancia de 625 nm.

Aislamiento e identificación de microorganismos

En condiciones asépticas, se preparó y esterilizó en autoclave a 15 psi (134 °C) una solución salina (Aquiahuatl et al. 2012) (NH₄)₂SO₄ 5.0 g/L, MgSO₄·7H₂O 2.0 g/L, K₂HPO₄ 2.0 g/L, FeSO₄·7H₂O 0.1 g/L, a pH 6.5 ajustado con HCl 1.0 M. Adicional, se acondicionaron tubos de ensayo con 9 mL de solución salina y 1 mL del consorcio para realizar diluciones sucesivas.

A partir de la dilución 10⁻³, se tomó una muestra con asa de platino para sembrar por estriado en el medio selectivo agar Bushnell Haas 1 % v/v de diésel estéril (esterilización por exposición a rayos UV).

Posteriormente, las cajas Petri se incubaron a 30 °C durante siete días (siguiendo las recomendaciones del fabricante). Las colonias aisladas fueron sembradas en medios selectivos: agar para *Pseudomonas* F, agar para *Pseudomonas* P, agar MacConkey para bacterias entéricas, agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) para *Vibrio Cholerae*, agar endo y agar bilis esculina para estreptococos D. Las colonias aisladas de los medios selectivos se sembraron en agar de tripticasa de soja para continuar con el aislamiento hasta obtener colonias puras para su caracterización morfológica e identificación bioquímica (Holt et al. 1994).

Caracterización e identificación

En el proceso de identificación bacteriana se establecieron los métodos de identificación fenotípica

y bioquímica basados en las características observables: morfología, crecimiento, propiedades metabólicas y bioquímicas. Cuando estas características se completaron, se continuó con el aislamiento del microorganismo para su identificación. Para llevar a cabo este proceso, “en el cultivo es esencial la correcta elección del medio de crecimiento y las condiciones de incubación” (Bou et al. 2011).

Las pruebas primarias llevadas a cabo en la caracterización fenotípica fueron: tinción de Gram, morfología, catalasa, oxidasa, oxidación-fermentación, fermentación de glucosa, producción de esporas, crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis y movilidad. Utilizando estas pruebas, generalmente es posible identificar los géneros de las bacterias (Schwartz 1967).

Para la caracterización bioquímica de las colonias aisladas (previamente identificadas por la caracterización fenotípica), se utilizaron las siguientes pruebas en cultivos incubados de 18 a 24 horas: prueba de oxidasa, prueba de catalasa, prueba de movilidad, prueba de ornitina descarboxilasa y prueba de indol.

Análisis de los índices de número de especies presentes en el consorcio

El análisis de la comunidad bacteriana del consorcio hidrocarbonoclasta se determinó con el programa

PAST 3.17 de acuerdo con el índice de Chao-1 para estimar la riqueza total de especies y la acumulación de especies (OTU).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización e identificación microbiana de consorcio

La serie de pruebas bioquímicas y fenotípicas que se realizaron, permitieron la caracterización del consorcio. La **Fig. 1** indica que las enterobacterias (familia Enterobacteriaceae) predominaron en el consorcio (38 %). Siguió los vibrios (*Vibrionaceae*) presentes en un 23 %, los enterococos en 15 % y por último en porcentajes de 8 %, se encuentran los estreptococos (*Streptococcaceae*), *Burkholderia* (*Burkholderiaceae*) y las *Pseudomonas* (*Pseudomonadaceae*).

El **cuadro I** muestra los géneros y especies que componen el consorcio microbiano hidrocarbonoclasta de Playa del Carmen, de los cuales se encontraron nuevos géneros a los cultivos aislados e identificados anteriormente por Medina-Moreno et al. (2014), *Pseudomonas* y *Vibrio*. En la presente investigación se encontraron dos tipos de diplococos pertenecientes a los géneros *Enterococcus* y *Streptococcus*.

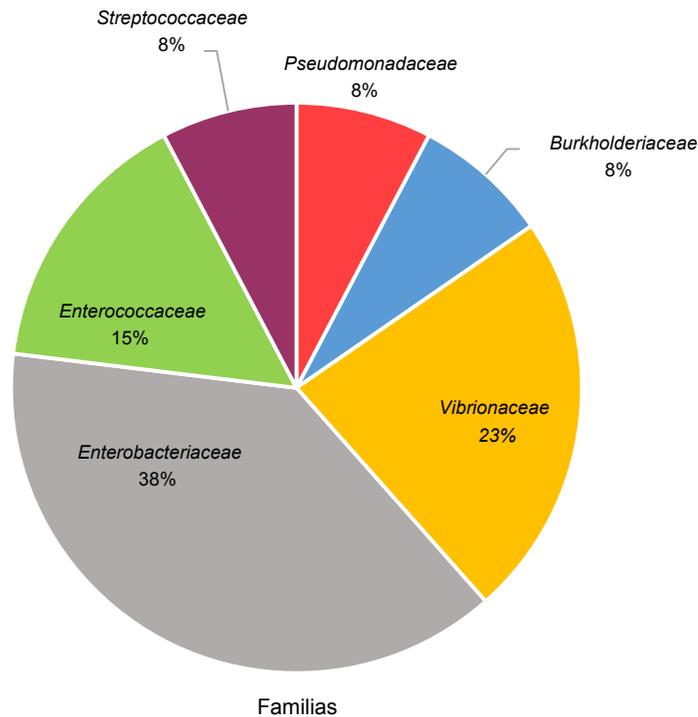


Fig. 1. Principales familias presentes en el consorcio microbiano hidrocarbonoclasta de Playa del Carmen Quintana Roo, México.

CUADRO I. ÓRDENES Y ESPECIES QUE COMPONEN EL CONSORCIO MICROBIANO HIDROCARBONOLASTA DE PLAYA DEL CARMEN.

Orden	Género y especie
Enterobacteriales	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Shigella flexneri</i>
Vibrionales	<i>Vibrio cholerae pacini</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>Vibrio vulnificus</i>
Lactobacillales	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Streptococcus bovis</i>
Pseudomonadales	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Burkholderiales	<i>Burkholderia cepacia complex</i>

Del género *Pseudomonas*, se confirmó la presencia de la especie *P. aeruginosa*. Además, del género *Vibrio* reportada anteriormente por Medina-Moreno et al. (2014) se confirmaron las tres especies: *V. cholerae pacini*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*.

Los géneros encontrados en la presente investigación, no reportados anteriormente, son *Burkholderia*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* y *Proteus*.

