



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias**

**Determinación de bacterias marinas  
resistentes y degradadoras del  
tributilestaño (TBT) en el submareal de  
la Bahía de Manzanillo, Colima, México.**

**Tesis**

**que para obtener el grado de**

**Maestro en Ciencias en Biosistemática y  
Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas**

**Presenta**

**Elizabeth Avila Castro**

**Director**

**Dr. Leopoldo Díaz Pérez**

**Zapopan, Jalisco**

**09 de Julio del 2018**



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

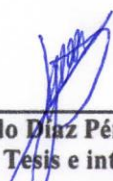
## DETERMINACIÓN DE BACTERIAS MARINAS RESISTENTES Y DEGRADADORAS DEL TRIBUTILESTAÑO (TBT) EN EL SUBMAREAL DE LA BAHÍA DE MANZANILLO, COLIMA, MÉXICO.

Por

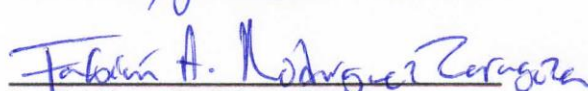
**ELIZABETH AVILA CASTRO**

Maestría en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas

Aprobado por:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Leopoldo Díaz Pérez  
Director de Tesis e integrante del jurado

07/06/2018  
Fecha

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Fabián A. Rodríguez Zaragoza  
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

07/06/2018  
Fecha

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Eduardo Ríos Jara  
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

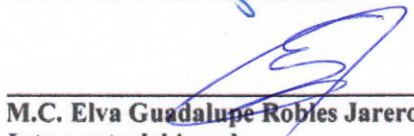
07/06/2018  
Fecha

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Manuel Ayón Parente  
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

07/06/2018  
Fecha

  
\_\_\_\_\_  
Dra. A. Paola Rodríguez Troncoso  
Asesor del Comité Particular

07/06/2018  
Fecha

  
\_\_\_\_\_  
M.C. Elva Guadalupe Robles Jarero  
Integrante del jurado

07/06/2018  
Fecha

## Dedicatorias

A mi familia, esto es gracias y por ustedes:

Mis padres Elizabeth Castro y Leonardo Avila, mis hermanos Leo y Victor.

Por supuesto a ti Isaac, esta es la segunda, ahora ya sabes leer y sigues siendo el motor principal que me mueve para seguir adelante. ¡Vamos por la tercera!

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por el financiamiento otorgado. A la Universidad de Guadalajara, al Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias por ser nuestra casa de estudios.

Al mi Director de Tesis, Dr. Leopoldo Díaz Pérez (bien escrito papá académico). Gracias por aceptarme como primera hija académica en este grado (no tuviste de otra), por ser parte de mi formación profesional y brindarme las herramientas necesarias para terminar y cumplir con lo establecido, por todos los conocimientos, enseñanzas y sobre todo la paciencia

Al Dr. Fabián A. Rodríguez Zaragoza, mi primer padre académico, asesor y sinodal, gracias por darme el voto de confianza y dejarme ser parte del equipo, por el apoyo tanto en el trabajo como en lo personal. Por los conocimientos, experiencias, enseñanzas y el tiempo que dedicaste en este trabajo.

Gracias al Dr. Eduardo Ríos Jara, Dr. Manuel Ayón Parente, Dra. A. Paola Rodríguez Troncoso, por fungir como revisores de la tesis y contribuir con observaciones y consejos, para la elaboración del manuscrito, además por sus comentarios, observaciones y apoyo en cada semestre, por las palabras de aliento y sobre todo por el tiempo que le dedicaron a este trabajo. A la M en C. Elva Guadalupe Robles Jarero por ser parte del jurado y estar presente durante esta etapa.

A mi familia por supuesto, sin ellos las cosas no hubieran podido salir adelante, por la paciencia, atención, consejos, jalones de oreja, cariño, amor y el apoyo a seguir y acompañarme en mis decisiones, no importando los obstáculos que nunca faltan. A ti Isaac, por ser paciente y esperarme todas las tardes, algunas veces contento y otras enojado, por acompañarme a la escuela y durante las noches mientras trabajaba (porque no querías dormirte). ¡Te Amo! ¡Los Amo!

A los profesores y amigos, Lore, Cristian, Carmen, Nacho, por no decirme nunca no y apoyarme en muchos aspectos: los conocimientos que me brindaron, muestreos, laboratorio, palabras de aliento, consejos, etc. ¡Gracias!

Por último, pero no menos importante a los amigos y compañeros que hice a lo largo de este tiempo; Eva (la sheriff del laboratorio), Nat, Karl, Casandra, Diego, Celeste, Cris, Ceci, Dennise, Esme, Pacho, Pastora, Hosmer, Martín, José Luis. Gracias por su apoyo, enseñanzas y por los momentos compartidos. Erika, Jaz y Magda, también en esta etapa estuvieron conmigo, siguen ayudándome y apoyándome a pesar de la distancia, ¡las quiero!

## Índice

Índice de figuras.....	VI
Índice de tablas.....	VII
Resumen.....	1
1. Introducción.....	2
2. Antecedentes.....	3
2.1. Tributilestaño.....	3
2.2. Degradación del TBT.....	4
2.3. Bacterias resistentes al TBT.....	5
2.4. Bacterias degradadoras del TBT.....	6
3. Justificación.....	6
4. Objetivo general.....	7
5. Objetivos particulares.....	7
6. Hipótesis.....	7
7. Materiales y Métodos.....	8
7.1. Área de estudio y recolección de muestras.....	8
7.2. Obtención de bacterias.....	9
7.3. Abundancias de bacterias heterótrofas cultivables (UFC).....	10
7.4. Aislamiento y purificación de bacterias.....	12
7.5. Prueba de resistencia al TBT.....	14
7.6. Determinación del uso de TBT como fuente de carbono.....	15
7.7. Pruebas moleculares.....	16
7.8. Análisis estadísticos.....	17
8. Resultados.....	18
8.1. Abundancias de bacterias heterótrofas cultivables.....	18
8.2. Aislamiento, purificación, características morfológicas y tinciones	19
Gram de las colonias bacterianas.....	
8.2.1. Temporada cálido-lluviosa (julio 2016).....	20
8.2.2. Temporada templado-secas (enero 2017).....	20
8.3. Resistencia al TBT.....	24
8.4. Uso del TBT como fuente de carbono.....	27
8.4.1. Modelos de crecimiento logístico.....	29
8.4.1.1. Cepa P1MZ16.9.....	29
8.4.1.2. Cepa P3MZ16.7.....	30
8.4.1.3. Cepa Ca1MZ17.6.....	31
8.4.1.4. Cepa P2MZ17.6.....	32
8.4.1.5. Cepa P1MZ17.12.....	33
8.4.1.6. Cepa Ca1MZ17.2.....	34
8.4.1.7. Cepa P3MZ17.10.....	35
8.5. Identificación molecular.....	36
8.5.1. Secuenciación de fragmentos de PCR.....	37

9. Discusión.....	38
9.1. Abundancias de bacterias heterótrofas cultivables.....	38
9.2. Resistencias al TBT.....	38
9.3. Utilización del TBT como fuente de carbono.....	39
10. Conclusiones.....	40
11. Referencias.....	41
Anexos.....	50

## Índice de figuras

Figura. 1: Área de estudio y localidades de muestreo en la Bahía de Manzanillo, Colima, México.....	8
Figura 2. Método vortex utilizado para el aislamiento y obtención de abundancias bacterianas de los sedimentos marinos.....	9
Figura 3: Método estampado en placa utilizado para el aislamiento y obtención de abundancias bacterianas de los sedimentos marinos.....	10
Figura 4. Aspectos morfológicos de colonias bacterianas consideradas para el aislamiento y purificación de las cepas bacterianas.....	12
Figura 5. Métodos para el aislamiento y purificación.....	13
Figura 6. Método empleado para las pruebas de resistencia al TBT.....	14
Figura 7. Abundancias bacterianas en Unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) para cada temporada.....	19
Figura 8: Tinciones Gram de las cepas aisladas.....	22
Figura 9: Características morfológicas de las cepas aisladas y purificadas.....	23
Figura 10. Curvas de crecimiento de las cepas bacterianas en los tres tratamientos (medio enriquecido, medio mínimo y medio TBT).....	28
Figura 11: Curvas de crecimiento para los tres tratamientos de la cepa bacteriana P1MZ16.9.....	29
Figura 12: Curvas de crecimiento para los tres tratamientos de la cepa bacteriana P3MZ16.7.....	30
Figura 13: Curvas de crecimiento para los tres tratamientos de la cepa bacteriana Ca1MZ17.6.....	31
Figura 14: Curvas de crecimiento para los tres tratamientos de la cepa bacteriana P2MZ17.6.....	32
Figura 15: Curvas de crecimiento para los tres tratamientos de la cepa bacteriana P1MZ17.12.....	33
Figura 16: Curvas de crecimiento para los tres tratamientos de la cepa bacteriana Ca1MZ17.2.....	34
Figura 17: Curvas de crecimiento para los tres tratamientos de la cepa bacteriana P3MZ17.10.....	35
Figura 18. Amplificación del gen ribosomal 16S mediante la técnica de PCR..	36

Figura 19. Purificación de productos de PCR del gen ribosomal 16S mediante el corte de la banda del gel y purificación..... 37



## Índice de cuadros

Cuadro 1: Análisis de varianza basado en permutaciones para los datos de abundancias entre junio del 2016 y julio del 2017.....	18
Cuadro 2: Análisis de varianza basado en permutaciones para los datos de abundancias.....	19
Cuadro 3: Características de los atributos morfológicos de las colonias bacterianas aisladas y purificadas de ambas temporadas de muestreo.....	21
Cuadro 4: Pruebas de resistencia al TBT de las cepas bacterianas a diferentes concentraciones de TBT.....	25
Cuadro 5: Pruebas a posteriori en el ANDEVA permutacional aplicado a la hora 14 entre los diferentes tratamientos en las curvas de crecimiento.....	27
Cuadro 6: Identificación de las especies bacterianas mediante alineamiento de secuencias del gen ribosomal 16S.....	37

## Resumen

EL Tributilestaño (TBT) es un compuesto orgánico a base de estaño, que fue utilizado principalmente en las pinturas antiincrustantes de los barcos, ahora se sabe que es un agente altamente tóxico para la vida marina y sus características químicas le permiten la persistencia en el medio por amplios periodos de tiempo. En este trabajo se aislaron cepas bacterianas del sedimento de la bahía de Manzanillo (Punta Santiago, Carrizales y Puerto) recolectado en julio del 2016 y enero del 2017, encontrando una variación estacional, donde las mayores abundancias de unidades formadoras de colonias bacterianas totales (medio sin TBT) y resistentes al TBT (medio con TBT) se presentaron en enero. En general, se aislaron 118 cepas bacterianas de las cuales 50 presentaron capacidad de resistencia al TBT en concentraciones (de ~ 420  $\mu\text{M}$  hasta 3.75  $\text{mM}$ ); observando una mayor tolerancia para las del grupo Gram-negativas. Además, se encontraron cuatro cepas bacterias capaces de utilizar el TBT como fuente de carbono a una concentración de 3.75  $\text{mM}$ , dos de ellas *Campylobacter* sp. y *Pseudoalteromonas peptidolytica* presentaron un mayor aprovechamiento del TBT, por lo que son candidatas potenciales para su uso en la biorremediación ambiental de TBT.

## Abstract

Tributyltin (TBT) is an organic compound based on tin, which can be used in antifouling paints of ships, now it is known that it is a highly toxic agent for marine life and its chemical characteristics allow persistence in the medium for extended periods of time. In this work, bacterial strains were isolated from the sediment of the Bay of Manzanillo (Punta Santiago, Carrizales and Puerto) collected in July 2016 and January 2017, finding a seasonal variability, where the highest abundances of units forming total bacterial colonies (mean without TBT) and resistant to TBT (medium with TBT) occurs in January. In general, 118 bacterial strains were isolated, of which 50 were resistant to TBT in concentrations (from ~ 420  $\mu\text{M}$  to 3.75  $\text{mM}$ ); observing a greater tolerance for those of the Gram-negative group. In addition, four strains have the ability to use TBT as a carbon source at a concentration of 3.75  $\text{mM}$ , two of them *Campylobacter* sp. and *Pseudoalteromonas peptidolytica* presents a greater use of TBT, they are candidates for use in the environmental bioremediation of TBT.

## 1. Introducción

El tributilestano (TBT) es un compuesto orgánico con tres grupos butilo unidos por un átomo de estaño [(C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>3</sub>Sn], el cual se utilizaba desde la década de los 60's como agente fungicida, bactericida e insecticida (Chacón *et al.*, 2007). También, fue el compuesto activo principal en pinturas anti-incrustantes utilizadas con la finalidad de proteger a las embarcaciones y estructuras marinas de la corrosión y el asentamiento de organismos marinos (Cruz *et al.*, 2007), sin embargo, presenta una larga duración en el medio ambiente, esto se ha observado mayormente donde existe un alto tráfico de embarcaciones (p. ej., puertos y rutas comerciales [Smith, 1971]).

La persistencia del TBT ha ayudado para identificarlo como un agente altamente tóxico y bioacumulable en tejidos de invertebrados, peces, aves y mamíferos, ya que, en concentraciones inferiores a miligramos, puede provocar malformaciones, mutaciones y/o la muerte del organismo (Crespo y González, 2003), además de alterar los procesos endocrinos en los organismos, desarrollando el imposex (Dubey *et al.*, 2006), el cual consiste en la imposición de caracteres sexuales masculinos en las hembras o bien un aumento del tamaño de las gónadas masculinas por el aumento de la concentración plasmática de testosterona en gasterópodos marinos, atrofiando el sistema reproductivo de hembras y machos (Chacón *et al.*, 2007)

Este contaminante se caracteriza por ser poco hidrosoluble y de carácter lipofílico, por lo que tiene una fuerte tendencia a adherirse a las partículas del sedimento, biota y lecho marino, por lo tanto, es considerado como una sustancia capaz de matar o inhibir el crecimiento de algún organismo (Barreiro *et al.*, 2004; Chacón *et al.*, 2007; Rodríguez-Romero, 2010). En general, el TBT se degrada por mecanismos fisicoquímicos (p. ej., hidrólisis y fotodegradación) y biológicos como la biotransformación del TBT a metabolitos secundarios menos tóxicos por organismos como mamíferos, peces, algas, hongos y bacterias (Mohamat-Yusuff *et al.*, 2014). Algunas de estas últimas, cuentan con plásmidos o genes incorporados en su genoma, el cual les brinda la capacidad de transformar este compuesto al utilizarlo como fuente de carbono (Dubey y Roy, 2003; Cooney *et al.*, 2005). Esta característica ha puesto a las bacterias como una solución viable a la biodegradación del TBT en diversos ecosistemas. En este sentido, las bacterias con la capacidad de degradar este contaminante pueden ser aisladas en zonas con presencia de TBT, para posteriormente, ser utilizadas como una herramienta en la biorremediación de ecosistemas (Márquez *et al.*, 2001; Narváez-Flórez *et al.*, 2008).

El Puerto de Manzanillo (México) es uno de los diez Puertos más grandes e importantes en Latinoamérica y es considerado el segundo más importante del Pacífico Este (Programa maestro de desarrollo portuario del puerto de Manzanillo 2015-2020). La actividad portuaria del Puerto de Manzanillo se remota a la conquista de los españoles ya que se contaba con flujo comercial importante, pero no es hasta 1821 que empieza a ser considerado puerto comercial (González-Villa, 2010). Su área de influencia incluye a más de 15 estados de México que representan el 60% del Producto Interno Bruto (PIB) e internacionalmente su área de influencia está orientada hacia el Oeste del Continente Americano y la Cuenca de Pacífico, destacando líneas navieras provenientes de E.U.A., Canadá, Colombia, Ecuador, Chile, Japón, China, Taiwán, Corea. Además, intercambio comercial con la Unión Europea; España, Rusia, Alemania; así como en Oceanía Australia, Nueva Zelanda y Sudáfrica (Administración Portuaria Integral de Manzanillo, 2012-2018). Este alto tráfico de embarcaciones presentes en el Puerto de Manzanillo lo hace un sitio vulnerable a la presencia de TBT y debido a la alta persistencia del compuesto es muy posible que haya permanecido en los sedimentos y organismos de esta zona.

## **2. Antecedentes**

### **2.1. Tributilestaño**

En la década de los años 60's, las pinturas basadas en Compuestos Orgánicos de Estaño (COE) se comenzaron a utilizar debido a que presentaban una mayor durabilidad (y por lo tanto, eficacia) en comparación a las pinturas utilizadas en aquel tiempo (Fent, 2003). Su alta demanda provocó que 20 años después el 70 % de toda la flota mercante mundial utilizara este tipo de pintura (Ludgate 1987; Bigatti *et al.*, 2013). Sin embargo, en 1990 la Organización Marítima Internacional (OMI) adoptó medidas para controlar los impactos ambientales relacionados con el uso del tributilestaño en pinturas para embarcaciones, proponiendo la prohibición total de su uso en el 2003, haciéndose efectivo hasta el 2008 (Bigatti *et al.*, 2013).

Por ser hidrosoluble, la persistencia del TBT en la columna de agua es baja (entre días y semanas) y depende de la presencia de microorganismos degradantes, temperatura e insolación (Maguire, 2000; Omae, 2003; Ruiz *et al.*, 1996). No obstante, en sedimentos las tasas de degradación disminuyen significativamente esperando que se degrade en un periodo de entre uno a nueve años (Hoch, 2001; Omae, 2003; Ruiz *et al.*, 1996 Kotrikla, 2009). Varios estudios enfatizan que las mayores

concentraciones de COE se encuentran en los sedimentos de diferentes países como Estados Unidos de Norteamérica (Landmeyer *et al.*, 2004), Australia (Haynes y Loong, 2002), Japón (Harino *et al.*, 2007), Italia (Chiavarini *et al.*, 2003), España (Díez y Bayona 2009), Brasil y Argentina (Goldberg *et al.*, 2004); y también coinciden en que están presentes en zonas cercanas a puertos, marinas y astilleros (Rato *et al.*, 2008; Bigatti *et al.*, 2009; Castro *et al.*, 2012; Bigatti *et al.*, 2013).