Las colonias de *Pseudomonas* F presentaron formas circulares a irregulares, elevaciones convexas a elevadas, márgenes ondulados a filamentosos. Algunas colonias presentaron color amarillo verdoso, el cual, al ser expuesto a luz UV presentó fluorescencia debido a la presencia de fosfato dipotásico que contiene el medio (agar *Pseudomonas* F) que induce la producción del pigmento hidrosoluble pioverdina (fluoresceína).

Ausina y Moreno (2005) reportaron que las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* presentan una coloración amarillo verdosa, indicando la producción del pigmento hidrosoluble pioverdina, características que presentaron las colonias identificadas en esta investigación.

Las colonias de *Pseudomonas* P presentaron formas circulares e irregulares, elevaciones planas, convexas y elevadas, margen entero, en las cuales se presentó muy poca o inexistente fluorescencia con luz UV. Las colonias que reaccionaron a la exposición de luz UV presentaron un color marrón oscuro (Ryan 2010), característico del pigmento hidrosoluble piomelanina (Rabelo-Flores et al. 2020).

Las especies de *Pseudomonas*, en especial *Pseudomonas aeruginosa*, producen piomelanina, un pigmento de color café claro, especialmente si se incubaba

a una temperatura menor a 37 °C (Ausina y Moreno 2005, Martínez 2017), lo que permite su identificación.

La alimentación continua del consorcio en el matraz aireado propició el incremento de su biomasa. La densidad de las bacterias fue superior al rango de 3.0 x 10⁸ unidades formadoras de colonias (UFC)/mL.

Posterior a los ensayos realizados, se comparó la presencia de *Pseudomonas* en consorcios alimentados con diferentes fuentes de carbono: diésel y hexadecano. El medio del consorcio inoculado con diésel no presentó una coloración diferente a la de la fuente de carbono (amarillo-dorado). El consorcio inoculado con hexadecano presentó un cambio de coloración, tornándose a color verdoso, esto indicó que había una mayor presencia del pigmento hidrosoluble pioverdina (fluoresceína) en el medio. El resultado fue una mayor respuesta a la luz UV. A partir de esto, se realizó la siembra de ambos consorcios en los medios agar para *Pseudomonas* F y agar para *Pseudomonas* P, propiciando la presencia de pioverdina en las colonias del medio para *Pseudomonas* F de los cultivos en diésel y hexadecano, con fluorescencia bajo luz UV (**Fig. 2**). Las colonias en agar para *Pseudomonas* P presentaron poca fluorescencia con luz UV debido a que el pigmento hidrosoluble fue piomelanina.

Diversos estudios indican la efectividad de *Burkholderia cepacia* en la degradación de asfalto (Balogun et al. 2015), diésel, queroseno y HAP como el tolueno, anilina, naftaleno y fenol (Revathy et al. 2015). A su vez, *P. aeruginosa*, ha demostrado la capacidad de degradar no solo diésel (80 %), sino también petróleo crudo, gasolina, benceno, tolueno, xileno, naftaleno, fenantreno y pireno (Ueno et al. 2006). Ambas bacterias podrían ser responsables

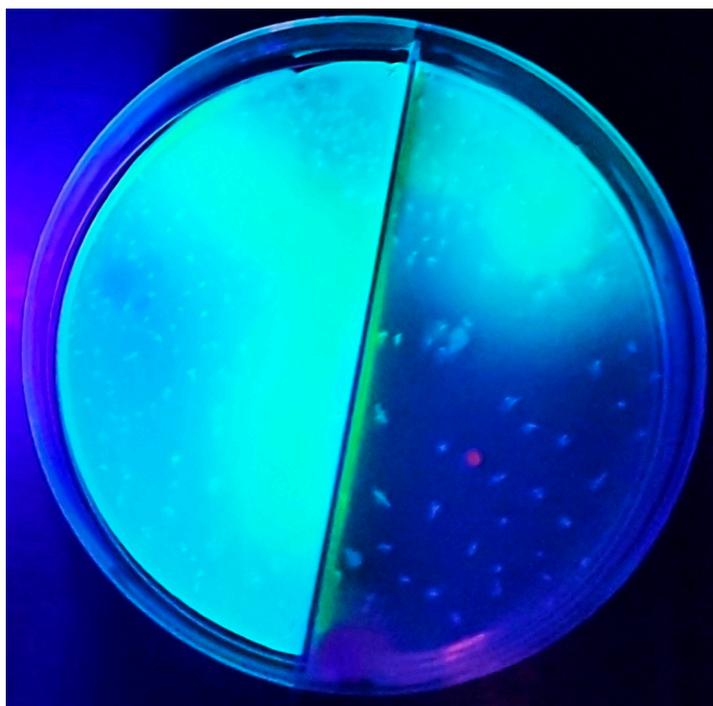


Fig. 2. Presencia de ploverdina en las colonias inoculadas con hexadecano y diésel. Lado izquierdo: cultivos con hexadecano. Lado derecho: cultivos con diésel. La fotografía se tomó a la caja Petri mientras las colonias eran expuestas a la luz UV a una distancia focal de 27 mm con una sensibilidad ISO de 3200 y una resolución de 3456x4608.

de la principal degradación de HAP en elevadas concentraciones a pesar de no ser las especies dominantes en el consorcio (8 % cada una, **Fig. 1**).

Los otros cultivos puros identificados corresponden al género *Vibrio*. Sin embargo, a pesar de su capacidad hidrocarbonoclasta (Cookson 1995), su uso y liberación a un ambiente determinado representa un riesgo para la salud humana por sus características patógenas (Smith et al. 2012). Adicionalmente, debido a su naturaleza marina, su aislamiento fue lento debido a que las UFC del consorcio fueron muy pocas o posiblemente su tasa de eficiencia en la degradación de diésel no es elevada. La presencia de *Vibrio*, también fue reportada en este consorcio por Medina-Moreno et al. (2014).

Los géneros de las enterobacterias identificadas son *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Enterococcus*, así como posiblemente la especie *Escherichia coli*. Sin embargo, debido a que no se encuentra transformada con la proteína 70 kDa 8p70 (Ricoy et al. 2012), sólo se trata una especie patógena tolerante a hidrocarburos (Roy et al. 2002).

Klebsiella pneumoniae, fue una de las enterobacterias presentes en mayor proporción en el consorcio que cuenta con diversos estudios que demuestran su capacidad para degradar HAP (Roy et al. 2002) e hidrocarburos específicos (You et al. 2018).

Salmonella typhimurium, es otra enterobacteria identificada que forma parte del consorcio de Playa del Carmen y su crecimiento ha sido reportado utilizando el medio de cultivo Salmonella-Shigella (Lizardi-Jiménez et al. 2016) en la degradación de diésel. Diversos estudios confirman su actividad hidrocarbonoclasta en la degradación de n-alcenos (Plohl y Leskovšek 2002). Su uso en la degradación de HAP es debatible debido a que también es considerada como un indicador de la existencia de patógenos de elevado riesgo para la salud (Leal-Bautista et al. 2011) en humanos y animales. Los seres humanos pueden infectarse por el consumo de alimentos de origen animal contaminados; los síntomas consisten en diarrea, fiebre, dolor de cabeza, náuseas, dolor abdominal, vómitos y, con menor frecuencia, sangre en las heces (Poppe et al. 1998). Una vez liberada la bacteria del tracto gastrointestinal animal, puede transportarse a las aguas

superficiales a través de la lluvia y escorrentías superficiales, además de sobrevivir a la radiación UV solar, la escasez de nutrientes, los cambios de pH y temperatura (Wiedemann et al. 2015). Su presencia en las aguas superficiales de riego es otro vector para su transmisión (Liu et al. 2018).

El potencial de degradación de la enterobacteria *Shigella* se infiere por la identificación de cuatro enterobacterias presentes en el consorcio hidrocarbonoclasta de Playa del Carmen durante la degradación de diésel (Lizardi-Jiménez et al. 2015). Similar al género *Salmonella*, *Shigella* es considerado como un agente patógeno indicador que degrada o tolera hidrocarburos. Se ha identificado que *Shigella flexneri* degrada o tolera hidrocarburos como diésel y gasolina en medio Bushnell Haas, como fue demostrado en estudios de bacterias aisladas del tracto intestinal de algunos peces, las cuales presentaron capacidad hidrocarbonoclasta (Kayath et al. 2019). Su presencia en el consorcio de Playa del Carmen confirma la contaminación fecal presente en cuerpos de agua subterráneos en Yucatán debido a la actividad turística de la región (Reul et al. 2015).

El género *Proteus* es considerado como uno de los más eficientes en la degradación de HAP (Duniya et al. 2016), petróleo crudo y diésel (Guevara-Luna et al. 2022).

En el trabajo de Medina-Moreno et al. (2014) se documentó la contaminación por hidrocarburos en cenotes de Quintana Roo como consecuencia de la actividad turística en temporada vacacional. Adicional, se obtuvo un consorcio nativo de un cenote contaminado con hidrocarburos con presencia de los géneros *Proteus*, *Klebsiella* y *Escherichia*. Este consorcio fue exitosamente cultivado en un biorreactor en lote utilizando diésel como fuente de carbono.

El género *Proteus*, posible especie *mirabilis*, fue identificado. Su presencia ha sido reportada en estudios donde el consorcio fue inoculado en un biorreactor con medio mineral y diésel como fuente de carbono (Lizardi-Jiménez et al. 2016).

El género *Streptococcus* es degradador de diversos hidrocarburos capaz de crecer medio Bushnell Haas, en donde se demostró su capacidad de degradar xileno, petróleo, diésel, keroseno, naftaleno e hidrocarburos totales de petróleo (Priyank et al. 2015). Además, se observó que logra descomponer bifenilo, alcanfor y fenantreno (Kafilzadeh et al. 2011) y es una especie dominante en la degradación de crudo evaluada en caldo Luria Bertani (LB) (Kumar et al. 2013).

Otra de las especies identificadas fue *Enterococcus faecalis*, una especie conocida por su habilidad de disolver fosfatos (Rahayu 2019). Su participación en el consorcio de Playa de Carmen se basa en diversos estudios que afirman su capacidad para degradar hidrocarburos del crudo de petróleo, en donde ha demostrado una eficiencia del 95.45 % de degradación y a su vez ha demostrado la capacidad para producir grandes cantidades de biosurfactantes (Nikhil et al. 2013).

Los biosurfactantes son productos biotecnológicos con actividad tensoactiva, emulsificante y dispersante, por lo que su participación en la degradación de hidrocarburos es fundamental. Actúan reduciendo la tensión superficial entre la fase acuosa y la fase oleosa del medio, solubilizando al contaminante y aumentando la biodisponibilidad para el microorganismo. La presencia de *Enterococcus* sp. en el consorcio de Playa del Carmen lo posiciona como la bacteria principal en la producción de biosurfactantes, y como una de las especies que participa en la oxidación de los hidrocarburos.

Existe poca información sobre la capacidad hidrocarbonoclasta de *Enterococcus* sp. pero se sabe que degrada hidrocarburos totales del petróleo (García-Bautista 2016). En la presente investigación se demostró que participó en la degradación de hidrocarburos del diésel, sin embargo, aún se necesita evaluar la degradación de hidrocarburos específicos, determinar las tasas de remoción y determinar la producción de biosurfactantes, de manera individual y en consorcio.

A pesar de que la bacteria no fue expuesta a pruebas que corroboren su desempeño en la producción de biosurfactantes, existen antecedentes de ensayos donde se probó su potencial de producción de biosurfactantes. Santos (2017) analizó 23 cepas bacterianas aisladas del pozo petrolero LG-276-F1, del bloque Junín de la Faja Petrolífera del Orinoco (FPO), entre las que se encontraba *Enterococcus*. Las cepas fueron expuestas a diferentes métodos de detección por actividad específica donde el 83% de las cepas presentó potencial de producción de biosurfactantes Santos (2017). Debido a que su presencia propicia la ruptura de las moléculas hemolíticas, dando como resultado la formación del halo transparente alrededor de la bacteria, (Carrillo et al. 1996, Youssef et al. 2004, Plaza et al. 2006, Thavasi et al. 2008) se plantea que, a mayor diámetro del halo, mayor será la concentración del biosurfactante producido.

Análisis del número de especies presentes en el consorcio

El análisis de la comunidad bacteriana del consorcio hidrocarbonoclasta de Playa del Carmen, determinada con el programa PAST 3.17 se encuentra en el **cuadro II**. La comunidad a analizar es el consorcio, por esta razón se tomaron como “áreas” cada uno de los medios diferenciales y selectivos en donde se realizaron las siembras para la identificación de las especies. El número de OTU son las especies que se encontraron en

cada uno de los medios selectivos.

Analizando la riqueza total de especies por cada uno de los medios selectivos y diferenciales en los medios agar Endo y agar MacConkey, se corroboran los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas que indicaron que el consorcio se conforma en su mayoría (38 %) de enterobacterias (**Fig. 1**).