La alta persistencia del TBT en el sedimento resulta un peligro, ya que es altamente tóxico para los organismos debido a su capacidad de penetración en las membranas biológicas y la gran mayoría de organismos no pueden metabolizarlo rápidamente. Por consecuencia lo acumulan solubilizándolo en compuestos lipídicos, produciendo efectos en organismos calcificadores como la disminución en el grosor del caparazón en las ostras, así como el imposex en invertebrados marinos (Crespo y González, 2003; Rodríguez-Romero, 2010); siendo este último el efecto más observado en invertebrados marinos (Gibbs y Bryan, 1986), documentándose alrededor del mundo en diferentes organismos como: *Nucella lapillus* (Linnaeus, 1758) en Galicia (Ruiz *et al.*, 1998), *Stramonita haemastoma* (Linnaeus, 1767) y *Hexaplex trunculus* (Linnaeus, 1758) en las costas de Israel (Rilov *et al.*, 2000), *Odontocymbiola magellanica* (Gmelin, 1791) en Patagonia (Bigatti y Penchaszadeh, 2005), *Echinolittorina ziczac* (Gmelin, 1791), y *Nassarius vibex* (Say, 1822) en Campeche, México (Rodríguez-Romero, 2010).

## 2.2. Degradación del TBT

La degradación implica la eliminación secuencial de los grupos orgánicos del átomo de estaño resultando en la reducción de la toxicidad (Thayer, 1984; Blunden y Chapman, 1986; Cooney, 1988, 1995; Cooney y Wuertz, 1989; Gadd, 2000); puede darse mediante factores abióticos (división UV) y factores bióticos, éste último se ha detectado como el más importante en la debutilización, es decir, reducción del Tributilestaño a Dibutilestaño (DBT), Monobutilestaño (MTB) y estaño inorgánico (Dowson *et al.*, 1996). Por ejemplo, *Ankistrodesmus falcatu* (Croasdale, 1973) es un alga capaz de degradar el 50% del TBT acumulado, transformándolo a DBT (Maguire *et al.*, 1984). Similarmente el alga *Pavlova lutheri* (Green, 1975) bioacumla el TBT y puede degradarlo a DBT y MTB (Louis *et al.*, 1994). Este proceso, también se ha observado en hongos como *Coniophora puteana* (Karst, 1868), *Trametes versicolor* (Lloyd, 1921), *Chaetomium globosum* (Kunze y Schmidt, 1817), *Aureobacidium pullulans* (Arnaud, 1918), y *Cunninghamella elegans* (Lender, 1907), (Barug 1981; Orsler y Holland 1982; Gadd *et al.*, 1990). Por otra parte, se ha evidenciado que la degradación por medio de bacterias, es la vía principal para la eliminación del TBT en agua y sedimento (Tsang *et al.*, 1999; Sakultantimetha *et al.*, 2010). Por lo que, Wuertz *et al.*, (1991) sugieren que los sedimentos contaminados por TBT podrían actuar como un medio selectivo para las bacterias que son resistentes y tienen la capacidad de

metabolizarlo. Sin embargo, aún no se ha revisado extensivamente la incidencia de bacterias resistentes a compuestos orgánicos de estaño en los ensamblajes bacterianos naturales.

### 2.3. Bacterias resistentes al TBT

Desde principios de los 90`s a la fecha se han realizado numerosos estudios en busca de cepas bacterianas que tengan la capacidad de resistir el TBT. Wuertz *et al.*, (1991), aislaron bacterias de la columna de agua y sedimento de estuarios en Boston, 26 cepas bacterianas fueron resistentes al TBT, entre las cuales sólo una fue del grupo Gram- positivas. Por otra parte, se ha documentado que las bacterias Gram negativas son más resistentes al TBT en comparación a las positivas (Cruz *et al.*, 2007), posiblemente, esto se deba a que las bacterias Gram negativas son más abundantes en ambientes marinos y a la diferencia arquitectónica entre estos grupos (p. ej., *Escherichia coli* (Escherich, 1885), *Enterobacter* spp., *Klebsiella oxytoca* (Flügge, 1886), *Serratia liquefaciens* *Pseudomonas stutzeri* (Burri y Stutzer, 1895), *Aeromonas molluscorum* (Miñana-Galbis y cols, 2004); Wuertz *et al.*, 1991; Jude *et al.*, 1996; Cruz *et al.*, 2013); no obstante, también se han documentado bacterias Gram positivas resistentes al TBT (p. ej., *Staphylococcus aureus* (Rosenbach 1884), *Staphylococcus epidermis* (Rosenbach 1884), *Mycobacterium phlei* (Lehmann y Neumann, 1899) y *Vibrio* sp; Dubey y Roy, 2003). Es importante notar que, la resistencia al TBT de una bacteria puede llegar a ser limitada por cierto rango de tolerancia, cuando se excede llega a presentar efectos negativos en la bacteria. Dubey *et al.*, (2006). Reportan que la cepa bacteriana *Pseudomona aeruginosa* 25W (Schroeter, 1872) aislada del mar arábigo, es altamente resistente al TBT a una concentración de 50 µM, sin embargo, en concentraciones altas (500 µM) la cepa presenta efectos transcripcionales.

Cruz *et al.*, (2007) aislaron cepas bacterianas de agua y sedimento en Ría de Aveiro, Portugal, reportando a *Bacillus cereus thuringiensis* (Berliner, 1915), *Brevibacterium* sp., *Kurthia zopfii* (Trevisan, 1885), *Listeria grayi* (Larsen *et al.*, 1966), *Turicella otitidis* (Funke *et al.*, 1994), *Acinetobacter lwoffii junii*, *Aeromonas hydrophyla* (Chester, 1901), *A. salmonicida* (Lehmann y Neumann, 1896), *A. veronii biovar sobria* (Joseph, 1996), *Pseudoalteromonas* sp., *P. halophyla*, *Citrobacter* sp., *Enterobacter intermedius*, *Pseudomonas fluorescens putida* (Trevisan, 1889), como especies capaces de resistir el TBT a una concentración de 3 mM (la más alta empleada en su trabajo). Especies que han mostrado una resistencia a una concentración menor de 2 mM al TBT son: *Corynebacterium propinquum*, *Kurthia gibsonii*, *Microbacterium* spp., *Staphylococcus xylosum*, *Arcano pyogenes*, *Acinetobacter*, *Vibrio tasmaniensis*, *Pseudoalteromonas* sp., *Pseudoalteromonas* sp

2, *P. halophyla*, *Shewanella violácea*, *Shewanella* sp., *Vibrio* sp. OC26, *Vibrio* sp. Da2. Todas reportadas en este mismo trabajo.

Posteriormente Mohamat-Yusuff *et al.*, (2014) aislaron cepas bacterianas del sedimento en zonas de pastos marinos y puertos pesqueros en Johor, encontrando 16 colonias capaces de resistir una concentración igual o mayor a 33.6  $\mu$ M. de TBT.

#### 2.4. Bacterias degradadoras del TBT

Se consideran bacterias degradadoras a aquellas cepas bacterianas con capacidad de metabolizar el compuesto a metabolitos menos tóxicos (DBT, MTB, estaño inorgánico), en relación a esto, pocas bacterias se han mencionado con capacidad para degradar el TBT en comparación con las bacterias que lo resisten. *Pseudomonas diminuta* es capaz de degradar el TBT a una concentración de 4-20  $\mu$ g Sn/L, sin embargo, en una concentración mayor de 20  $\mu$ g Sn/L inhibe el crecimiento (Kawai *et al.*, 1998). Por otra parte, las bacterias *P. aeruginosa* y *Aeromonas veronii* utilizan el TBT como fuente de carbono y puede transformar el TBT a MTB en una concentración de 2 y 3 mM respectivamente (Roy y Bhosle, 2006; Cruz *et al.*, 2007), hasta ahora la concentración más alta señalada a nivel mundial. Del mismo modo, Sampath *et al.*, (2012) aislaron cepas bacterianas de las costas de India, encontraron cinco cepas bacterianas pertenecientes al género *Pseudomonas* (*P. pseudoalcaligenes*, *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. putida*, *P. balearica*) como potentes degradadoras del TBT, ya que son capaces de utilizar el compuesto como fuente de carbono a una concentración de 2 mM. *Aeromonas molluscorum* es otra de las cepas con capacidad de degradar el compuesto a DTB y MTB, por lo cual Cruz *et al.*, (2014) evaluaron las características fenotípicas y genotípicas, al no encontrar malformaciones ni alteraciones en la cepa bacteriana, es propuesta como segura para utilizarse en la biorremediación de ambientes contaminados por TBT. Por último, *Enterobacter cloacae* ha sido citada como cepa bacteriana con capacidad de degradación del TBT, mostrando además que la mayor eficiencia de degradación es en condiciones específicas: de manera aerobia, a un pH de 7.0 y una temperatura de 28°C (Sakultantimetha *et al.*, 2010).

### 3. Justificación

El Puerto de Manzanillo es uno de los más importantes en México y reúne todas las características para suponer que exista TBT en sus sedimentos. Sin embargo, no existen evaluaciones previas en las que se reconozca la presencia de este contaminante en la Bahía de Manzanillo. Por esta razón, es una

zona con gran potencial para explorar y obtener bacterias con la capacidad de degradar este contaminante. Los resultados obtenidos en este proyecto ayudarán a generar información base en la biorremediación ambiental, y con ello, mitigar los efectos dañinos del TBT en las comunidades marinas.

#### **4. Objetivo General**

Evaluar la riqueza y abundancia de bacterias resistentes y biodegradadoras de TBT en la bahía de Manzanillo.

#### **5. Objetivos Particulares**

- Determinar la abundancia de bacterias cultivables resistentes al TBT en relación a la abundancia de bacterias cultivables heterótrofas totales.
- Evaluar la resistencia al TBT de las bacterias aisladas en diferentes gradientes de concentración.
- Evaluar la utilización del TBT como fuente de carbono como indicador de degradación mediante modelos logísticos de crecimiento.
- Identificar mediante pruebas moleculares las bacterias degradadoras del TBT.

#### **6. Hipótesis**

En el Puerto de Manzanillo y sitios cercanos a este se espera una mayor concentración de TBT, por lo cual, existe una mayor riqueza y abundancia de bacterias resistentes y degradadoras de TBT, en particular aquellas del grupo Gram negativas, en comparación con los sitios retirados al Puerto.



## 7. Materiales y Métodos

### 7.1. Área de estudio y recolección de muestras:

El área de estudio fue la Bahía de Manzanillo, Colima, México ( $19^{\circ}03'08''\text{N}$ ;  $104^{\circ}18'57''\text{O}$ ). Los muestreos se realizaron en tres localidades: i) Bahía Carrizales al noroeste de Manzanillo. ii) Punta Santiago, se localiza en el centro de la bahía a seis kilómetros de la entrada al Puerto. iii) La entrada al Puerto de Manzanillo (Fig. 1). Los muestreos se realizaron en julio del 2016 (temporada cálida-lluviosa) y enero del 2017 (temporada templado-seco)

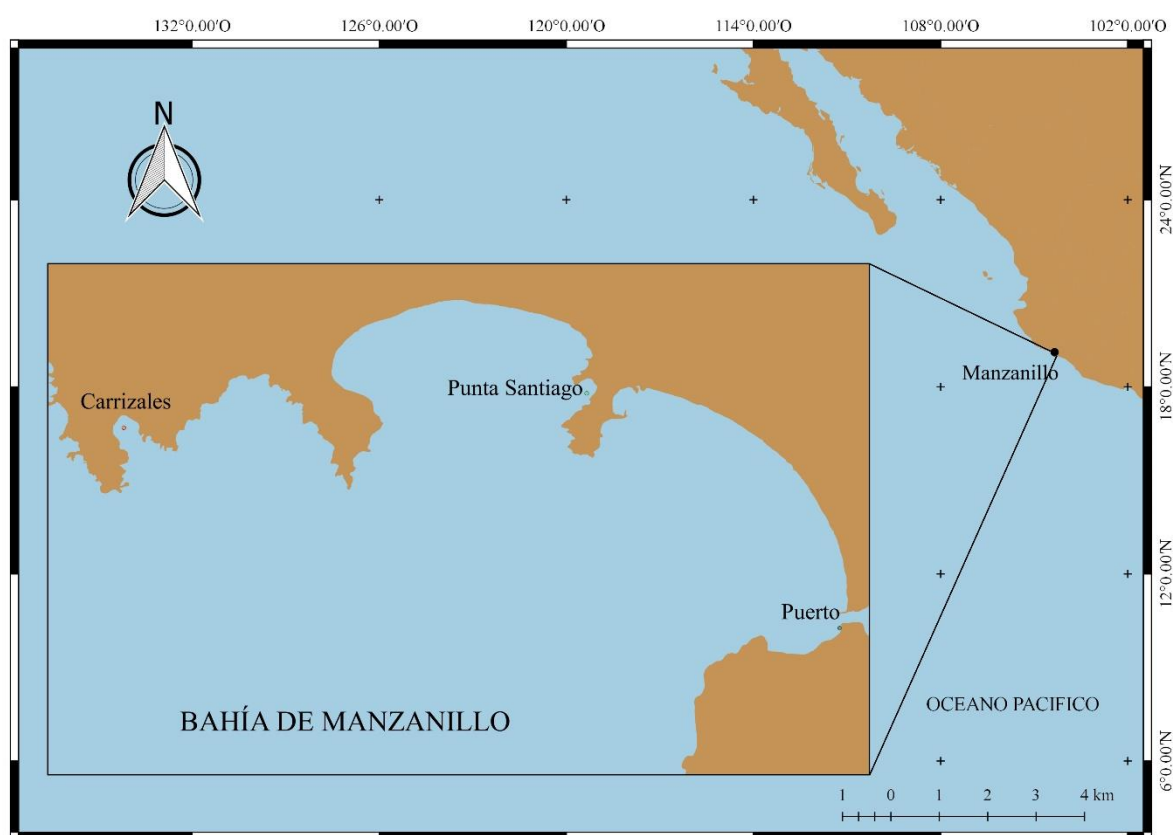


Figura. 1: Área de estudio y localidades de muestreo en la Bahía de Manzanillo, Colima, México.

Las muestras del sedimento marino se colectaron mediante buceo autónomo utilizando tubos de 50 mL previamente esterilizados y en cada sitio se tomaron tres réplicas de los primeros 5cm de la capa de sedimentos. Todas las muestras se tomaron a una profundidad de entre 5 y 10 m, así como una distancia entre 5 y 8 m para cada réplica. Las muestras recolectadas se transportaron en una hielera y se mantuvieron a 4 °C hasta su procesamiento en el área de Microbiología Marina del Laboratorio de

## 7.2. Obtención de bacterias.

De cada muestra se obtuvieron las células bacterianas, utilizando dos técnicas con el fin de obtener el mayor número de células posibles.

Técnica uno: Obtención de bacterias mediante agitación en vortex de los sedimentos con agua de mar estéril. Cada muestra almacenada en tubos de 50 mL fue sometida a agitación constante en lapsos de un minuto con cuatro repeticiones por muestra. A continuación, el líquido fue transferido a microtubos estériles de 1.5 mL. Posteriormente las células fueron concentradas mediante centrifugación a 12,000 rpm (revoluciones por minuto) durante dos minutos y el pellet fue resuspendido en un volumen de 1 mL en agua de mar estéril. Después se realizaron diluciones seriales de  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  con agua de mar estéril para cada una de las muestras; finalmente se tomaron 100  $\mu$ l de cada dilución y se sembraron por separado en medio Zobell marino sólido con la técnica de extensión en placa (Anexo I). Las cajas de petri fueron incubadas de cinco a siete días a 28 °C para favorecer el crecimiento bacteriano (Fig.2).

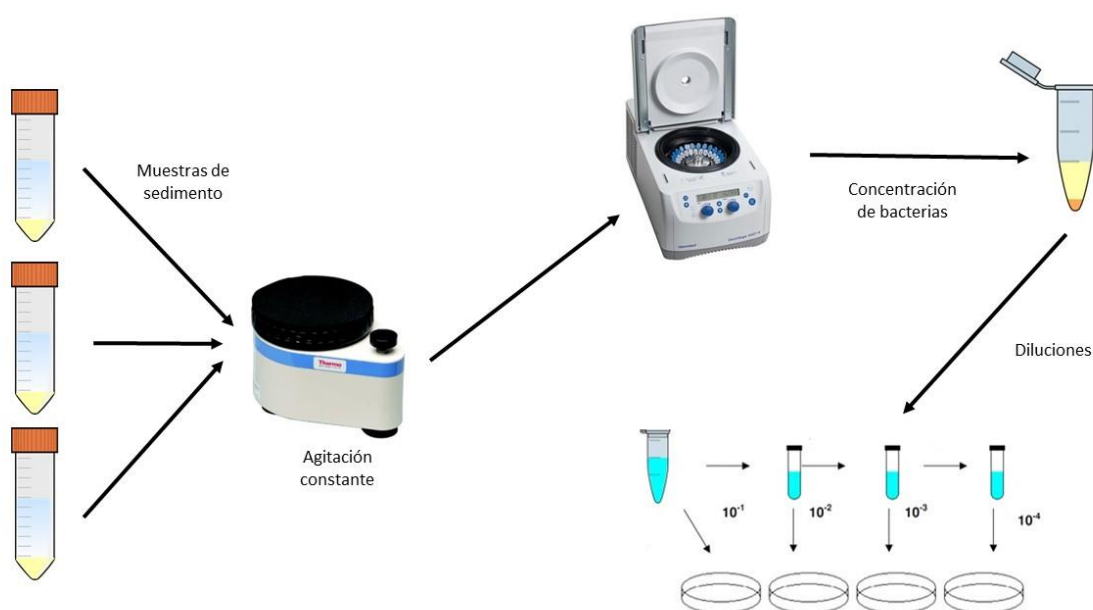


Figura 2. Método vortex utilizado para el aislamiento y obtención de abundancias bacterianas de los sedimentos marinos.

Técnica dos: Estampado en placa, una parte del sedimento fue transferida a una caja Petri estéril, con un algodón humedecido con agua de mar estéril se tomó sedimento de la placa y después se estampó en otra caja de Petri con medio Zobell marino. El estampado se realizó varias veces en dirección de las manecillas del reloj a manera de dilución, por lo que el primer estampado sobre la caja Petri contiene más sedimento que el ultimo estampado de la caja (Mincer *et al.*, 2002; Becerril, 2011), en seguida las cajas fueron incubadas a 28 °C de cinco a siete días (Fig.3). Esta técnica se utilizó principalmente para obtener aquellas bacterias que no se desprendieron de las partículas de sedimento mediante la agitación vortex.

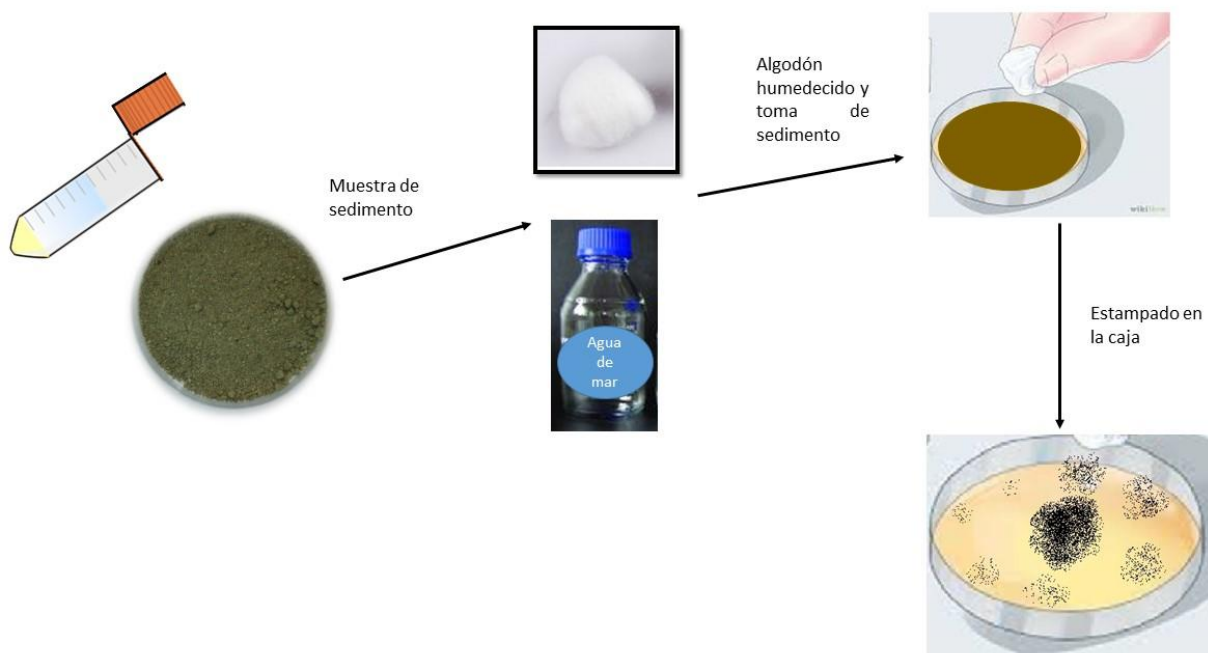


Figura 3: Método estampado en placa utilizado para el aislamiento y obtención de abundancias bacterianas de los sedimentos marinos.

### 7.3. Abundancias de bacterias heterótrofas cultivables

Con la finalidad de estimar la presencia de TBT en el área de estudio (ya que no se contaba con las concentraciones de TBT en las localidades de muestreo), se estimaron las abundancias totales de las bacterias heterótrofas en medio Zobell marino (sin TBT) para cada sitio (abundancia total) y otras con adición de TBT a una concentración de 420  $\mu\text{M}$  (Anexo I) (abundancia de bacterias resistentes al TBT). Por lo tanto, dependiendo de la abundancia de bacterias resistentes al TBT, por sitio, para fines del presente estudio representa de forma indirecta el grado de contaminación por TBT.

Una vez sembrada la muestra en las cajas Petri, se incubaron a 28 °C por cinco días para determinar la abundancia de bacterias. Cabe mencionar que las cajas Petri con adición al TBT se mantuvieron en la oscuridad para evitar la fotodegradación del compuesto. Estos resultados se obtuvieron siguiendo la técnica de agitación por vortex de los sedimentos marinos. Posteriormente se calculó la abundancia de bacterias para cada sitio de muestreo en ambas temporadas y para ambos medios (con y sin adición de TBT), determinando el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mililitro de muestra. Es importante mencionar que para la temporada cálida no se pudieron obtener las abundancias con adición al TBT, ya que no se contaba con el material necesario en ese momento, por lo que se realizó un tercer muestreo en junio del 2017 y se comparó el resultado obtenido en las abundancias sin adición el TBT del muestreo de julio 2016. Para ello se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) permutacional de dos vías con factores cruzados y efectos fijos, donde el primer factor fueron los Sitios con tres niveles (Carrizales, Punta Santiago y Puerto) y el segundo los diferentes muestreos (julio del 2016 y junio del 2017):

$$Y = \mu + S_i + M_j + S_i * M_j + e_{ij}$$

donde  $S_i$  son los Sitios y  $M_j$  son los Muestreos.

Los resultados de este análisis no mostraron diferencias significativas entre éstas, por lo que, los datos de abundancia total de junio del 2017 se utilizaron en vez de los datos de julio del 2016.

## 7.4. Aislamiento y purificación de bacterias

Una vez obtenidas las abundancias se llevó a cabo el aislamiento y purificación de las cepas bacterianas. Para el aislamiento fue necesario seleccionar todas las colonias bacterianas que presentaron diferentes morfologías, para ello se consideraron varios aspectos como: forma de la colonia, elevación, margen, tamaño, textura, apariencia, pigmentación y propiedad óptica (Fig. 4).

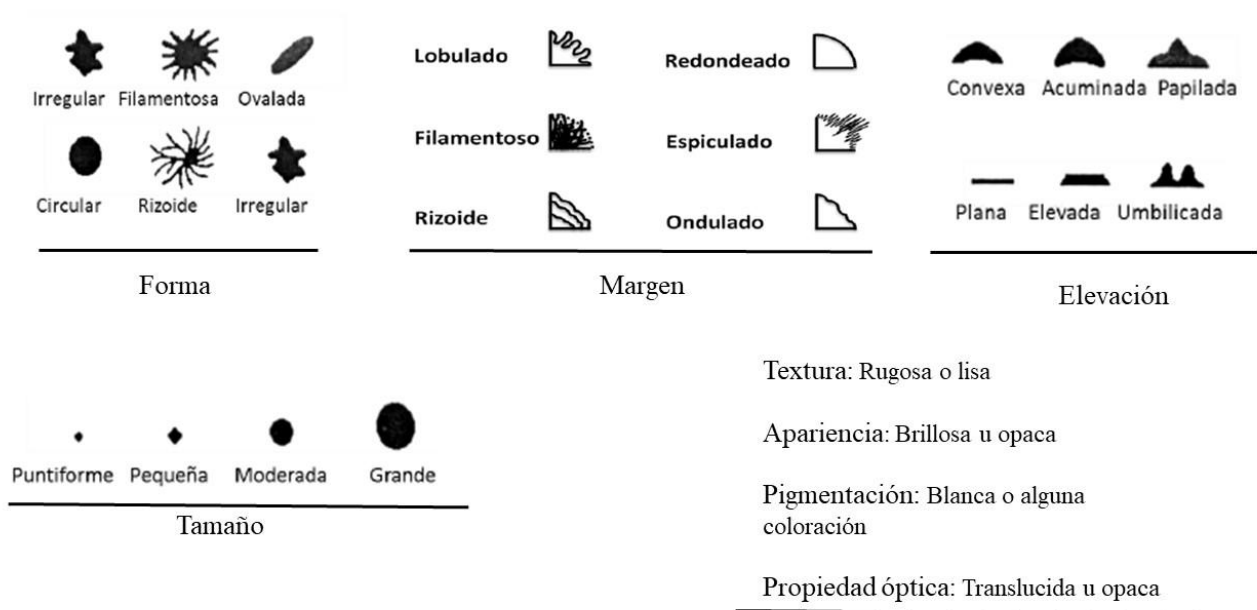


Figura 4. Aspectos morfológicos de colonias bacterianas consideradas para el aislamiento y purificación de las cepas bacterianas, considerando lo descrito por (Gephardt *et al.*, 1981).

Las colonias seleccionadas fueron aisladas mediante la técnica de picado por palillo, estos se colocaron en tubos de ensayo con 2 mL de medio líquido Zobell marino (Anexo I). Los cultivos se incubaron con agitación constante a una velocidad de 200 rpm y una temperatura de 28 °C durante 24 hrs para favorecer el crecimiento. Luego, las cepas fueron estriadas en cajas Petri con medio sólido Zobell marino e incubadas a 28 °C durante 48 hrs. Una vez realizada esta etapa de crecimiento se comprobó el grado de purificación de las cepas; en el caso de encontrar contaminación en la caja, se realizaba otro aislamiento de la cepa a partir de la muestra original hasta obtener la cepa pura (Fig. 5).

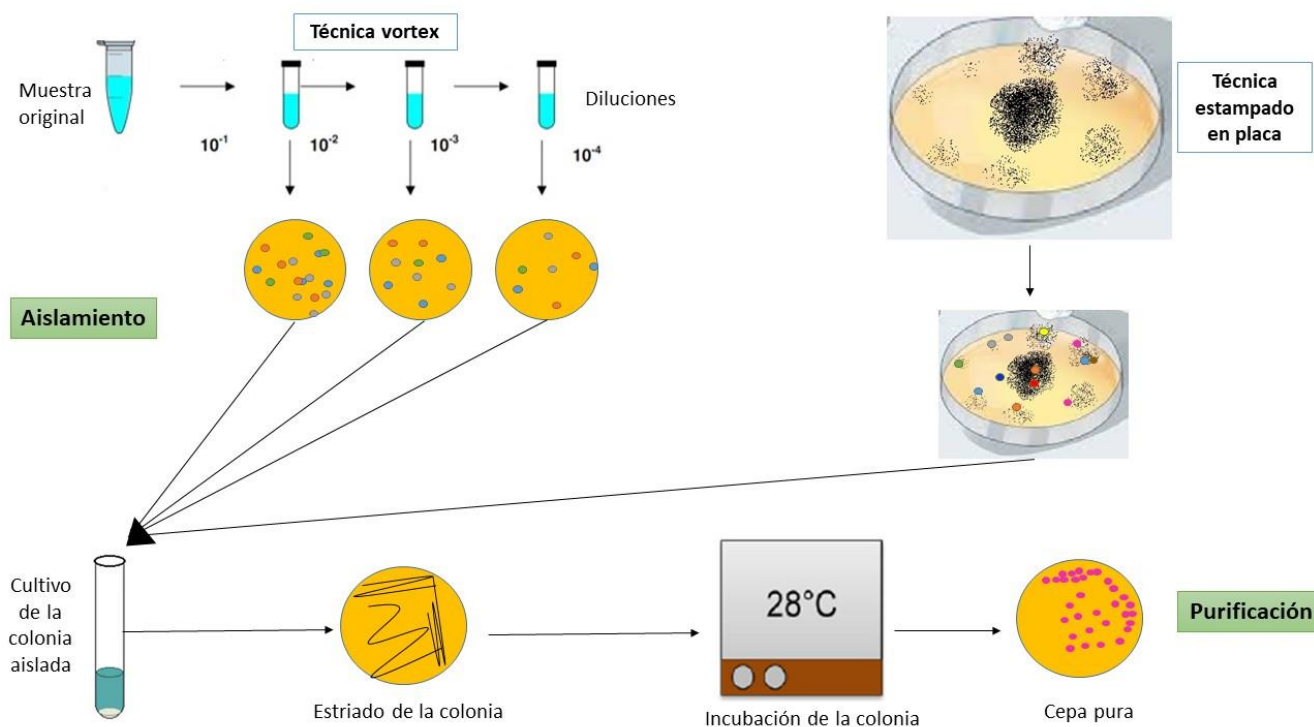


Figura 5. Métodos para el aislamiento y purificación de cepas bacterianas de sedimentos marinos de los sitios de muestreo.

A cada cepa purificada se le asignó un código de identificación en donde se distingue el origen de cada muestra. Ejemplo: el código P1MZ16.9, la letra “P” indica la abreviación para la localidad de donde se tomó la muestra, en este caso el Puerto, el número “1” representa el número de replica que se tomó de esa localidad, las letras (MZ) son el área de estudio la cual es Manzanillo, el número “16” indica el año y la temporada en el que se tomó la muestra, para el ejemplo es julio del 2016 y por último el número “9” representa el número de cepa aislada de esa muestra.

A todas las cepas aisladas y purificadas se les realizó la tinción de Gram y después fueron criopreservadas con glicerol al 45 %. De cada cepa pura se realizó un duplicado y se almacenaron en un ultracongelador a -80 °C. Esto para análisis posteriores y para la creación del cepario.

## 7.5. Prueba de resistencia al TBT

Las cepas bacterianas del cepario, tanto del primer muestreo (julio 2016) como del segundo (enero 2017), fueron utilizadas para las pruebas de resistencia al TBT. Para esto se prepararon cajas Petri con medio sólido Zobell marino sin TBT (control positivo) y otras cajas con los tratamientos en diferentes concentraciones de TBT (420  $\mu$ M, 820  $\mu$ M, 1.26 mM, 2.5 mM, 3.75 mM, 5 mM y 7.5 mM) (Anexo D). Las cajas se inocularon mediante estriado y se dejaron crecer por cinco días a 28°C en la oscuridad. Posteriormente se registró cuales bacterias mostraron crecimiento y por lo tanto resistencia al TBT (Fig. 6).

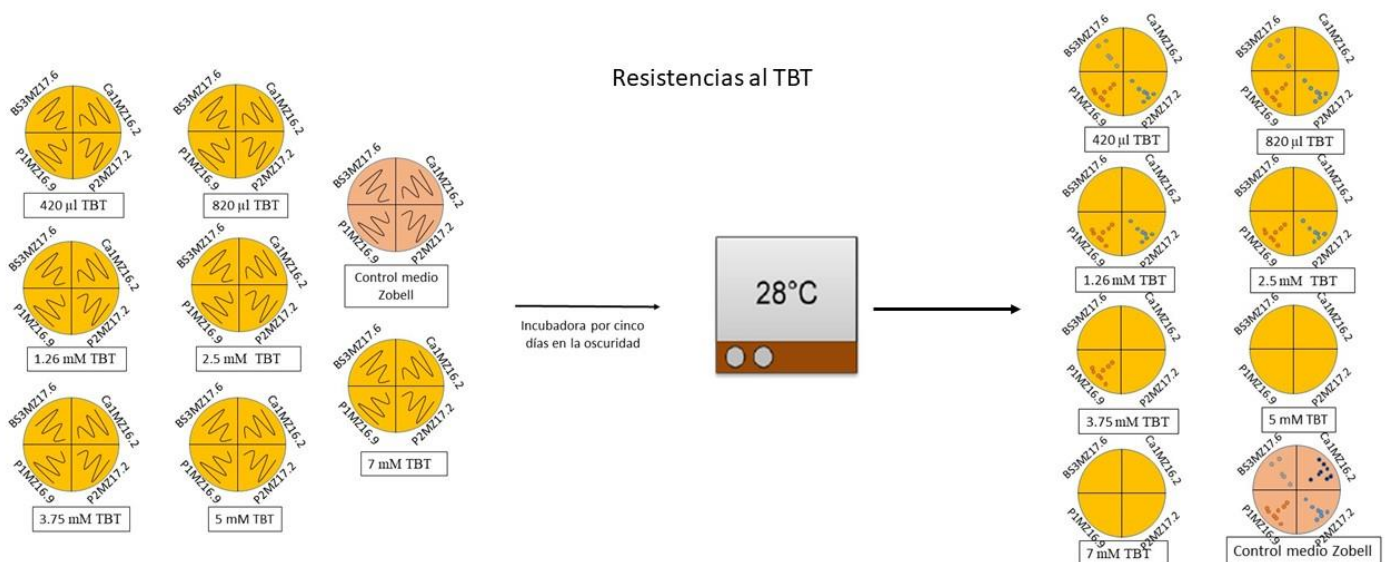


Figura 6. Método empleado para las pruebas de resistencia al TBT de las cepas bacterianas utilizando diferentes concentraciones de TBT en medio zobell marino

## 7.6. Determinación del uso de TBT como fuente de carbono

Para este objetivo, se utilizaron las bacterias que demostraron mayor resistencia a las diferentes concentraciones de TBT (de 420  $\mu\text{M}$  a 7.5 mM), evaluadas en el apartado 7.5. Las cepas seleccionadas se cultivaron en tres medios de cultivo líquido: I) Medio enriquecido de nutrientes (Zobell marino); II) Medio mínimo en nutrientes (Zobell marino al 10% de nutrientes) y III) Medio mínimo en nutrientes con TBT adicionado (concentración más alta que resistieron las cepas bacterianas) (Anexo I). Posteriormente, las bacterias se inocularon en los tres diferentes medios y fueron incubados en agitación constante por 24 hrs en ausencia de luz a 28 °C y 120 rpm.