En la **figura 3** se muestra el patrón de acumulación de especies y patrón de rarefacción para la acumulación de especies-abundancia en cada

CUADRO II. ÍNDICE DE RIQUEZA DE ESPECIES Y RIQUEZA TOTAL DE ESPECIES DEL CONSORCIO MICROBIANO DE PLAYA DEL CARMEN.

MEDIOS SELECTIVOS	Agar Pseudomonas F	Agar Pseudomonas P	Agar TCBS	Agar Endo	Agar MacConkey	Agar bilis esculina
ESPECIES						
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	1	0	0	0	0
<i>Burkholderia cepacia complex</i>	1	1	0	0	0	0
<i>Vibrio cholerae pacini</i>	0	0	1	0	0	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0	0	1	0	0	0
<i>Vibrio vulnificus</i>	0	0	1	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	1	1	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0	0	1	1	0
<i>Salmonella typhimurium</i>	0	0	0	1	1	0
<i>Shigella flexneri</i>	0	0	0	1	1	0
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	0	1	1	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	0	1	1	1
<i>Enterococcus faecium</i>	0	0	0	0	0	1
<i>Streptococcus bovis</i>	0	0	0	0	0	1
Acumulación de especies (OTU)	2	2	3	6	6	3
Índice de riqueza total de especies (Chao-1)	3	3	6	21	21	6

uno de los medios selectivos y diferenciales. Para la curva de acumulación de especies, la mayor concentración de especies (6) se encuentra en los puntos correspondientes a los medios agar Endo y agar MacConkey pertenecientes a las enterobacteriales. Les siguen valores de tres especies para los medios agar TCBS y agar bilis esculina, que comprenden los órdenes Vibrionales y Lactobacillales, respectivamente. Por último, los correspondientes a los medios agar para *Pseudomonas* F (PF) y agar para *Pseudomonas* P (PP) fueron los órdenes Pseudomonadales y Burkholderiales (2 especies). En la **figura 3** también se aprecia que las desviaciones fueron menores en los OTUs más pequeños, lo que puede indicar que el decaimiento de la acumulación de especies no está comprometido con los medios de cultivo, debido a que cada uno de ellos es limitante en el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos.

Es común utilizar los índices de diversidad alfa, beta y omega para el análisis de una comunidad, siempre y cuando se cuente con los individuos de cada una de las especies. Debido a que el propósito de la presente investigación fue la identificación de las especies que constituyen el consorcio, no se llevó a cabo el conteo de UFC del crecimiento de las colonias en cada uno de los medios selectivos

y diferenciales. Por lo anterior, el índice de Chao1 fue seleccionado para estimar la estimar la riqueza total de especies.

En la curva de rarefacción para el cambio de valor esperado de riqueza de especies de acuerdo con índice Chao1, se obtuvo un valor máximo de una acumulación de especies-abundancia en los medios agar Endo y agar MacConkey que constituyen el 38 % de las bacterias que pertenecen a las Enterobacteriales. Los datos generados con el análisis de especies mediante la aplicación del estimador no paramétrico fueron útiles para la generación de una base de datos del consorcio, que indicó la acumulación de especies pertenecientes a las enterobacterias.

Para contribuir al conocimiento de la diversidad microbiana del consorcio de Playa del Carmen, es pertinente realizar un análisis metagenómico que permita obtener información sobre genes o grupos de genes funcionales en la comunidad microbiana. La información obtenida de las librerías metagenómicas será utilizada para determinar la diversidad de la comunidad, ampliando los índices utilizados en la presente investigación, así como su actividad metabólica (Steele et al. 2005). A pesar de ciertas limitaciones, las técnicas metagenómicas permiten acceder al potencial genético de una comunidad

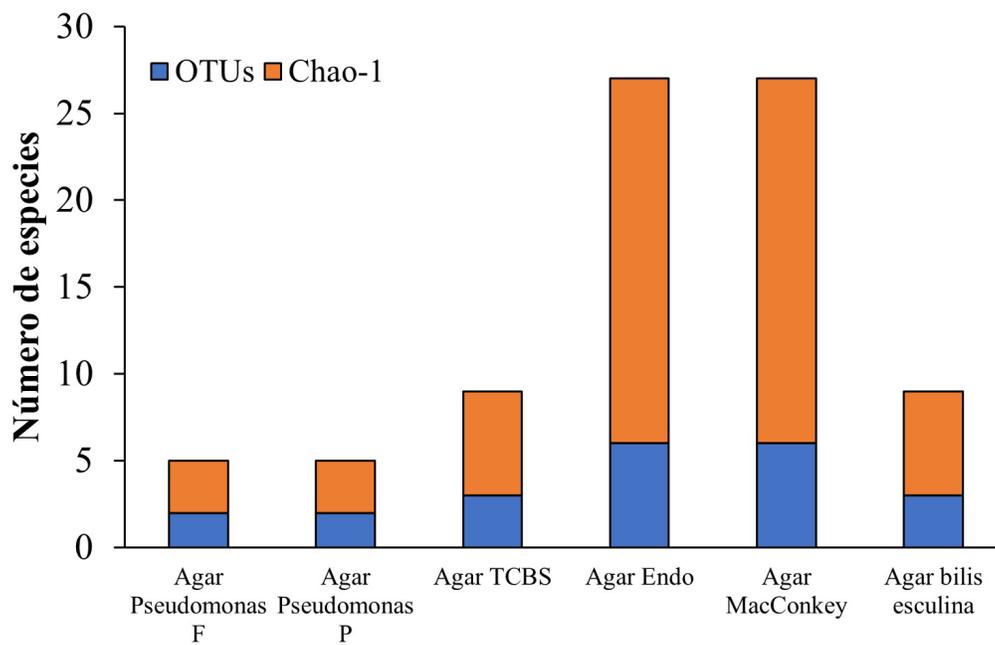


Fig. 3. Curva de acumulación de especies y rarefacción para la acumulación de especies-abundancia en cada uno de los medios selectivos y diferenciales.

microbiana de una forma más completa (Ferrer et al. 2009, Simón et al. 2009) que con los métodos tradicionales de cultivo en medios selectivos.

Se realizó la revisión bibliográfica para identificar las condiciones de crecimiento hidrocbonoclastas de cada una de las bacterias identificadas en el consorcio (**cuadro III**). En el caso de *P. aeruginosa*, presenta un amplio intervalo de pH y temperatura. De acuerdo con Klein et al. (2009), el pH de crecimiento va de 4.5 a 9.5 en ambientes naturales acuáticos y terrestres, y recomiendan una temperatura óptima de crecimiento a 37 °C para su manejo en laboratorio de análisis clínico. El pH óptimo se ubica entre 5.4 y 8.2 (Klein et al. 2009). El intervalo de temperatura de supervivencia es de 4 a 45 °C, siendo las óptimas de 20 a 45 °C (Tsuji et al. 1982). La temperatura ambiente (entre 19 y 24.9 °C) en la que operó el reactor se indica en la **figura 4**. LaBauve y Wargo (2012) indican que los medios LB y MMS son los adecuados para el mantenimiento y crecimiento de esta bacteria y para su manejo en laboratorio de análisis microbiológico y genético.

B. cepacia crece en medio mínimo de sales (MMS) en intervalos de temperatura que van de 20 a 50 °C y pH de 3 a 11 (Ordoñez-Burbano et al. 2019), siendo los óptimos pH 7 y 40 °C (Balogun et al. 2015). El medio TB es apto para su crecimiento (Ahn et al. 2014), al igual que los medios infusión cerebro corazón (BHI) (Rodríguez-Rodríguez et al. 2009) y Bushnell Haas (BH) (Bacosa et al. 2012).

Las bacterias del género *Vibrio* necesitan NaCl para crecer (Chart 2012), tolerando un amplio intervalo de salinidades que dependen de la especie, aunque el requerimiento óptimo suele ser de 2.0 a 2.5 % (peso/volumen) (Baumann et al. 1984). Algunas especies halófilas requieren al menos 0.5 % de NaCl, mientras que las especies no halófilas como *V. cholerae*, *V. mimicus* o *V. hispanicus*, pueden crecer en MMS (Gómez-Gil et al. 2004, Leyton y Riquelme 2008) y Bushnell Haas. La mayoría de las especies del género *Vibrio* son mesofílicas. Por ejemplo, Percival et al. (2014) señalan intervalos de 20 a 40 °C, mientras que Chart (2012) de 30 a 42 °C. El género *Vibrio* presenta baja tolerancia a los medios ácidos, prefiriendo condiciones alcalinas en el intervalo de pH de 6.8 a 10.2 (Percival et al. 2014).

K. pneumoniae crece en el intervalo de 25 a 42 °C. con tolerancia de pH de 5.4 y 8.2, los óptimos 6 a 7.5 (Tsuji et al. 1982). Los medios de cultivo adecuados son el medio Bushnell Haas (Chikere et al. 2014) y solución salina al 0.9 % (Infante et al. 2014).

Salmonella no es una bacteria exigente, crece en medios glucoso-salinos, obteniendo mejores

resultados en medios altamente suplementados (Tajkarimi 2007), además del medio Bushnell Haas de 3.5 a 37 °C (Matches et al. 2006).

Shigella flexneri crece en los medios Bushnell Haas, Luria Bertani e infusión cerebro corazón (Kayath et al. 2019) con tolerancia al pH de 5 a 9, óptimo de 6 a 8 y temperaturas de 4 a 49 °C (Zaika et al. 2001).

P. mirabilis crece en los medios infusión cerebro corazón (Xilinas et al. 1975), Bushnell Haas (Chikere et al. 2014) y LB (Pérez et al. 2007, Tsuji et al. 1982).

Los enterococos crecen en medios complejos y medios con altas concentraciones de NaCl (Fisher et al. 2009); tienen un amplio intervalo de tolerancia de pH (Kayaoglu et al. 2005) y temperaturas (Nakajo et al. 2005).

Los estreptococos crecen en los medios LB y Bushnell Haas (Patel et al. 2015) a pH 6-8, óptimo 7 y 8, 30-45 °C, óptimo de 35 °C (Patel et al. 2015).

El análisis de las condiciones de cada una de las especies degradadoras que constituyen el consorcio, permite proponer las condiciones aptas para el crecimiento como consorcio basado en los requerimientos de los individuos. Los medios donde pueden ser inoculadas las bacterias y llevar a cabo su proceso metabólico son: caldo Bushnell Haas (debido a que la mayoría de las especies crecen en ese medio aun cuando éste no se encuentra contaminado con hidrocarburos), y el medio mineral (g/L): 6.75, NaNO₃ (J.T. Baker, 99.9 %); 2.15, K₂HPO₄ (J.T. Baker, 99.3 %); 1.13, KCl (J.T. Baker, 99.9 %), 0.54, MgSO₄·5H₂O (J.T. Baker, 100.1 %). Para ambos medios, el pH puede ajustarse entre 6.5 y 7 con HCl 1.0 M, las temperaturas óptimas están en el rango de 35 a 40 °C, como fuente de carbono se puede utilizar diésel, hexadecano o petróleo crudo.

Por otro lado, la metagenómica es un enfoque estratégico para analizar las comunidades microbianas y con ello tener un análisis completo de la diversidad de especies presentes en un consorcio bacteriano; Devarapalli y Kumavath (2015) mencionan que este tipo de enfoques representan una actualización tecnológica en técnicas de biorremediación ex situ como los biorreactores, ya que permitirían conocer especies que no son cultivables, así como ajustar la asociación y variación de las especies del consorcio para hacerlo más eficiente.

Los datos que se generen permitirían una reingeniería en el diseño de un biorreactor operado bajo los requerimientos comunes de la mayoría de las especies o de las especies más relevantes del

CUADRO III. REQUERIMIENTOS PARA EL CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS HIDROCARBONOCLASTAS QUE CONFORMAN EL CONSORCIO DE PLAYA DEL CARMEN.

Bacteria	pH	Temperatura (°C)	Medio	Referencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4.5 - 9.5 Óptimo 5.4 – 8.2	4 – 42 Óptimo 37	LB1, MMS2, BH3	(Klein et al. 2009) (LaBauve y Wargo 2012) (Tsuji et al. 1982)
<i>Burkholderia cepacia complex</i>	3 - 11 Óptimo 7	20 – 50 Óptimo 40	BHI4, MMS, TSB5, BH	(Klein et al. 2009) (Ordoñez et al. 2018) (Balogun et al. 2015)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	6.5 – 12.2 Óptimo 6.5 – 9.6	20 – 40	BH, MMS. Salinidad de 2.0 a 2.5 % de NaCl; algunas halófilas requieren un mínimo de 0.5 % de NaCl y las no halófilas crecen en medio mínimo de sales	(Chart 2012) (Percival et al. 2014)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5.4 – 8.2 Óptimo 6 – 7.5	25 30 37 42 Óptimo 35	BH y solución salina al 0.9 %	(Tsuji et al. 1982) (Robinson y Wemedo 2019) (Infante et al. 2012)
<i>Salmonella typhimurium</i>	3.7 – 9 Óptimo 6.5 - 7.5	5 – 45 Óptimo 35 – 37	MMS, BH	(Tajkarimi 2007) (Matches y Liston 2006) (Catelani et al. 1970)
<i>Shigella flexneri</i>	5 – 9 Óptimo 6 - 8	4 – 49	BH, LB, BHI	(Duniyaka et al. 2016) (Kayath et al. 2019) (Zaika 2001)
<i>Proteus mirabilis</i>	4.5 – 8 Óptimo 6.8	20 – 43 Óptimo 37	BHI, BH, LB	(Tsuji et al. 1982) (Xilinas et al. 1975) (Robinson y Wemedo 2019) (Pérez et al. 2007)
<i>Enterococcus</i> sp	4 – 11 Óptimo para crecimiento 8.5 Óptimo para evitar adhesión 7.1	5 – 65	Medio complejo Medio con altas concentraciones de NaCl	(Nakajo et al. 2005) (Fisher y Philips 2009) (Stuart et al. 2006) (Ramsey et al. 2014)
<i>Streptococcus</i> sp	6 – 8 Óptimo 7 y 8	30 – 40 Óptimo 35	LB, BH	(Rahman et al. 2002) (Kumar et al. 2013) (Patel et al. 2015)