La capacidad de las bacterias para utilizar el TBT como fuente de carbono, se evaluó mediante modelos diferenciales de crecimiento logístico (Verhulst 1848), incorporando los parámetros  $\alpha$  y  $\gamma$  de la modificación de Blumberg (Peleg *et al.*, 2007):

$$\frac{dN}{dt} = rN^{\alpha} \left(1 - \frac{N}{K}\right)^{\gamma}$$

donde  $r$  explica la velocidad de crecimiento,  $N$  la abundancia,  $\alpha$  la capacidad de crecimiento exponencial ( $\alpha < 1$  sin capacidad de un crecimiento exponencial),  $K$  la capacidad de carga,  $\gamma$  la sensibilidad a los recursos del medio ( $\gamma > 1$  sensibilidad al recurso). Este modelo se construyó con lecturas de densidad óptica (600 nm) por triplicado obtenidas en un espectrofotómetro en intervalos de 1 hora, como indicador de la abundancia de bacterias ( $N$ ). Los datos fueron ajustados por mínimos cuadrados.



## 7.7. Pruebas moleculares

La identificación molecular de las bacterias degradadoras de TBT se realizó mediante la extracción del ADN genómico con el uso del kit de extracción “kit Dneasy blood and tissue, QIAGEN®, siguiendo las indicaciones del fabricante (Anexo II). La calidad del ADN genómico se verificó mediante geles de agarosa al 1 % teñido con SYBR Safe DNA gel stain, (Invitrogen®) (Anexo II), en un fotodocumentador de geles INFINITY–ST5.

Se amplificó el gen ribosomal 16S mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), con el par de cebadores: 27F (5´-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3´) y 1492R (5´-TAC CTT GTT ACG ACT T-3´). Todas las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 25 µl utilizando el kit Dream Taq Green Master Mix (2X) (#K1081) de ThermoScientific®, que incluye la Taq polimerasa, los nucleótidos y buffers para que se lleve a cabo la reacción. Las condiciones para las reacciones de PCR fueron las siguientes:

1) desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min; 2) 30 ciclos a 95°C durante 1 min, 56°C durante 1 min, y 72°C durante 1 min; 3) una extensión final de 10 min a 72°C. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1% teñido con SYBR Safe DNA gel stain, (Invitrogen®) en agitación constante durante 30 minutos y observado en luz ultravioleta en el fotodocumentador de geles (Anexo II).

Para la purificación de los fragmentos de PCR se realizó la extracción de bandas del gel de agarosa mediante el uso del kit “GenElute™ Gel Extration” (NA1111 Sigma-Aldrich®) siguiendo las indicaciones del fabricante (Anexo II). Corroborando la calidad y pureza de las bandas en el fotodocumentador. Posteriormente los fragmentos purificados se enviaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT).

Las secuencias obtenidas fueron analizadas para determinar su calidad mediante el Software Chromas (Technelysium, DNA Sequencing Software), el alineamiento (Blast) se realizó en bases de datos de secuencias nucleóticas como el sitio web del GeneBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). Sí la secuencia tiene una similitud por arriba del 97 % de identidad se considera que es la misma especie de bacteria que está en la base de datos. Porcentajes menores de 97 % y superior al 90 % se consideran del mismo género que las de la base de datos.

## 7.8. Análisis estadísticos

Para evaluar la variación de la abundancia de bacterias (representada como UFC) sin TBT y con TBT entre los sitios a través de dos temporadas de muestreo, se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) permutacional de tres vías con factores cruzados y efectos fijos (modelo tipo I), donde el primer factor fueron los Sitios con tres niveles (Carrizales, Punta Santiago y Puerto), el segundo fue la Temporada de Muestreo con dos niveles (cálido-lluvioso y templado-seco); mientras que el tercero factor fue el tratamiento de TBT (cultivos con o sin TBT). El diseño experimental correspondió la siguiente ecuación:

$$Y = \mu + T_i + S_j + TBT_k + T_i * S_j + T_i * TBT_k + S_j * TBT_k + T_i + S_j + TBT_k + e_{ijk}$$

donde  $T_i$  es Temporada de Muestreo,  $S_j$  son los Sitios y  $TBT_k$  son los Tratamientos de TBT. Las pruebas *a posteriori* basadas en permutaciones se hicieron a través de pruebas Pseudo-t.

El análisis estadístico de los tres medios de cultivo utilizados en la prueba de degradación del TBT (curvas de crecimiento) para cada cepa bacteriana se probó también con un ANDEVA permutacional de una vía, con un factor con tres niveles (medio enriquecido, medio mínimo y medio TBT). Para el análisis solamente se utilizaron los datos de la hora 14 ya que todas las cepas se encontraban en fase estacionaria y por lo tanto, es posible la comparación de crecimiento entre los tres medios utilizados, se utilizaron las probabilidad de Monte Carlo, ya que, mostró permutaciones menores a 100. Además, también se realizaron pruebas *a posteriori* con base en permutaciones.

$$Y = \mu + M_i + e_i$$

donde  $M_i$  representa los diferentes medios de cultivo

Todos los análisis fueron realizados mediante el programa Primer 6 + Permanova (Anderson *et al.*, 2008).

## 8. Resultados

### 8.1. Abundancias de bacterias heterótrofas cultivables

El ANDEVA basado en permutaciones entre junio del 2016 y julio del 2017 mostró que no existieron diferencias significativas en los factores individuales (Temporadas y Sitios) ni en la interacción de Temporada (entre muestreos) entre ellos (Cuadro 1). Por lo que se tomaron los datos de abundancia de julio del 2017 como representativos de los muestreos de la temporada cálido-lluvioso para los análisis posteriores de este trabajo.

**Cuadro 1:** Análisis de varianza basado en permutaciones para los datos de abundancias entre junio del 2016 y julio del 2017.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Gl</b>	<b>SC</b>	<b>SCM</b>	<b>Pseudo-F</b>	<b>P(perm)</b>	<b>Permutaciones</b>
Temporada	1	1246.8	1246.8	1.1825	0.2805	9944
Sitios	2	1349.6	674.8	0.6400	0.7529	9913
TemXSit	2	3834	1917	1.8182	0.0931	9925
Res	12	12652	1054.3			
Total	17	19083				

El ANDEVA basado en permutaciones entre las abundancias por Sitio (Carrizales, Punta Santiago y Puerto), Temporadas (Cálido-lluviosa y Templado-Seca) y Tratamiento (con y sin TBT) mostró diferencias significativas entre los factores individuales (Tratamiento y Temporada) y en la interacción de estos, mientras que el factor de Sitio no mostró diferencias significativas (Cuadro 2, Fig.7).

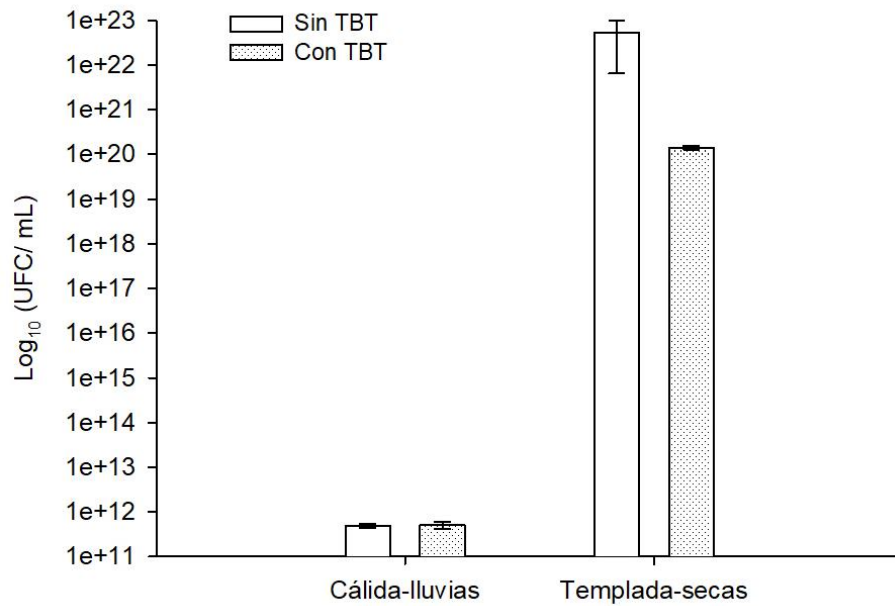


Figura 7. Abundancias bacterianas en Unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) para cada temporada. Los datos de UFC fueron transformados a Log<sub>10</sub> para una mejor representación.

**Cuadro 2:** Análisis de varianza basado en permutaciones para los datos de abundancias.

Fuente de variación	Gl	SC	SCM	Pseudo-F	P(perm)	Permutaciones
Sitio	2	11.511	5.7556	1.2366	0.3081	9956
Tratamiento	1	59.436	59.436	12.777	<b>0.0011</b>	9836
Temporada	1	3834	3834	823.72	<b>0.0001</b>	9774
SitxTra	2	7.8798	3.9399	0.8468	0.4513	9943
SitxTem	2	30.048	15.024	3.2278	0.0564	9957
TraxTem	1	58.065	58.065	12.475	<b>0.0009</b>	9835
SitxTraxTem	2	4.6446	2.3223	0.4989	0.6150	9942
Res	24	111.71	4.6544			
Total	35	4117.2				

## **8.2. Aislamiento, purificación, características morfológicas y tinciones Gram de las colonias bacterianas**

### 8.2.1. Temporada Cálido-lluviosa (julio 2016)

Se aislaron y purificaron un total de 54 cepas bacterianas diferentes (con relación a sus características morfológicas) para la temporada cálida. La prueba de tinción Gram, mostró que el 94% de las cepas son Gram negativas y el 6% Gram positivas. De las cuales, el 56.5 % de las cepas fueron cocobacilos, el 21.7 % bacilos, el 17.5 % cocos y el 4.3 % espiroquetas (Fig. 10). Del total de cepas aisladas, 16 pertenecieron a la localidad de Punta Santiago, 20 cepas a Carrizales y 18 cepas de la localidad del Puerto. En cuanto a las características morfológicas de las colonias, el 88 % presentaron forma circular, el 75 % tuvieron un margen entero, el 41 % presentaron una elevación acuminada, el 51 % fueron de tamaño moderado, el 88% mostraron una textura suave, el 100 % presentaron una apariencia brillante, el 92% no presentaron pigmentación y por último el 59 % tuvieron una propiedad óptica opaca (Cuadro 3, Fig. 8).

### 8.2.2. Temporada Templado-Seca (enero 2017)

En cuanto a la temporada fría se aislaron y purificaron un total de 64 cepas bacterianas. De acuerdo con la tinción Gram el 69 % fueron Gram negativas y el 31 % Gram positivas. En cuanto a la forma celular el 50% de las cepas fueron cocobacilos, 37.5 % bacilos y el 12.5 % cocos (Fig. 10). Del total de las cepas aisladas, 14 cepas fueron aisladas de Punta Santiago, 23 cepas de Carrizales y 27 cepas del Puerto. Con respecto a las características morfológicas de las colonias, el 88% presentaron forma circular, el 80 % tuvieron un margen entero, el 42 % presento una elevación convexa, el 49 % fueron de un tamaño pequeño, el 83% tuvieron textura suave, el 100 % presento una apariencia brillante, el 59 % no mostró alguna pigmentación y por último el 68 % tuvieron una propiedad óptica opaca (Cuadro 3, Fig.9).

**Cuadro 3:** Características de los atributos morfológicos de las colonias bacterianas aisladas y purificadas de ambas temporadas de muestreo. Los datos corresponden al porcentaje las características morfológicas del total de las cepas bacterianas.

	<b>Cálido-lluviosa (julio 2016)</b>	<b>Templado-seca (enero 2017)</b>		<b>Cálido-lluviosa (julio 2016)</b>	<b>Templado-seca (enero 2017)</b>
<b>Forma</b>	Porcentaje (%)	Porcentaje (%)	<b>Textura</b>	Porcentaje (%)	Porcentaje (%)
Circular	84	88	Rugosa	12	17
Irregular	10	5	Suave	88	83
Ovalada	0	5	<b>Apariencia</b>		
Filamentosa	6	2	Brillosa	100	100
<b>Margen</b>			<b>Pigmentación</b>		
Entero	75	80	Amarillo	6	19
Filamentosa	6	2	Café	0	5
Ondulado	10	3	Gris	0	2
Rizado	10	15	Rosa	0	14
<b>Elevación</b>			Naranja	2	2
Acuminada	41	5	Sin Pigmentación	92	59
Convexa	14	42	<b>Propiedad óptica</b>		
Elevada	27	19	Opaca	59	68
Papilada	2	12	Translúcida	39	31
Plana	16	17	Transparente	2	2
Umbilicada	0	5	<b>Tinción Gram</b>		
<b>Tamaño</b>			Gram negativa	94	69
Grande	4	10	Gram positiva	6	31
Moderada	51	37	<b>Forma celular</b>		
Pequeña	43	49	Bacilos	21.7	37.5
Punciforme	2	3	Cocos	17.5	12.5
			Cocobacilos	56.5	50
			Espiroquetas	4.3	0

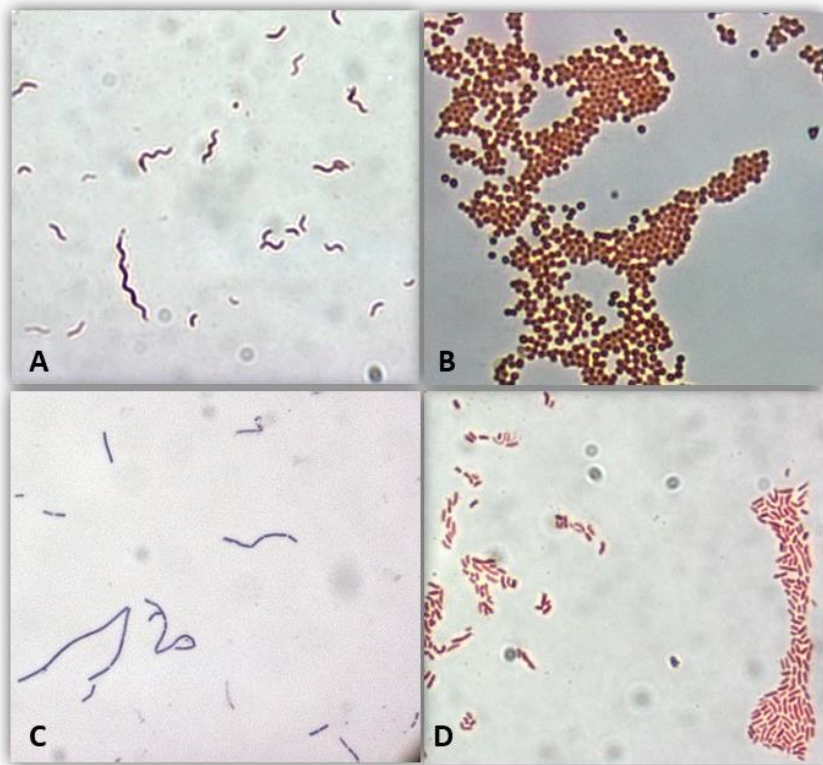


Figura 8: Tinciones Gram de las cepas aisladas: A) espiroquetas Gram negativos, B) cocos Gram negativos, C) bacilos Gram positivos, D) bacilos Gram negativos.

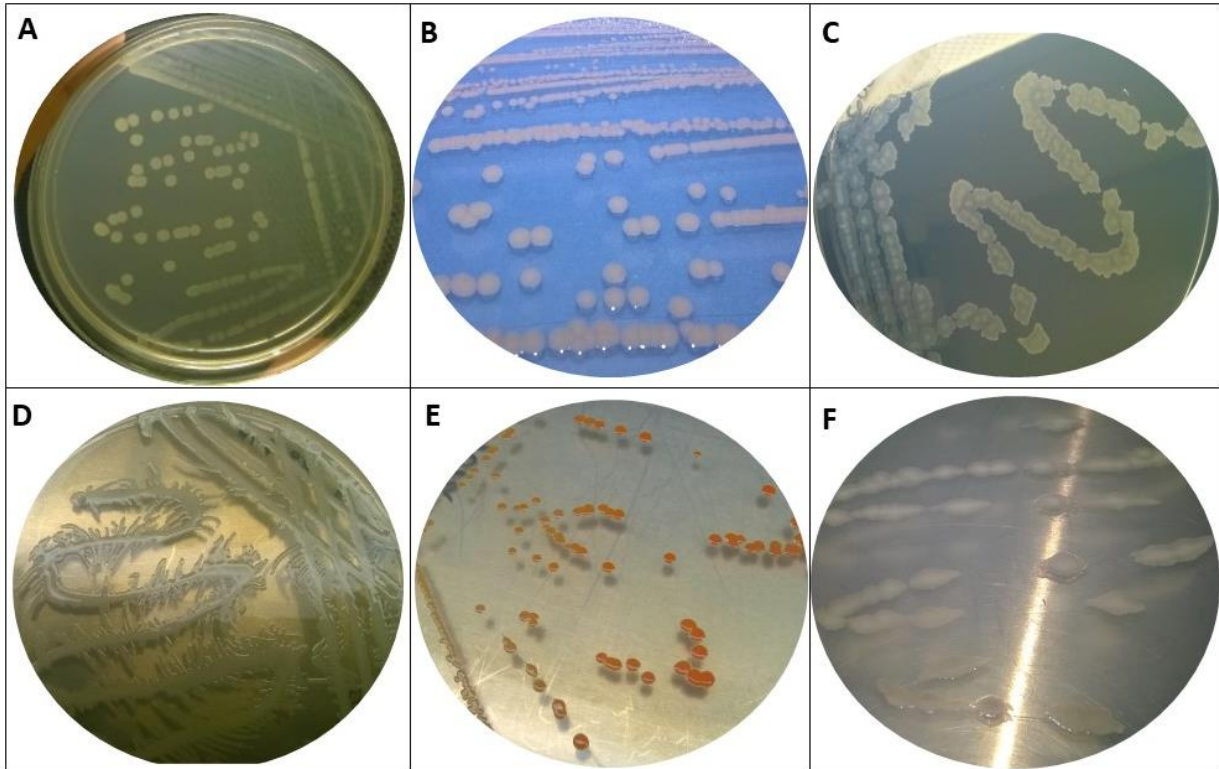


Figura 9: Características morfológicas de las cepas aisladas y purificadas: A) forma circular, sin pigmentación, translúcida, B) margen entero, con pigmentación, C) plana, rugosa, con margen rizado, D) margen filamentosos, apariencia brillante, E) elevación convexa, tamaño pequeño, textura suave F) forma ovalada, rugosa con elevación palpilada.