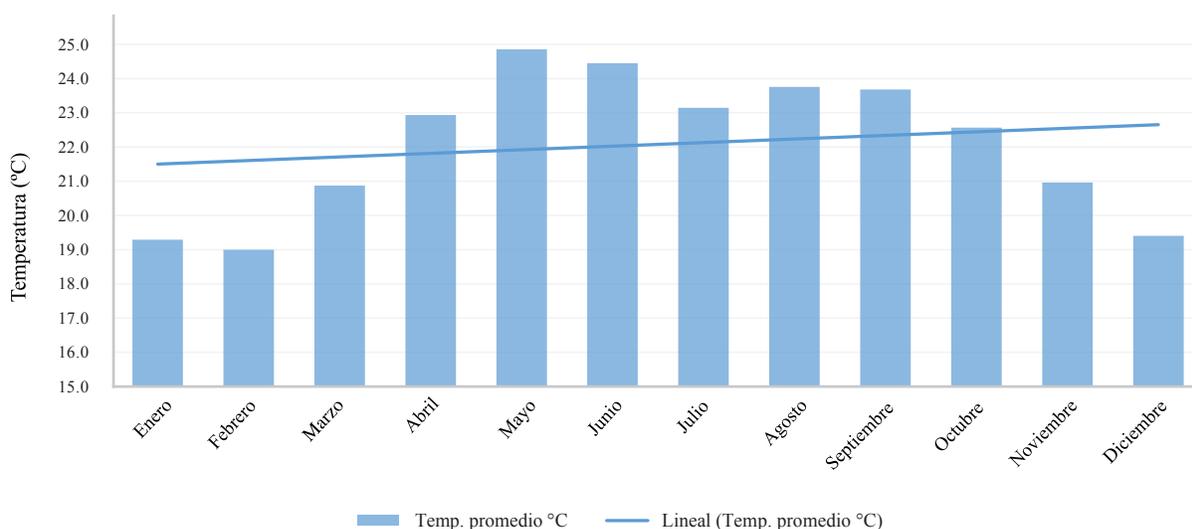


Fig. 4. Temperatura de operación del consorcio.

consorcio, alcanzando una tasa de remoción mayor.

CONCLUSIONES

Los géneros dominantes *Burkholderia*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* y *Proteus* están presentes en un consorcio microbiano eficiente en la degradación de hidrocarburos.

El consorcio autóctono no se adaptó a la operación en un matraz aireado (biorreactor a escalamiento descendente) sin afectar su crecimiento microbiano. El consorcio también se adaptó a diferentes medios de inoculación (agua de mar y medio mineral salino) y fuentes de carbono (diésel y hexadecano). La continua operación del consorcio en presencia de hexadecano, propició la producción del pigmento hidrosoluble pioverdina (fluoresceína) por *Pseudomonas aeruginosa*.

La operación a temperatura ambiente variable puede ser un indicio de que el consorcio se pudiera adaptar a diferentes climas con perspectivas a su aplicación en la biorremediación in situ (ambiente no controlado).

Con el presente trabajo se avanza en la remediación de hidrocarburos ex situ.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca nacional para Brenda Yazmín López Sánchez. Al Laboratorio de Investi-

gación de Recursos Acuáticos (LIRA), del Tecnológico Nacional de México campus Boca del Río, por permitir el uso de sus instalaciones y equipos para el desarrollo del proyecto. Al CIACYT-UASLP y al FAI -UASLP: C19-FAI-05-49.49.

REFERENCIAS

- Ahn Y., Kim J. M., Ahn H., Lee Y. J., LiPuma J. J., Husong D. y Cerniglia C. E. (2014). Evaluation of liquid and solid culture media for the recovery and enrichment of *Burkholderia cenocepacia* from distilled water. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41 (7), 1109-1118. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1442-3>
- Aquihuatl M., Volke T., Prado L., Shirai K., Ramírez F. y Salazar M. (2012). Manual de prácticas de laboratorio microbiología general. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México D.F., 78 pp.
- Balogun S., Ayangbenro A., Kareem S. y Sojinu S. (2015). Degradation of bitumen by *Burkholderia cepacia* KT803965 isolated from heavy oil impacted tropical soil. *RMZ-materials and geoenvironment* 62 (4), 225-235.
- Barrios-San Martín Y., Acosta S., Sánchez A., Toledo A., González F. y García R. M. (2012). Estudio y selección de bacterias aerobias degradadoras de hidrocarburos del petróleo aisladas de costas de Cuba. *Biotechnol. Apl.* 29(2), 80-86.
- Bou G., Fernández-Olmos A., García C., Sáez-Nieto J. A. y Valdezate S. (2011). Métodos de identificación

- bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 29 (8), 601-608. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Bracho M., Díaz L. y Soto M. (2004). Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y heterocíclicos por *Pseudomonas spp.* *Ciencia* 12 (4), 269-275.
- Catelani D., Mosselmans G., Nienhaus J., Sorlini C. y Treccani V. (1970). Microbial degradation of aromatic hydrocarbons used as reactor coolants. *Experientia* 26 (8), 922-923. <https://doi.org/10.1007/BF02114264>
- Chart H. (2012). *Vibrio, mobiluncus, gardnerella and spirillum: Cholera; vaginosis; rat bite fever.* En *Medical Microbiology* (D. Greenwood, M. Barer, R. Slack y W. Irving, Ed.). Elsevier Inc., Nottingham, UK, 314-323. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4089-4.00045-7>
- Chikere C. B. y Ekwuabu C. B. (2014). Molecular characterization of autochthonous hydrocarbon utilizing bacteria in oil-polluted sites at Bodo Community, Ogoni land, Niger Delta, Nigeria. *Nigerian Journal of Biotechnology*, 27, 28-33.
- Cookson John T. (1995). *Bioremediation engineering: design and application.* McGraw-Hill, New York, EUA. 524 pp.
- Devarapalli P. y Kumavath R. N. (2015). Metagenomics - A Technological Drift in Bioremediation. En *Advances in Bioremediation of Wastewater and Polluted Soil* (N. Shiomi, Ed.). IntechOpen, 37-86. <https://doi.org/10.5772/60749>
- Duniya D. A., Maikaje D. B., Umar Y. A., Ponchang A. W. y Daniel A. (2016). Molecular characterization and determination of bioremediation potentials of some bacteria isolated from spent oil contaminated soil mechanic workshops in Kaduna Metropolis. *World Applied Sc. J.* 34 (6), 750-759.
- Ferrera-Cerrato R., Rojas-Avelizapa N. G., Poggi-Varaldo H. M., Alarcón A. y Cañizares-Villanueva R. O. (2006). Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 48 (2), 179-187.
- Fisher K. y Phillips C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 155 (6), 1749-1757. <https://doi.org/10.1099/mic.0.026385-0>
- Guevara-Luna J., Serrano-Ángel L. I., Rodríguez-Barrera M. A., Hernández-Flores G., Toribio-Jiménez J., Toledo-Hernández E. y Romero-Ramírez Y. (2022). Isolated bacteria from hot springs able to use hydrocarbons as carbon source. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 38, 68-77. <https://doi.org/10.20937/RICA.54234>
- Holt J. G., Krieg N. R. y Sneath P. H. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology.* <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68572-4>
- Infante V. V., Cano A. M., Valdovinos H. M., Macías A. E. y Álvarez J. A. (2012). Solución salina como medio de cultivo desde el punto de vista de las bacteriemias nosocomiales. *Rev. Invest. Clin.* 64 (2), 120-125.
- Jain P. K. y Bajpai V. (2012). Biotechnology of bioremediation-a review. *Int. J. Environ. Sci.* 3 (1), 535-549. <https://www.researchgate.net/publication/311365994>
- Kayaoglu G., Erten H. y Ørstavik D. (2005). Growth at high pH increases *Enterococcus faecalis* adhesion to collagen. *Int. Endod. J.* 38 (6), 389-396. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2005.00957.x>
- Kayath C. A., Ibala Zamba A., Goma-Tchimbakala J., Mamonékéné V., Mombo Makanga G. M., Lebonguy A. A. y Nguimbi E. (2019). Microbiota landscape of gut system of guppy fish (*Poecilia reticulata*) plays an outstanding role in adaptation mechanisms. *Int. J. Microbiol.* (1), 1-10, <https://doi.org/10.1155/2019/3590584>
- Klein S., Lorenzo C., Hoffmann S., Walther J. M., Storbeck S., Piekarski T. y Moser J. (2009). Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to various conditions includes tRNA-dependent formation of alanyl-phosphatidylglycerol. *Mol. Microbiol.* 71 (3), 551-565. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06562.x>
- Kumar K. S., Dhanarani T. S. y Thamaraiselvi K. (2013). Utilization of petroleum hydrocarbons by *Micrococcus* and *Streptococcus spp.* isolated from contaminated site. *J. microbiol. biotechnol. res.* 3 (1), 71-78.
- LaBauve A. E. y Wargo M. J. (2012). Growth and laboratory maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr. Protoc. Microbiol.* 25 (1), 1-6. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc06e01s25>
- Leal-Bautista R. M., Hernández-Zárate G., Jaime N. A., Cuevas G. y Oliman G. V. (2011). Pathogens and pharmaceuticals pollutants as indicators of contamination at the northeastern aquifer of Quintana Roo. *Trop. Subtrop. Agroecosystems* 13 (2), 211-219.
- Liu H., Whitehouse C. A. y Li B. (2018). Presencia y persistencia de *Salmonella* en el agua: el impacto en la calidad microbiana del agua y la seguridad alimentaria. *Fronteras en salud pública* 6, 159. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2018.00159>
- Lizardi-Jiménez M. A., Mendezcarlo V. (2021). Los hidrocarburos en México, economía, problemas ambientales y derechos humanos. En *Estado Constitucional: la evolución de sus principios desde 1917* (V. Mendezcarlo V., Ed.). UASLP, MISPAT, San Luis Potosí, México, 157-174.
- Lizardi-Jiménez M. A., Leal-Bautista R. M., Ordaz A. y Reyna-Velarde R. (2015). Airlift bioreactors for hydrocarbon water pollution remediation in a tourism development pole. *Desalination Water Treat.* 54 (1), 44-49. <https://doi.org/10.1080/19443994.2013.876670>