### **8.3. Resistencia al TBT**

De las 54 cepas bacterianas que fueron aisladas en la temporada cálido-lluviosa, sólo 29 cepas crecieron en presencia de TBT, donde las bacterias aisladas del Puerto presentaron la mayor cantidad de cepas (12), Carrizales 11 cepas y solamente seis cepas de Punta Santiago (Cuadro 4).

En cambio, la temporada templado-seca sólo 21 cepas de las 64 purificadas presentaron crecimiento con TBT, de las cuales siete cepas fueron aisladas de cada uno de los Sitios (Cuadro 4). La concentración máxima de TBT en la que se observó crecimiento bacteriano fue de 3.75 mM, esto para ambas temporadas de muestreo.

Finalmente, con base en las pruebas de resistencia a las diferentes concentraciones de TBT, se seleccionaron dos cepas de la temporada cálido-lluviosa (julio 2016): P1MZ16.9, P3MZ16.7, mientras que para la temporada templado-seca (enero 2017) se seleccionaron cinco cepas; Ca1MZ17.2, Ca1MZ17.6, P1MZ17.12, P2MZ17.6 y P3MZ17.10. Estas cepas fueron seleccionadas debido a que fueron las únicas que mostraron crecimiento en todas las pruebas de resistencia a excepción de las concentraciones de 5 y 7.5mM (Tabla 4). Por lo tanto, estas siete cepas se seleccionaron para realizar pruebas de utilización de TBT como fuente de carbono (degradación del TBT).

**Cuadro 4:** Pruebas de resistencia al TBT de las cepas bacterianas a diferentes concentraciones de TBT. El signo "+" representa crecimiento bacteriano, mientras que el signo "-" no presentan crecimiento bacteriano. Los códigos que tienen un cuadro rojo representan las cepas bacterianas que crecieron en la mayoría de los tratamientos, por lo tanto, fueron seleccionadas para realizar las pruebas de degradación del TBT.

**Temporada cálido-lluviosa (julio 2016)**

Código	Localidad	420 $\mu$ M	840 $\mu$ M	1.26 mM	2.5 mM	3.75 mM	5 mM	7.5 mM
BS1MZ16.2	P. Santiago	-	-	+	-	-	-	-
BS1MZ16.6	P. Santiago	+	-	-	-	-	-	-
BS2MZ16.6	P. Santiago	+	-	-	-	-	-	-
BS2MZ16.9	P. Santiago	-	-	+	-	-	-	-
BS3MZ16.10	P. Santiago	+	-	+	-	-	-	-
BS3MZ16.7	P. Santiago	-	-	+	-	-	-	-
Ca1MZ16.6	Carrizales	+	-	+	-	-	-	-
Ca1MZ16.7	Carrizales	-	-	+	-	-	-	-
Ca2MZ16.1	Carrizales	-	-	+	-	-	-	-
Ca2MZ16.10	Carrizales	+	-	+	-	-	-	-
Ca2MZ16.11	Carrizales	+	-	-	+	+	-	-
Ca2MZ16.8	Carrizales	+	+	+	-	-	-	-
Ca3MZ16.10	Carrizales	+	+	+	-	-	-	-
Ca3MZ16.13	Carrizales	+	-	-	-	-	-	-
Ca3MZ16.17	Carrizales	+	-	+	+	+	-	-
Ca3MZ16.2	Carrizales	+	-	-	-	-	-	-
Ca3MZ16.18	Carrizales	-	-	+	-	-	-	-
P1MZ16.11	Puerto	+	+	+	-	-	-	-
P1MZ16.2	Puerto	+	+	+	-	-	-	-
P1MZ16.3	Puerto	+	-	-	-	-	-	-
P1MZ16.8	Puerto	+	-	-	-	-	-	-
P1MZ16.9	Puerto	+	+	+	+	+	-	-
P2MZ16.10	Puerto	+	-	+	-	-	-	-
P2MZ16.12	Puerto	+	-	-	-	-	-	-
P2MZ16.13	Puerto	+	-	-	-	-	-	-
P2MZ16.2	Puerto	+	+	-	-	-	-	-
P2MZ16.9	Puerto	+	+	-	-	-	-	-
P3MZ16.2	Puerto	+	-	+	+	-	-	-
P3MZ16.7	Puerto	+	+	+	+	+	-	-

**Cuadro 4****Continuación...****Temporada templado-seca (enero 2017)**

BS1MZ17.1	P. Santiago	+	+	-	+	+	-	-
BS1MZ17.7	P. Santiago	-	-	-	+	+	-	-
BS1MZ17.8	P. Santiago	-	-	-	+	+	-	-
BS2MZ17.1	P. Santiago	+	+	-	+	+	-	-
BS2MZ17.10	P. Santiago	+	-	-	-	-	-	-
BS3MZ17.4	P. Santiago	+	+	-	-	-	-	-
BS3MZ17.6	P. Santiago	-	-	+	+	+	-	-
Ca1MZ17.2	Carrizales	+	+	+	+	+	-	-
Ca1MZ17.4	Carrizales	+	-	+	+	+	-	-
Ca1MZ17.5	Carrizales	+	-	-	-	-	-	-
Ca1MZ17.6	Carrizales	+	+	+	+	+	-	-
Ca1MZ17.8	Carrizales	+	+	+	-	-	-	-
Ca2MZ17.3	Carrizales	+	+	-	-	-	-	-
Ca3MZ17.14	Carrizales	-	-	+	+	+	-	-
P1MZ17.12	Puerto	+	+	+	+	+	-	-
P1MZ17.7	Puerto	+	+	+	-	-	-	-
P2MZ17.6	Puerto	+	+	+	+	+	-	-
P3MZ17.10	Puerto	+	+	+	+	+	-	-
P3MZ17.5	Puerto	+	+	+	-	-	-	-
P3MZ17.7	Puerto	+	+	-	-	-	-	-
P3MZ17.8	Puerto	+	-	-	-	-	-	-

#### 8.4. Uso del TBT como fuente de carbono

Para las siete cepas que fueron seleccionadas en las pruebas de resistencia, se les realizaron curvas de crecimiento en medio enriquecido, medio mínimo y medio con TBT. Los resultados del ANDEVA basados en los datos de la hora 14, mostraron diferencias entre los tratamientos (Medio Enriquecido, Medio Mínimo y Medio TBT, Fig. 10). Estos resultados, sólo permiten suponer las bacterias con potencial degradador del compuesto, que son las que muestran un crecimiento igual o mayor en comparación al crecimiento con el medio enriquecido, indicando que están utilizando el compuesto cómo una fuente de energía para el crecimiento.

Las cepas P1MZ16.9, P3MZ16.7 presentaron un crecimiento con medio TBT similar al medio enriquecido (Fig. 10) y no hubo diferencias entre estos medios de cultivo, además, presentaron diferencias en cuanto al medio mínimo. Esto indica que la cepa es capaz de utilizar el TBT como una fuente de carbono para su crecimiento (Cuadro 5).

La cepa Ca1MZ17.10 mostró un crecimiento con medio TBT similar al medio enriquecido (Fig. 10), no obstante, tuvo diferencias entre estos medios ( $P = 0.046$ , Cuadro 5).

P1MZ17.12, P2MZ17.6, P3MZ17.10 y Ca1MZ17.2: son las cepas bacterianas que en medio con TBT presentaron un crecimiento significativamente menor al medio enriquecido y al medio mínimo. Esto indica que son cepas sin la capacidad de utilizar el TBT como fuente de carbono (Cuadro 5).

**Cuadro 5:** Los datos muestran la probabilidad de Monte Carlo, en las pruebas a posteriori en el ANDEVA basado en permutaciones aplicado a la hora 14 entre los diferentes tratamientos en las curvas de crecimiento.

<b>Tratamientos</b>	<b>P1MZ16.9</b>	<b>P3MZ16.7</b>	<b>Ca1MZ17.6</b>	<b>P2MZ17.6</b>	<b>P1MZ17.12</b>	<b>Ca1MZ17.2</b>	<b>P3MZ17.10</b>
Medio Enriq. vs. Medio TBT	0.257	0.114	<b>0.046</b>	<b>0.044</b>	<b>0.0003</b>	<b>0.0070</b>	<b>0.0002</b>
Medio Enriq. vs. Medio Mínimo	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>0.041</b>	<b>0.024</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0005</b>
Medio Mínimo vs. Medio TBT	<b>0.004</b>	<b>0.007</b>	0.298	0.370	<b>0.0206</b>	0.9680	<b>0.0001</b>

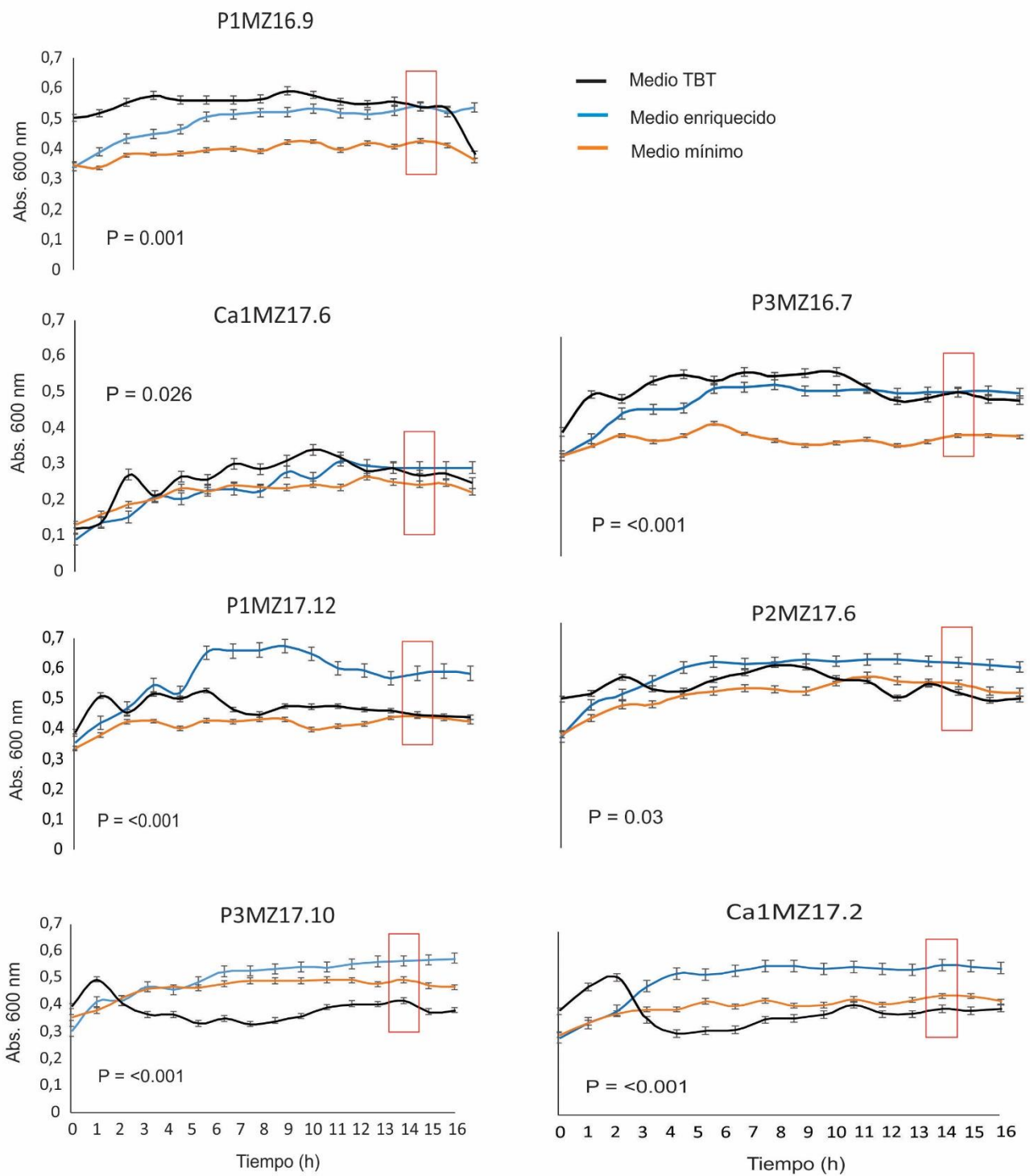


Figura 10. Curvas de crecimiento de las cepas bacterianas en los tres tratamientos (medio enriquecido, medio mínimo y medio TBT). Los cuadros en rojo representan la hora 14.

## 8.4.1. Modelo de crecimiento logístico

### 8.4.1.1. Cepa P1MZ16.9

El ajuste del modelo para los diferentes tratamientos; medio enriquecido (0.00387), medio mínimo (0.00201) y el medio TBT (0.02758). La velocidad de crecimiento de la cepa P1MZ16.9 fue menor en el medio enriquecido con TBT y similar en los otros dos medios Zobell (Fig.11). No obstante, esta cepa presento una mayor capacidad de carga en el medio TBT. La cepa P1MZ16.9 no tuvo la capacidad de crecer exponencialmente en ningún medio evaluado y mostró ser una cepa sensible a los recursos presentados en los tres medios de cultivo. Es importante notar que el valor de  $\gamma$  (sensibilidad al medio) fue mayor en el medio enriquecido con TBT (3.63).

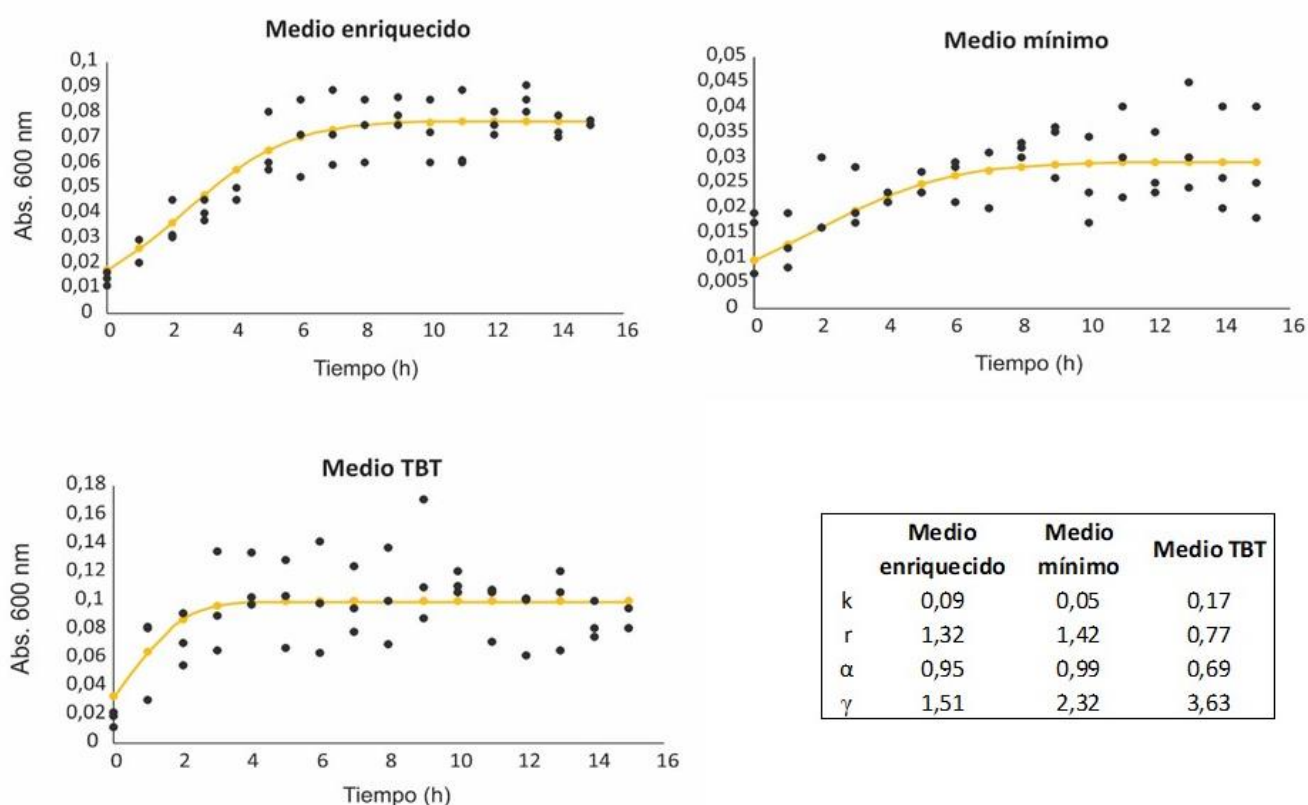


Figura 11: Curvas de crecimiento de la cepa P1MZ16.9 para los tres tratamientos, los puntos representan los valores observados y la línea amarilla el crecimiento poblacional bacteriano estimado por el modelo de Verhulst. En la tabla se muestran los valores de: (k) capacidad de carga; (r) velocidad de crecimiento, ( $\alpha$ ) capacidad de crecimiento exponencial y ( $\gamma$ ) sensibilidad a los recursos del medio.

### 8.4.1.2. Cepa P3MZ16.7

El ajuste del modelo se mostró para cada una de los tratamientos; medio enriquecido (0.00521), medio mínimo (0.00230) y el medio TBT (0.03504). La cepa bacteriana P3MZ16.7 presento con la capacidad de crecer con medio mínimo con TBT a pesar de presentar la menor velocidad de crecimiento ( $r$ ) con respecto al medio enriquecido y medio mínimo y además no presentó un crecimiento exponencial ( $\alpha$ ) (Fig. 12). Sin embargo, esta cepa presentó la mayor capacidad de carga en medio con TBT (0.17) y además mostró ser una cepa sensible a los recursos presentados en los tres medios de cultivo. Es importante notar que el valor de  $\gamma$  fue mayor en el medio enriquecido con TBT (3.98).

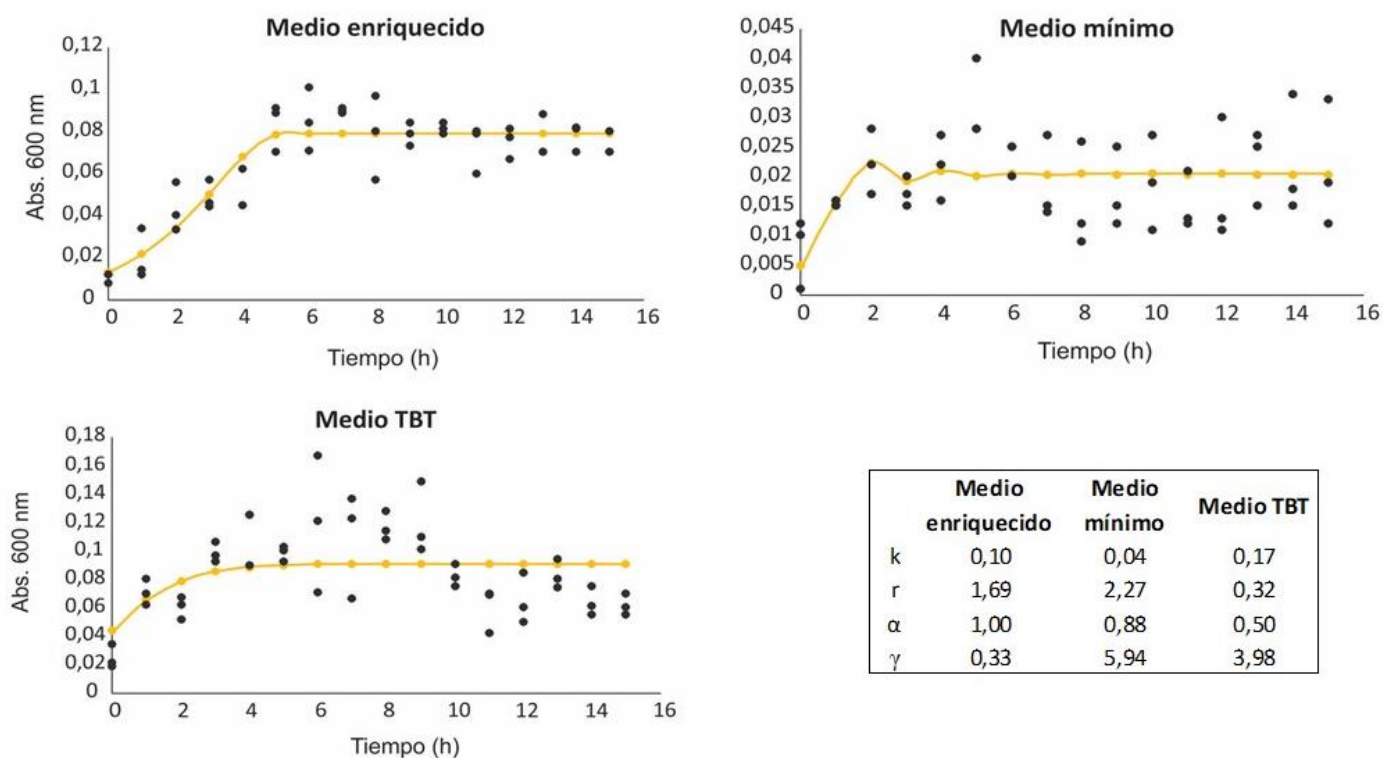


Figura 12: Curvas de crecimiento para los tres tratamientos de la cepa bacteriana P3MZ16.7. Los puntos representan los valores observados y la línea amarilla el crecimiento poblacional bacteriano estimado por el modelo de Verhulst. En la tabla se muestran los valores de: (k) capacidad de carga; (r) velocidad de crecimiento, ( $\alpha$ ) capacidad de crecimiento exponencial y ( $\gamma$ ) sensibilidad a los recursos del medio.

### 8.4.1.3. Cepa Ca1MZ17.6

El ajuste del modelo se presentó en los tres tratamientos; el medio enriquecido (0.05833), medio mínimo (0.00374) y el medio TBT (0.02303). La cepa Ca1MZ17.6 mostró una velocidad de crecimiento en medio con TBT menor que en los otros tratamientos ( $r = 0.29$ ), además no presentó un crecimiento exponencial ( $\alpha = 0.50$ ) y es importante mencionar que tiene una capacidad de carga en medio con TBT igual que el medio enriquecido (Fig. 13), así mismo, no resultó ser sensible al medio TBT ( $\gamma = 0.00$ ).

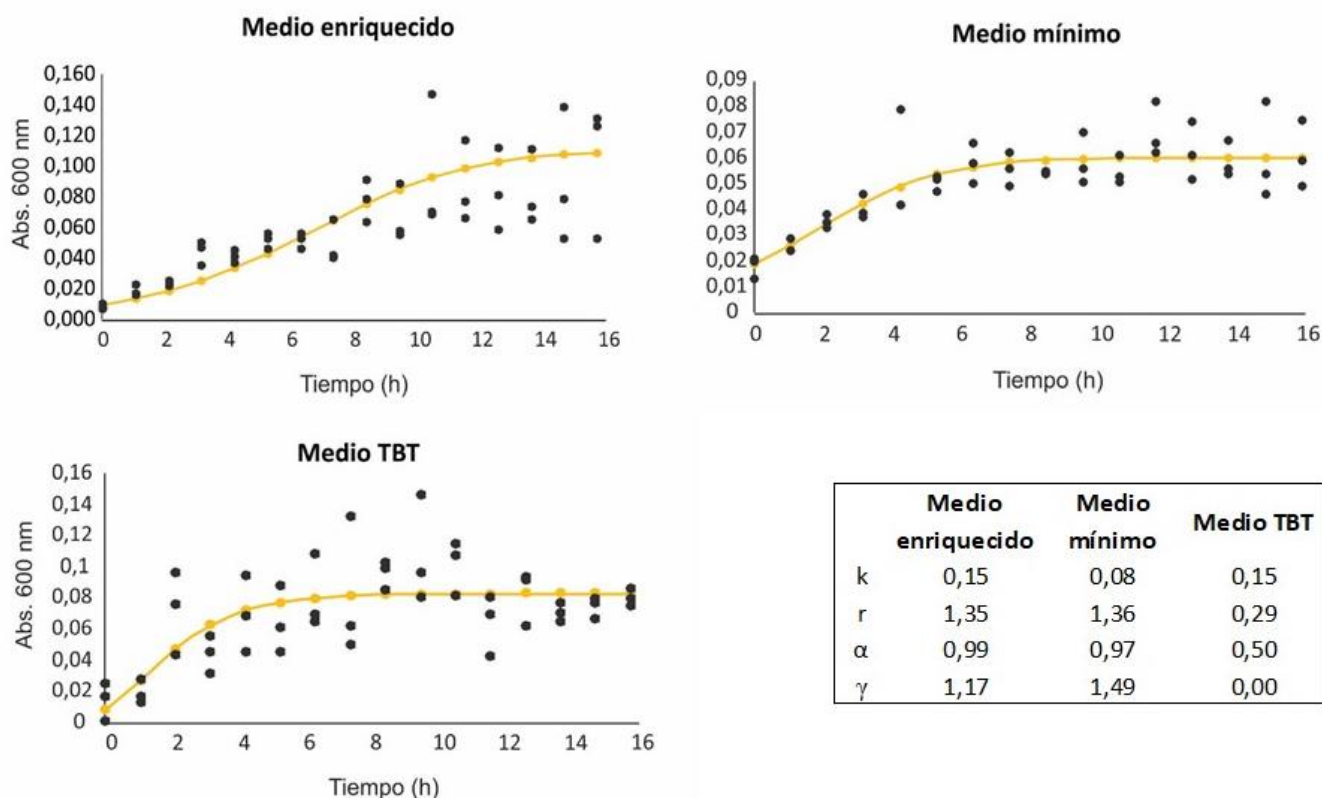


Figura 13: Curvas de crecimiento para los tres tratamientos de la cepa bacteriana Ca1MZ17.6. Los puntos representan los valores observados y la línea amarilla el crecimiento poblacional bacteriano estimado por el modelo de Verhulst. En la tabla se muestran los valores de: (k) capacidad de carga; (r) velocidad de crecimiento, ( $\alpha$ ) capacidad de crecimiento exponencial y ( $\gamma$ ) sensibilidad a los recursos del medio.



#### 8.4.1.4. Cepa P2MZ17.6

El ajuste del modelo se presentó en los diferentes tratamientos; medio enriquecido (0.03405), medio mínimo (0.00258) y el medio TBT (0.00146). En esta cepa la velocidad de crecimiento fue similar en los tres medios evaluados, no cuentan con un crecimiento exponencial y es importante remarcar que, con medio TBT, presentó los mayores valores en cuanto a la sensibilidad al recurso ( $\gamma= 4.50$ ), pero no en cuanto a la capacidad de carga (Fig. 14).

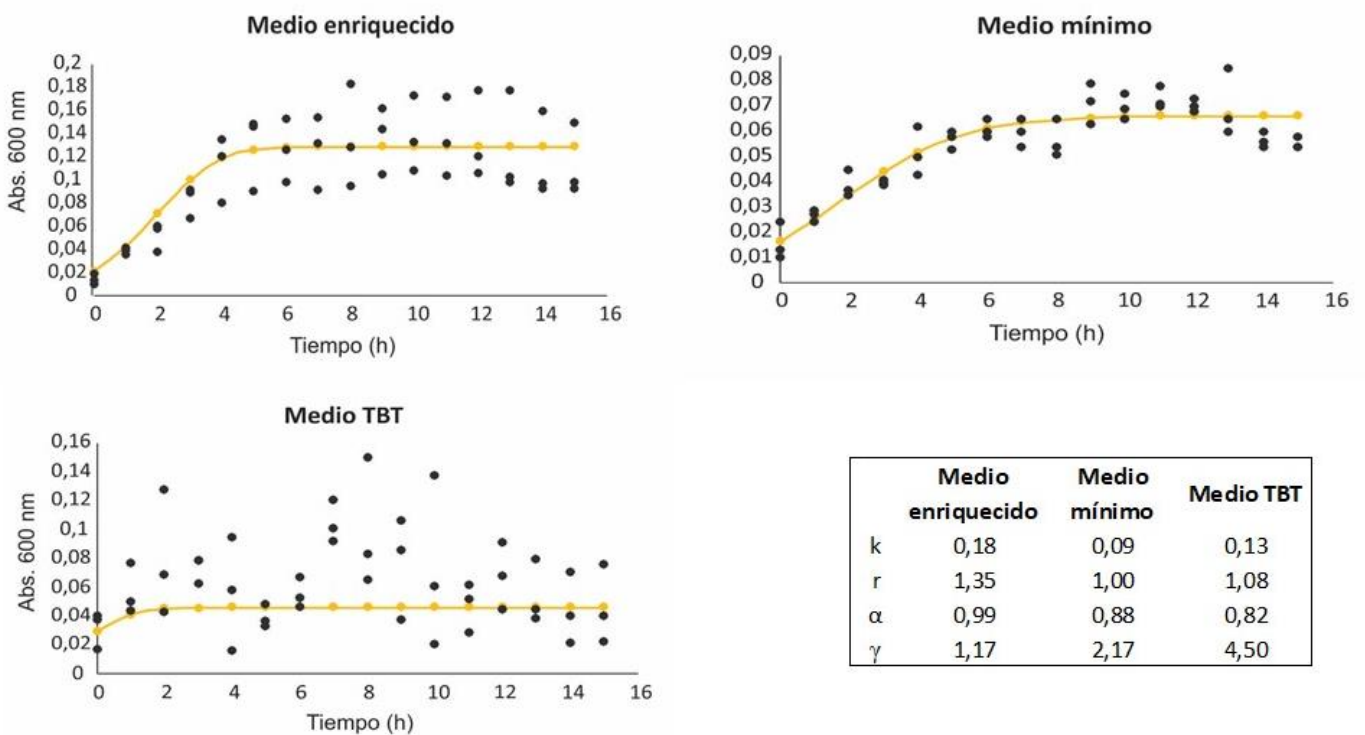


Figura 14: Curvas de crecimiento para los tres tratamientos de la cepa bacteriana P2MZ17.6. Los puntos representan los valores observados y la línea amarilla el crecimiento poblacional bacteriano estimado por el modelo de Verhulst. En la tabla se muestran los valores de: (k) capacidad de carga; (r) velocidad de crecimiento, ( $\alpha$ ) capacidad de crecimiento exponencial y ( $\gamma$ ) sensibilidad a los recursos del medio.

### 8.4.1.5. Cepa P1MZ17.12

El modelo se ajustó a los datos observados para los diferentes tratamientos; medio enriquecido (0,07868), medio mínimo (0,00169) y el medio TBT (0,00536). La cepa P1MZ17.12 mostró sensibilidad a los recursos en medio mínimo y enriquecido a diferencia del medio con TBT que no presenta sensibilidad al recurso (0,11). Además, no presentó crecimiento exponencial y valores similares en la capacidad de carga con el medio mínimo y medio TBT (Fig. 15), a diferencia del medio enriquecido, que presenta la mayor capacidad de carga ( $k= 0.25$ ).

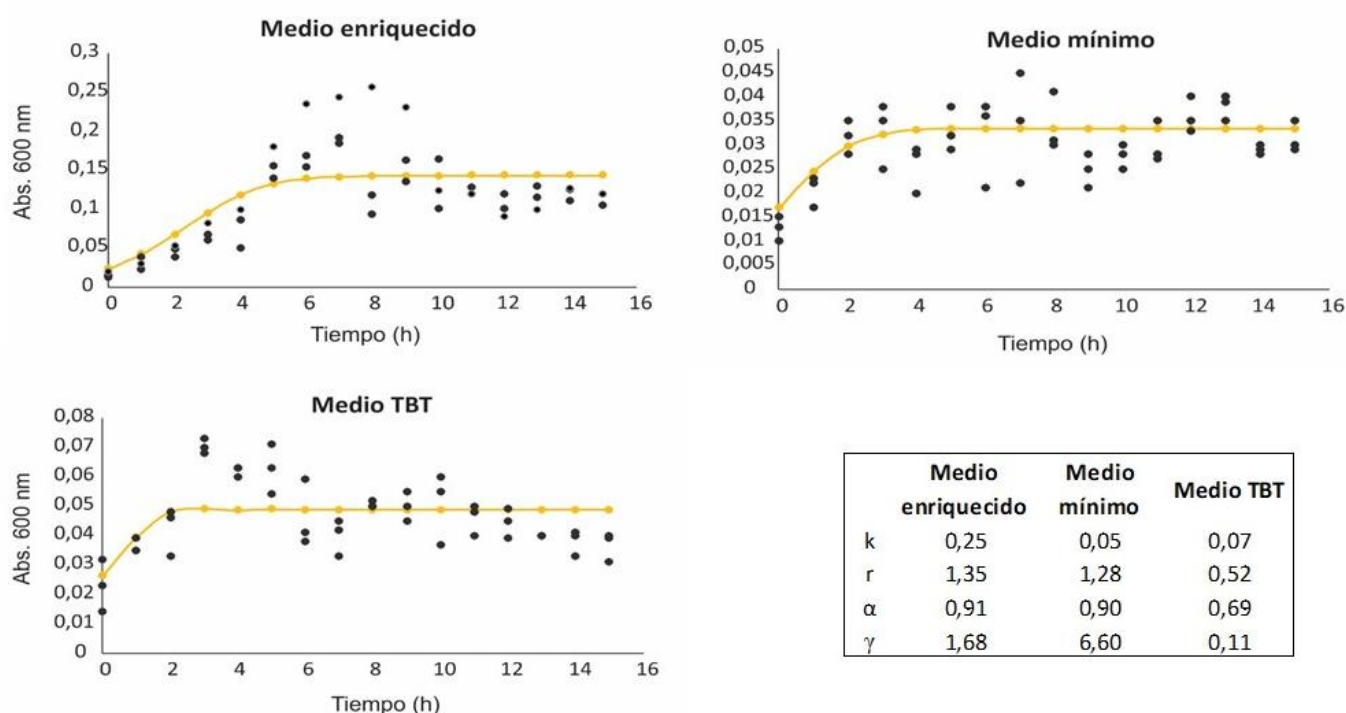


Figura 15: Curvas de crecimiento de P1MZ17.12 para los tres tratamientos. Los puntos representan los valores observados y la línea amarilla el crecimiento poblacional bacteriano estimado por el modelo de Verhulst. En la tabla se muestran los valores de: (k) capacidad de carga; (r) velocidad de crecimiento, ( $\alpha$ ) capacidad de crecimiento exponencial y ( $\gamma$ ) sensibilidad a los recursos del medio.