- Lizardi-Jiménez M. A., Saucedo-Castañeda G., Thalasso F. y Gutiérrez-Rojas M. (2012). Simultaneous hexadecane and oxygen transfer rate on the production of an oil-degrading consortium in a three-phase airlift bioreactor. *Chem. Eng. J.* 187, 160-165. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.01.114>
- Lizardi-Jiménez M. A., López-Sánchez E. Y., Gómez-de-Jesús A., García-Cruz N. U. y Hernández-Flores C. I. (2016). Sinkhole-native oil-degrading microbial consortium for hydrocarbon-polluted seawater remediation. *Clean - Soil, Air, Water* 44 (8), 1046-1050. <https://doi.org/10.1002/clen.201500114>
- Matches J. y Liston J. (2006). Low Temperature Growth of Salmonella. *J. Food Sci.* 33, 641-645. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1968.tb09092.x>
- Medina-Moreno S. A., Jiménez-González A., Gutiérrez-Rojas M. y Lizardi-Jiménez M. A. (2014). Hydrocarbon pollution studies of underwater sinkholes along Quintana Roo as a function of tourism development in the Mexican Caribbean. *Rev. Mex. Ing. Quim.* 13 (1), 509-516.
- Nakajo K., Iwami Y., Komori R., Ishikawa S., Ueno T., Suzuki Y. y Takahashi N. (2005). The resistance to acidic and alkaline environments of endodontic pathogen *Enterococcus faecalis*. In *International Congress Series* 1284 (1), 191-192. <https://doi.org/10.1016/j.ics.2005.06.060>
- Nikhil T., Deepa V., Rohan G. y Satish B. (2013). Isolation, characterization and identification of diesel engine oil degrading bacteria from garage soil and comparison of their bioremediation potential. *Int. J. Environ. Sci.* 2 (2), 48-52.
- Ochoa D. C. y Montoya A. (2010). Consorcios microbianos: una metáfora biológica aplicada a la asociatividad empresarial en cadenas productivas agropecuarias. *Rev. Fac. Cienc. Econ.* 18 (2), 55-74. <https://doi.org/10.18359/rfce.2272>
- Ordoñez D. E., Abella Medina C. A., Echeverry A., Paz L. M. y Benítez-Campo N. (2018). Biodegradación de hidrocarburos alifáticos saturados por microorganismos aislados de suelo contaminado con derivados del petróleo. *Revista de Ciencias* 22 (2). <https://doi.org/10.25100/rc.v22i2.7917>
- Patel P., Kathesia H., Shukla R. y Kothari R. (2015). Biodegradation of petroleum hydrocarbons by newly isolated bacterial strains *Acinetobacter* SPP. SK1 & *Streptococcus* SPP. SK2. [En línea] https://www.researchgate.net/publication/283085179_30/08/2022
- Percival S. L. y Williams D. W. (2014). *Vibrio*. *En Microbiology of Waterborne Diseases*. Academic Press, 237-248.
- Pérez S. A., Niño Z. M., Hernández V. y Hernández C. (2007). Uso de enzimas de tipo ureasa en el tratamiento de aguas residuales con alto contenido en nitrógeno orgánico. *Información tecnológica* 18 (5), 41-48. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642007000500006>
- Poppe C., Smart N., Khakhria R., Johnson W., Spika J. y Prescott J. (1998). *Salmonella typhimurium* DT104: a virulent and drug-resistant pathogen. *Can. Vet. J.* 39 (9), 559-565.
- Rahman K. S., Banat I. M., Thahira J., Thayumanavan T. y Lakshmanaperumalsamy P. (2002). Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. *Bioresour. Technol.* 81 (1), 25-32. [https://doi.org/10.1016/s0960-8524\(01\)00105-5](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(01)00105-5)
- Ramsey M., Hartke A. y Huycke M. (2014). The physiology and metabolism of enterococci. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [en línea]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190432/09/04/2022>
- Reul A. L. H., Febles-Patrón J. L. y Nava-Galindo V. A. (2015). La contaminación fecal en cenotes de interés turístico y recreacional del estado de Yucatán. *Ingeniería* 19 (3), 169-175.
- Ricoy C., Boulé N., Amaíz L., Torcuatti E., Medina L., Valbuena O. y Fernández Z. (2012). Transferencia de la capacidad degradadora de combustible diesel a *Escherichia coli* DH5 α por plásmidos de bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo. *Interciencia* 37 (9), 671-677.
- Robinson V. K. y Wemedo S. A. (2019). Molecular characterization of indoor air microorganisms of a model primary health care in Port Harcourt, rivers state, Nigeria. *A. J. M. B. E.S.* 2 (1), 1-9.
- Roy S., Hens D. y Biswas D. (2002). Survey of petroleum-degrading bacteria in coastal waters of Sunderban Biosphere Reserve. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18 (1), 575-581. <https://doi.org/10.1023/A:1016362819746>
- Santos O. (2017). Detección e identificación de biosurfactantes y/o bioemulsificantes producidos por aislados bacterianos asociados a una fosa petrolera de la Faja Petrolífera del Orinoco Tesis. Universidad Central de Venezuela.
- Scholz-Böttcher B. M., Ahlf S., Vazquez-Gutierrez F. y Rullkötter J. (2008). Sources of hydrocarbon pollution in surface sediments of the Campeche Sound, Gulf of Mexico, revealed by biomarker analysis. *Org. Geochem.* 39 (8), 1104-1108. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2008.01.004>
- Schwartz A. (1967). S.T. Cowan and K. J. Steel. *Manual for the Identification of medical Bacteria*. X und 217S., 10 Tab. Cambridge University Press 1965. 50 s. <https://doi.org/10.1002/jobm.19670070114>
- Smith C. B., Johnson C. N. y King G. M. (2012). Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by

- potentially pathogenic environmental *Vibrio parahaemolyticus* isolates from coastal Louisiana, USA. Mar. Pollut. Bull. 64 (1), 138-143. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.10.007>
- Stuart C. H., Schwartz S. A., Beeson T. J. y Owatz C. B. (2006). *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. J. Endod. 32 (2), 93-98. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.10.049>
- Tajkarimi M. (2007). *Salmonella* spp. California Department of Food and Agriculture [En línea]. https://www.cdfa.ca.gov/ahfss/Animal_Health/PHR250/2007/25007Sal.pdf 09/04/2022
- Tsuji A., Kaneko Y., Takahashi K., Ogawa M. y Goto S. (1982). The effects of temperature and pH on the growth of eight enteric and nine glucose non-fermenting species of gram-negative rods. Microbiol. Immunol. 26 (1), 15-24. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1982.tb00149.x>
- Uthoff L. M. (2010). La industria del petróleo en México, 1911-1938: del auge exportador al abastecimiento del mercado interno. Una aproximación a su estudio. América Latina en la historia económica (33), 5-30. <https://doi.org/10.18232/alhe.v17i1.427>
- Ulloa A. (2014). Geopolíticas del desarrollo y la confrontación extractivista minera: elementos para el análisis en territorios indígenas en América Latina, En Barbara Göbel y Astrid Ulloa (comps.), Extractivismo minero en Colombia y América Latina. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia/ Berlin: Ibero-Amerikanisches Institut, 425-458.
- Wiedemann A., Virlogeux-Payant I., Chausse A. M., Schikora A. y Velge P. (2015). Interacciones de *Salmonella* con animales y plantas. Microbiol. frontal. 5 (1), 791. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00791>
- Xilinas M. E., Papavassiliou J. T. y Legakis N. J. (1975). Selective medium for growth of *Proteus*. J. Clin. Microbiol. 2 (5), 459-60. <https://doi.org/10.1128/jcm.2.5.459-460.1975>
- You Z., Xu H., Zhang S., Kim H., Chiang P. C., Yun W., Zhang L. y He Miao. (2018). Comparison of petroleum hydrocarbons degradation by *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Sci. 8 (12), 2551. <https://doi.org/10.3390/app8122551>
- Zaika L. L. (2001). The effect of temperature and low pH on survival of *Shigella flexneri* in broth. J. F. P. 64 (8), 1162-1165. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-64.8.1162>
- Zamora A., Ramos J. y Arias M. (2012). Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de Sabana. Bioagro 24 (1), 5-12.