### 8.4.1.6. Cepa Ca1MZ17.2

El modelo se ajustó a los datos observados para los diferentes tratamientos; medio enriquecido (0.01027), medio mínimo (0.00178) y el medio TBT (0.01474). La cepa Ca1MZ17.2 no presentó crecimiento exponencial en medio con TBT, muestra una capacidad de carga similar al medio mínimo. En medio con TBT Ca1MZ17.2 mostró una alta sensibilidad ( $\gamma = 7.5$ ), la velocidad de crecimiento es similar en los tres medios y no se observó crecimiento exponencial en medio con TBT (Fig. 16).

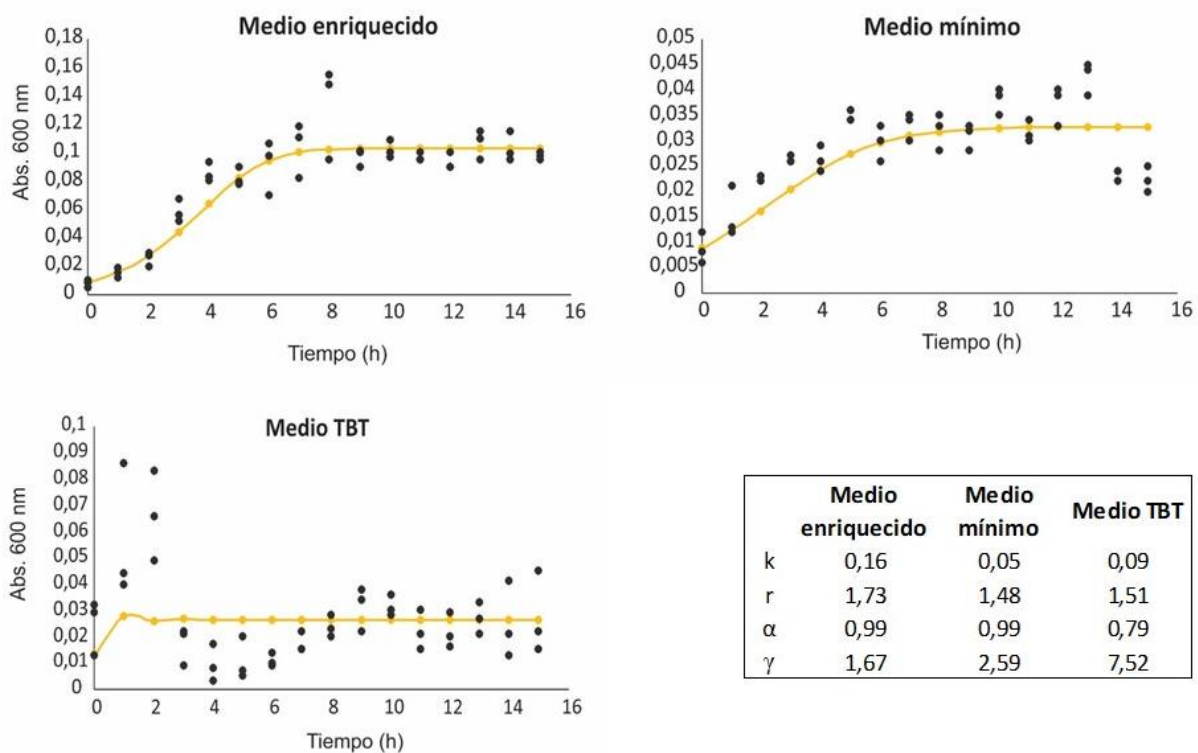


Figura 16: Curvas de crecimiento para los tres tratamientos de la cepa bacteriana Ca1MZ17.2. Los puntos representan los valores observados y la línea amarilla el crecimiento poblacional bacteriano estimado por el modelo de Verhulst. En la tabla se muestran los valores de: (k) capacidad de carga; (r) velocidad de crecimiento, ( $\alpha$ ) capacidad de crecimiento exponencial y ( $\gamma$ ) sensibilidad a los recursos del medio.

### 8.4.1.7. Cepa P3MZ17.10

El ajuste se presentó para los tres tratamientos; medio enriquecido (0,0078863), medio mínimo (0,00155312) y el medio TBT (0,00781515). La cepa P3MZ17.10 presentó un crecimiento exponencial únicamente con medio enriquecido y una mayor velocidad de crecimiento (Fig. 17). Es importante notar que también mostró una alta sensibilidad al medio TBT ( $\gamma = 47.7$ ) y presentó una capacidad de carga igual que en el medio mínimo.

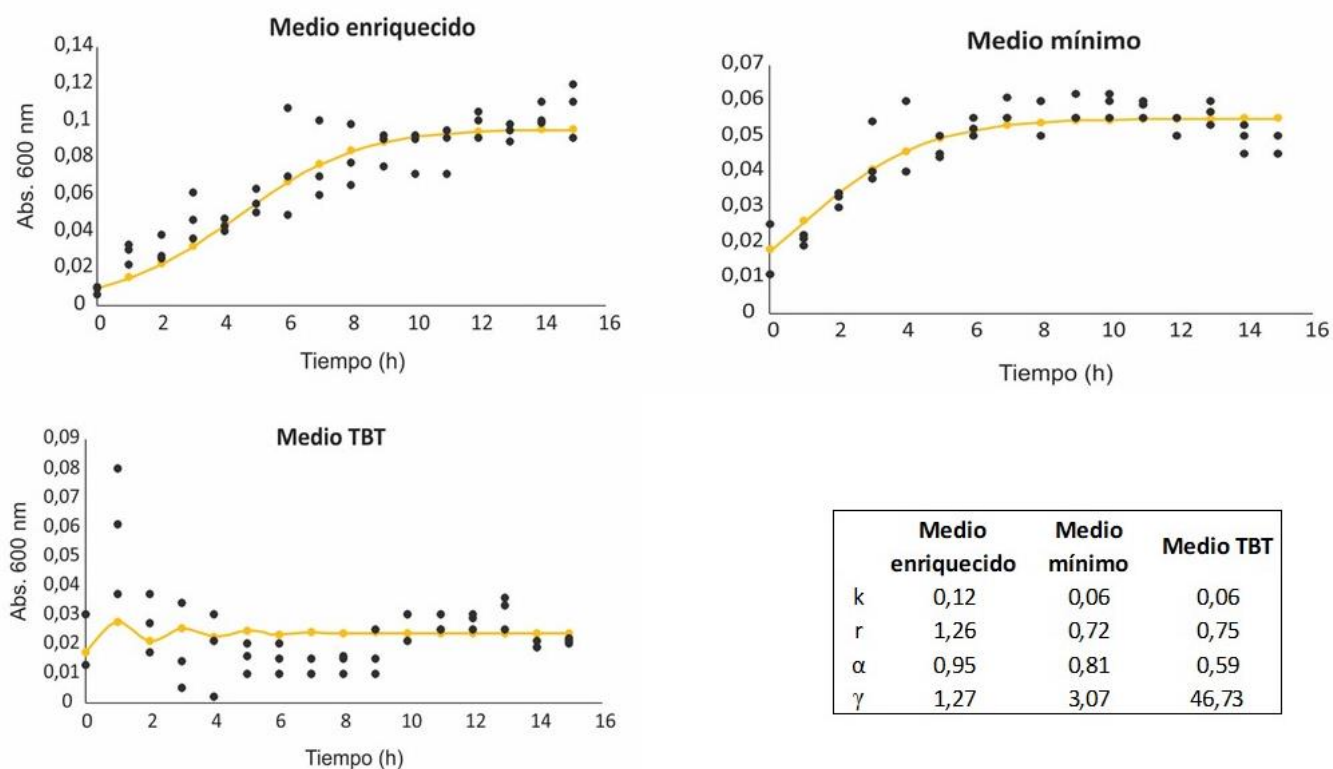


Figura 17: Curvas de crecimiento para los tres tratamientos de la cepa bacteriana P3MZ17.10. Los puntos representan los valores observados y la línea amarilla el crecimiento poblacional bacteriano estimado por el modelo de Verhulst. En la tabla se muestran los valores de: (k) capacidad de carga; (r) velocidad de crecimiento, ( $\alpha$ ) capacidad de crecimiento exponencial y ( $\gamma$ ) sensibilidad a los recursos del medio.

## 8.5. Identificación molecular

Se realizó la extracción del ADN genómico de las siete cepas bacterianas que fueron sometidas a las pruebas de utilización del TBT como fuente de carbono. Posteriormente, se llevó a cabo la amplificación del gen ribosomal 16S, obteniendo, una gran cantidad del producto deseado de un tamaño aproximado de 1500pb. Sin embargo, se amplificaron fragmentos más pequeños de ADN no deseados (Fig. 18).

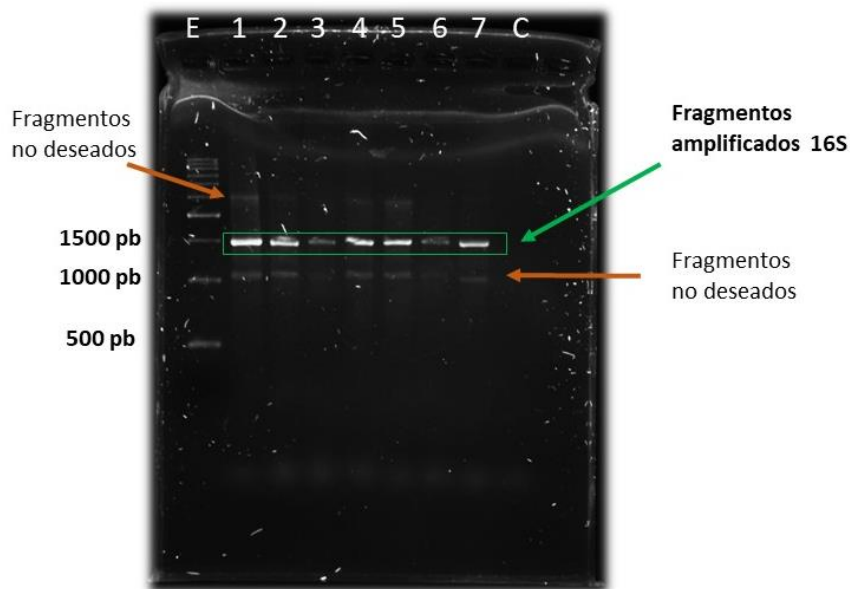


Figura 18. Amplificación del gen ribosomal 16S mediante la técnica de PCR. “E” corresponde a la Escalera de 500pb, los numero de 1 a 7 son los productos de PCR de las muestras de bacterias y “C” representa el control.

Debido a que se visualizaron fragmentos de ADN no deseados, se realizó una purificación de los fragmentos deseados mediante extracción de la banda del gel, en el cual se obtuvo una purificación cercana al 100 % sin contaminación de bandas (Fig. 19). Lo anterior fue necesario repetirlo para algunas cepas bacterianas, debido a la contaminación de bandas no deseadas en la purificación de bandas.

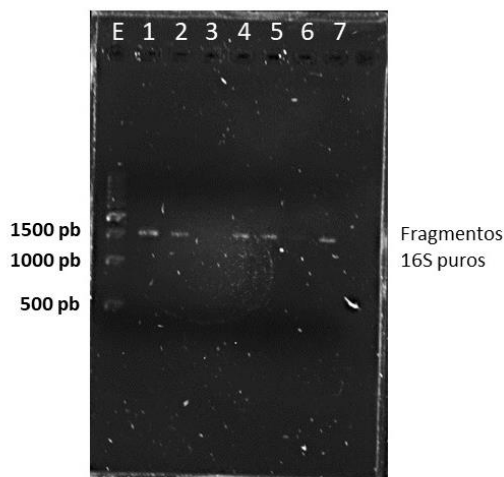


Figura 19. Purificación de productos de PCR del gen ribosomal 16S mediante el corte de la banda del gel y purificación. “E” corresponde a la Escalera de 500 pb, los números del 1 al 7 son los productos de PCR de las muestras de las bacterias y “C” representa el control negativo.

#### 8.5.1. Secuenciación de fragmentos de PCR

La mayoría de las secuencias recibidas de los productos de PCR fueron de buena calidad, sin embargo, aquellas que no tenían buena calidad fueron limpiadas y editadas con el software Chromas. A continuación, se realizó el alineamiento en la base de datos de secuencias nucleotídicas del GeneBank (NCBI) para determinar la identidad de las especies bacterianas (Cuadro 6).

**Cuadro 6:** Identificación de las especies bacterianas utilizadas en las pruebas de utilización del TBT como fuente de carbono mediante alineamiento de secuencias del gen ribosomal 16S, (\*) representa las bacterias que no se pudieron identificar.

<b>Cepas bacterianas</b>	<b>Especie</b>	<b>Identidad GenBank</b>	<b>Identidad Rdp</b>
P1MZ16.9	<i>Campylobacter</i> sp.		.625
P3MZ16.7	<i>Pseudoalteromona peptidolytica</i>	98%	
Ca1MZ17.6	*	*	
P2MZ17.6	<i>Vibrio</i> sp.	96%	
P1MZ17.12	<i>Pseudoalteromona tetraodonis</i>	99%	
Ca1MZ17.2	<i>Pseudoalteromona arabiensis</i>	98%	
P3MZ17.10	*	*	

## 9. Discusión

### 9.1. Abundancia de bacterias heterótrofas cultivables

Nuestros resultados mostraron una mayor abundancia bacteriana con medio Zobell y medio con TBT en la temporada templado-seca respecto a la temporada cálido-lluviosa. Lo anterior es posible relacionarlo a la mayor disponibilidad de nutrientes acarreados por las corrientes frías y eventos de surgencias en la región, los cuales ocurren durante los meses de diciembre a marzo en Cabo Corrientes, Jalisco (Ambriz-Arreola *et al.*, 2012). Por otro lado, es posible que esta diferencia también se deba al incremento en el aporte de sedimentos terrestres al océano (incorporación de biomasa de células bacterianas), debido a la temporada de lluvias (junio a septiembre). De esta manera, es posible que la diferencia observada en la abundancia bacteriana en ambas temporadas de muestreo se deba a un efecto complementario entre la temporada de lluvias y eventos de surgencia en la región. Como no se tienen registros de abundancias bacterianas en los sedimentos de Bahía Manzanillo, no tenemos puntos de comparación para determinar si estos cambios en la abundancia es un evento cíclico o es ocasionado por otros factores ambientales.

### 9.2. Resistencias al TBT

En este trabajo encontramos que el 98 % de las bacterias que resistieron alguna concentración de TBT pertenecen al grupo de las Gram negativas. Este resultado coincide con lo reportado por Wuertz *et al.*, (1991), Cruz *et al.*, (2007) y Mohamat-Yusuff *et al.*, (2014), quienes reportaron que las bacterias Gram negativas resisten mejor al TBT que las bacterias Gram positivas. Esta capacidad de resistencia se debe probablemente a las diferencias estructurales de la pared celular que existe entre ambos grupos (Cruz *et al.*, 2007; Hernould *et al.*, 2008; Cruz *et al.*, 2014), principalmente por la capacidad que tiene las bacterias Gram negativas de inmovilizar los iones metálicos (Wuertz *et al.*, 1991) y por su metabolismo estrictamente oxidativo, usando O<sub>2</sub> o NO<sub>3</sub><sup>-</sup> como aceptores de electrones (Stolp, 1988; Jude *et al.*, 1996).

En cuanto a la forma celular, son pocos los trabajos que abordan este aspecto, Mohamat-Yusuff *et al.*, (2014) reportó que la mayoría de las células bacterianas que resistieron el TBT fueron bacilos 56 %,

mientras un 25 % fueron cocos. A diferencia de lo mencionado anteriormente, en este trabajo se encontró que el mayor porcentaje de cepas bacterianas resistentes al TBT en concentraciones máximas de 3.75 mM pertenecen al grupo de los cocobacilos 78 %, el 12 % fueron cocos y el 10 % bacilos.

En relación a la resistencia de las bacterias al TBT, encontramos que la mayor concentración tolerante de TBT de las cepas bacterianas fue de 3.75 mM, muy similar a lo reportado por Cruz *et al.*, (2007), en donde encontraron 16 cepas resistentes a una concentración de 3 mM de TBT, la mayoría aisladas del sedimento y en menor proporción de agua. Sin embargo, Mohamat-Yusuff *et al.*, (2014) reportó una resistencia bacteriana máxima de 33.6  $\mu$ M de TBT en cepas aisladas de sedimento en pastos marinos. Estas diferencias bien se pueden atribuir a la metodología empleada para las pruebas de resistencia y/o a los lugares en los que fueron aisladas las cepas bacterianas, lugares contaminados o no contaminados con TBT, así como a los aspectos físicoquímicos del ambiente. Wuertz *et al.*, (1991) señala que las bacterias de agua dulce pueden ser menos sensibles al TBT que las bacterias estuarinas, aunque las diferencias pueden ser por otros factores, incluida la presencia de otros contaminantes.

En las pruebas de resistencia al TBT (independientemente de la concentración), observamos bacterias resistentes en los tres sitios de muestreo, esto resulta interesante ya que *a priori* se consideró de forma indirecta a Carrizales como el sitio con menor contaminación de TBT, debido a la lejanía con el Puerto y al poco flujo de embarcaciones en esa zona. Al igual que en otros estudios, se han encontrado bacterias resistentes en sitios contaminados de TBT, pero en menor proporción y con una resistencia más baja, en sitios no contaminados (Olson y Brinckman, 1982; Jonas *et al.*, 1984; Wuertz *et al.*, 1991; Mohamat-Yusuff *et al.*, 2014). En este trabajo, las bacterias que se seleccionaron por su capacidad de resistencia a las cinco concentraciones son en su mayoría aisladas del Puerto (sitio considerado de manera indirecta con mayor contaminación por su alto flujo de embarcaciones), en relación a lo anterior, Wuertz *et al.*, (1991) sugiere que los sitios contaminados con TBT pueden actuar como un medio selectivo para bacterias resistentes a este agente.

### 9.3. Utilización del TBT como fuente de carbono

Las pruebas de la utilización del TBT como fuente de carbono, toma en cuenta el medio I (medio enriquecido) como un control positivo y el medio II (medio mínimo) como un control negativo, mientras en el medio III (medio mínimo más TBT adicionado) es el tratamiento para determinar cuáles bacterias son capaces de utilizar este compuesto (TBT) como fuente de carbono. Cabe mencionar que teniendo únicamente los resultados de las diferencias (ANDEVA permutacional) entre los tres



tratamientos a los que se sembraron las cepas bacterianas, es difícil llegar a la conclusión de determinar cuáles cepas bacterianas tienen potencial para utilizar el compuesto y degradarlo. Por lo que el modelo matemático empleado fue fundamental para llegar a conocer las cepas bacterianas óptimas en el crecimiento con el contaminante.

El modelo de crecimiento logístico indicó que las cepas P1MZ16.9 y P3MZ16.7 utilizan el TBT, brindándoles un aporte superior de energía que en relación al medio rico en nutrientes (medio enriquecido). Por lo tanto, estas cepas lo pueden aprovechar a tal grado que, si el TBT es retirado, la cepa se verá afectada. Además, estas cepas pueden llegar a tener una capacidad de carga mayor que en el medio enriquecido, es decir, este medio permite tener una mayor cantidad de células bacterianas a diferencia de los otros dos medios. Por lo que estas cepas presentan potencial para la utilización del TBT como fuente de carbono.

En cuanto a la cepa P2MZ17.6 fue otra que se observó que tiene la capacidad de utilizar el TBT como fuente de carbono. No obstante, no presenta la misma eficiencia de crecimiento como las cepas mencionadas anteriormente ya que presentó una capacidad de carga menor al medio enriquecido pero mayor al medio mínimo. Es decir, esta cepa tiene la capacidad de utilizar el TBT pero de manera no muy eficiente. La cepa Ca1MZ17.6 a pesar de que puede llegar a utilizar el medio con TBT y tener una capacidad de carga similar al medio enriquecido, no presentó sensibilidad al recurso (TBT).

Las cepas Ca1MZ17.2, P1MZ17.12 Y P3MZ17.10 no son capaces de utilizar el compuesto TBT como fuente de carbono, porque se observaron que tienen capacidades de carga (medio con TBT) similares al medio mínimo. Además, las cepas P3MZ17.10 y Ca1MZ17.2 son altamente sensibles al recurso, por lo que no presentan un beneficio en presencia del TBT.

En general, se observó que todas las cepas bacterianas en medio con TBT tienden a tener una aceleración en su crecimiento inicial, llegando a un punto donde se estabilizan (fase estacionaria) más rápido a diferencia de los otros tratamientos (medio enriquecido y medio mínimo). Fakawaga *et al.*, (1992) sugieren que este comportamiento se debe a un sistema de flujo o bombas de expulsión activas, que son mecanismos para la eliminación de contaminantes o antibióticos. Jude *et al.*, (2004) sugieren que este sistema de expulsión del TBT es utilizado por algunas bacterias resistentes al TBT, en donde confirman que el operón tipo RND *tbtABM* (TBT por tributilestaño), es utilizado por *Pseudomona stutzeri*.

Una característica que presentaron las cuatro cepas bacterianas con capacidad de crecimiento en medio con TBT, es que llegaron a un punto donde empiezan a decrecer (P1MZ16.9, es la única cepa que se mantiene por más tiempo). En relación a esto, Mimura *et al.*, (2008) señala que el número total de moléculas de estaño absorbido por una sola célula incrementa de manera lineal con el incremento de la concentración de TBT-Cl hasta llegar a 3 mM, siendo  $1 \times 10^{7.6}$  la capacidad máxima de absorción de una sola célula. Cuando la célula llega a su capacidad máxima de absorción y la concentración del contaminante sigue en aumento ( $> 3$  mM) la célula tratará de alcanzar una nueva condición de equilibrio a través del proceso de lavado, que contribuye a la reducción de electrolitos en la suspensión celular. Si se incrementa la concentración hasta 10 mM, la superficie celular se vuelve rugosa y áspera en consecuencia a la exposición de una concentración letal de TBT, interrumpiendo así la regulación osmótica de la célula. Llegando a la conclusión de que la superficie de la célula juega un papel primordial en la resistencia al compuesto, mediante proteínas de unión a la membrana que permiten el bombeado del TBT al citoplasma (Jude *et al.*, 2004). Lo antes mencionado podría ser una explicación del comportamiento de las cuatro cepas bacterianas en donde observamos que tienen la capacidad de crecer en medio con TBT, de esta manera, es probable que la disminución en su crecimiento es debido a que las células podrían haber llegado a su capacidad máxima de absorción de TBT y de igual manera podría suceder lo mismo en aquellas que son resistentes, pero no pueden degradar el compuesto.

La capacidad de degradación del TBT a metabolitos menos tóxicos está principalmente relacionada a la presencia de plásmidos. De hecho, se ha reportado una gran incidencia de bacterias resistentes y degradadoras que contienen plásmidos. Por ejemplo, *Aeromonas veronii* es una cepa bacteriana que cuenta con un plásmido que le brinda la capacidad de reducir el compuesto de TBT a metabolitos menos tóxicos, encontrando DTB y MTB en el sobrenadante del medio de cultivo (Cruz *et al.*, 2007). *Pseudomonas aeruginosa* alberga el plásmido pCRO1, el cual se le fue retirado y se observó que perdió la capacidad de resistencia al TBT (Cooney *et al.*, 1995). *Pseudomonas fluorescens* BP4 tiene cuatro plásmidos, y en experimentos de conjugación se encontró que esta cepa transfirió sus plásmidos a otra cepa de *P. fluorescens* y por lo tanto su capacidad de resistencia a TBT (Miller *et al.*, 1995).

A pesar de lo anterior, existen bacterias resistentes que no contienen plásmidos (Wuetz *et al.*, 1991; Jude *et al.*, 1996; Cruz *et al.*, 2007). Dubey y Roy, (2003) mencionaron que la capacidad de las cepas bacterianas resistentes y degradadoras al TBT no está correlacionada con la presencia de plásmidos, más bien depende de genes que se encuentran en el genoma cromosómico. En su trabajo revelan que *Alteromonas* sp. M1, una cepa resistente al TBT, posee un genoma de 2,240 kb y no cuenta con un plásmido, por lo que los genes que le confieren dicha capacidad se encuentran en el genoma

cromosómico. Fukagawa *et al.*, (1992) reportan la resistencia al TBT de la especie de *Vibrio* sp., el cual tampoco cuenta con un plásmido, de esta forma su capacidad de resistir el compuesto se encuentra en el genoma cromosómico. Además, reportan un incremento en la expresión genética de dos polipéptidos (30 kDa y 12 kDa) cuando la bacteria está en medio con TBT.

Por otro lado, Mimura *et al.*, (2008) observaron que cultivos en medio líquido con TBT-Cl de la bacteria *Pseudoalteromonas* sp., la mayoría de las moléculas del TBT fueron absorbidas por las células bacterianas ya que, no se encontró metabolitos menos tóxicos del TBT (DBT y MTB) en el sobrenadante del medio de cultivo. Además, mencionan que la capacidad de resistencia hacia el TBT no está relacionada a la degradación del compuesto a metabolitos menos tóxicos. En nuestro caso la cepa bacteriana P3MZ16.7 identificada como *Pseudoalteromonas peptidolytica*, (que fue una de las que mostraron mejor crecimiento en las pruebas de degradación del TBT), será necesario realizar investigaciones a futuro para determinar su capacidad en debutilizar en sus componentes DBT y MTB el compuesto de TBT.

Finalmente, la cepa P1MZ16.9 identificada como *Campylobacter* sp. otra cepa bacteriana capaz de utilizar el TBT como fuente de carbono, no había sido reportada anteriormente como resistente o degradadora al TBT. Especies de este género se han identificado como patógenas relacionadas a aguas residuales (Alonso *et al.*, 1993; Foster *et al.*, 2004). En relación a esto, existen reportes de bacterias patógenas relacionadas a las aguas residuales, en donde se ha documentado que tienen capacidad de resistencia y degradación al TBT. De hecho, la bacteria patógena *Alcaligenes faecalis* se sabe que tiene la capacidad de degradar el TBT-O mediante el proceso de desalquilación (Dubey y Roy, 2003). Por lo tanto, no es de extrañar que en este trabajo haya encontrado una bacteria patógena que tiene la capacidad de resistir y degradar el TBT.

## 10. Conclusiones

- Las mayores abundancias totales (medio sin TBT) y resistentes al TBT (medio con TBT) se presentaron en la temporada fría (enero 2017)
- 50 cepas bacterianas aisladas de ambas temporadas mostraron una resistencia al TBT, en su mayoría aisladas del Puerto y Gram-negativas.
- Se encontró que la concentración máxima tolerante para algunas de las cepas con resistencia al TBT fue de 3.75 mM.
- *Campylobacter* sp. *Pseudoalteromonas peptidolytica* y *Vibrio* sp. y la cepa Ca1MZ17. 6 (no identificada) son las cepas bacterianas que demostraron capacidad para utilizar el TBT como fuente de carbono.
- Con base en los resultados del modelo matemático las especies *Campylobacter* sp. y *Pseudoalteromonas peptidolytica* son potenciales candidatas para su uso en la biorremediación ambiental de TBT.

Cabe mencionar que este trabajo representa uno de los primeros acercamientos respecto al conocimiento de bacterias resistentes y degradadoras del TBT en México, ya que no se había realizado ninguno con anterioridad, sin embargo, es necesario seguir con los estudios para las bacterias que demostraron capacidad para utilizar el TBT como fuente de carbono, y así confirmar su potencial para su uso en biorremediación ambiental para las zonas contaminadas

## 11. Referencias

- Alisina, M. Blanch, A.R. 1994a. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *Journal Applied Bacteriology*. Vol. 76: 79-85 pp.
- Alisina, M. Blanch, A.R. 1994b. Improvement and update of a set of keys for biochemical identification of *Vibrio* species. *Journal Applied Bacteriology*. Vol. 77: 719-721 pp.
- Ambriz-Arreola, I., Gómez-Gutiérrez, J., Franco-Gordo, M. C., Lavaniegos, B. E., Godínez-Domínguez, E. 2012. Influence of coastal upwelling-downwelling variability on tropical euphausiid abundance and community structure in the inshore Mexican central Pacific. *Marine Ecology Progress Series*. Vol. 451: 119-136 pp.
- Anderson, M.J., Gorley, R.N. Clarke K. R. 2008. PERMANOVA + for PRIMER: Guide to Software and Statistical Methods. PRIMER-E: Plymouth, UK.
- Apitz, S.E., Davis, J.W. Finkelstein, K. 2005. Assessing and managing contaminated sediments: Part I. Developing an effective investigation and risk evaluation strategy. *Integrated Environmental Assessment and Management*. Vol. 1: 2-8 pp.
- Arnaud, G. 1918. Les Astérinéés. *Annales de l'École Nationale d'Agriculture de Montpellier*. Vol. 16: 1-4pp.
- Barreiro, M.R., Quintela, J. Ruiz M. 2004. TBT e imposex en Galicia: los efectos de un disruptor endocrino en poblaciones de gasterópodos marinos. *Revista científica y técnica de ecología y medio ambiente*. Vol. 13 (3): 13-29 pp.
- Barug, D. 1981. Microbial degradation of bis(tributyltin) oxide. *Chemosphere*. Vol. 10: 1145–1154pp.
- Becerril, A. E. 2011. Actinobacterias aisladas del sedimento marino del Golfo de California y Bahía de Todos los Santos: diversidad, bioactividad y dominios cetosintetasa. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Baja California. p. 199.
- Bigatti, G., Averbuj, A., Braga Castro, Í., Primost, M., Carranza, Á., Commendatore, M., Fillmann, G., Delgado, E., Scarabino, F., Franco, M., Letamendía, M., Martínez, G., Sauco, S., Penchaszadeh, P.E. 2013. Situación de contaminación en las costas del sur de Brasil, Uruguay y Argentina, luego de la prohibición mundial del TBT. Cap. 13. 277-302pp.
- Bigatti, G., Penchaszadeh, P. E. 2005. Imposex in *Odontocymbiola magellanica* (caenogastropoda: volutidae) in patagonia. *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay*. Vol. 9 (88): 371 – 375pp.
- Bigatti, G., Primost, M. A., Cledón, M., Averbuj, A., Theobald, N., Gerwinski, W., Arntz, W., Morriconi, E., Penchaszadeh, P. E. 2009. Biomonitoring of TBT contamination and imposex

- incidence along 4700 km of Argentinean shoreline (SW Atlantic: From 38S to 54S). *Marine Pollution Bulletin*. Vol. 58(5): 695-701pp.
- Burri, R., and A. Stutzer. 1895. Ueber Nitrat zerstörende Bakterien und den durch dieselben bedingten Stickstoffverlust. *Zentbl. Bakteriol. Parasitenkd. Abt. II* 1:257-265, 350-364, 392-398, 422-432.
- Castro, Í. B., Perina, F. C., Fillmann, G. 2012. Organotin contamination in South American coastal areas. *Environmental Monitoring and Assessment*. Vol. 184(3):1781-1799pp.
- Chacón, M.O., Fabrizio, C.C., De La Fuente O.C., Díaz, F. A., Laura G. Huaquín M. 2007. Disrupción endocrina e imposex. *Avances en Ciencias Veterinarias*. Vol. 22: 42-48pp.
- Chiavarini, S., Massanisso, P., Nicolai, P., Nobili, C., Morabito, R. 2003. Butyltins concentration levels and imposex occurrence in snails from the Sicilian coasts (Italy). *Chemosphere*. Vol. 50(3): 311-319pp.
- Crespo, F.I., González, F.J. 2003. Pinturas antiincrustantes. *Ambiente*. 23ª Edición. 73-76 pp.
- Croasdale, H.T. 1973. Freshwater algae of Ellesmere Island, N.W.T. (exclusive of diatoms and flagellates). *National Museum of Canada Publications in Botany*. Vol. 3: 1-131pp.
- Cruz, A., Caetano, T., Suzuki, S., Mendo, S. 2007. *Aeromonas veronii*, a tributyltin (TBT) degrading bacterium isolated from an estuarine environment, Ria de Aveiro in Portugal. *Marine Environmental Research*. Vol. 64 (5): p. 639.
- Díez, S., Bayona, J., M. 2009. Butyltin occurrence and risk assessment in the sediments of the Iberian Peninsula. *Journal of Environmental Management*. Vol. 90(1): 525-530pp.
- Dubey, S.K., Tokashiki T. Suzuki S. 2006. Microarray-Mediated Transcriptome Analysis of the Tributyltin (TBT)-Resistant Bacterium *Pseudomonas aeruginosa*25W in the Presence of TBT. *The Journal of Microbiology*. Vol. (2): 200-205pp.
- Escherich, T. 1885. Die darmbakterien des neugeborenen und sauglings. *Fortshr. Med*. Vol. 3: 5-15-522pp.
- Fakagawa, T., Suzuki, S., Fukunaga, K., Suzuki, T., Takama, K. 1992, Isolation and characterization of tributyltin chloride-resistant marine *Vibrio*. *Microbiology letters*. Vol. 93: 83-86 pp.
- Fent, K. 2003. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicology Letters*. 353-365pp.
- Flügge, 1886. The National Checklist of Taiwan. Taiwan Biodiversity Information Facility (TaiBIF)
- Gibbs, P.E., Bryan, G.W., Pascoe, P.L. Burt, G.R. 1987. The use of the dog-whelk, *Nucella lapillus*, as an indicator of tributyltin (TBT) contamination. *Journal Marine Biological Association UK*. Vol. 67: 507-523pp.

- Gmelin, J.F. 1791. Vermes. In: Gmelin J.F. Caroli a Linnaei Systema Naturae per Regna Tria Naturae, Ed. 10. Vol.(1) 6: 3021-3910pp.
- Goldberg, R. N., Averbuj, A., Cledon, M., Luzzatto, D., Nudelman, N. S. 2004. Search for triorganotins along the Mar del Plata (Argentina) marine coast: finding of tributyltin in egg capsules of a snail *Adelomelon brasiliana* (Lamarck, 1822) population showing imposex effects. *Applied Organometallic Chemistry*. Vol. 18(3): 117-123pp.
- Gómez, M.L., Hurtado C., Jenny, D., Parra J.P. Narváez S. 2006. Determinación de la capacidad de degradación de compuestos orgánicos persistentes por bacterias marinas aisladas de sedimento en el Caribe colombiano. *Revista Actualidades Biológicas*. Vol. 28 (85): 125-137pp.
- González-Villa, M. 2010. Manzanillo: ciudad puerto fragmentada, Senado de la Republica LXI Legislatura, México.
- Green, J.C. 1975. The fine-structure and taxonomy of the haptophycean flagellate *Pavlova lutheri* (Droop) comb. nov. (*Monochrysis lutheri* Droop). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* Vol. 55: 785-793pp.
- Harino, H., Yamamoto, Y., Eguchi, S., Kawai, S., Kurokawa, Y., Arai, T., Ohji, M., Okamura, H., Miyazaki, N. 2007. Concentrations of antifouling biocides in sediment and mussel samples collected from Otsuchi Bay, Japan. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. Vol. 52(2): 179-188pp.
- Haynes, D., Loong, D. 2002. Antifoulant (butyltin and copper) concentrations in sediments from the Great Barrier Reef World Heritage Area, Australia. *Environmental Pollution*. Vol. 120(2): 391-396pp.
- Hernould, M., Gagné, S., Fournier, M., Quentin, C., Arpin, C., 2008. Role of the AheABC efflux pump in *Aeromonas hydrophila* intrinsic multidrug resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol 52: 1559-1563pp.
- Hoch, M. 2001. Review: Organotin compounds in the environmental overview. *Applied Geochemistry*. Vol. 16: 719–743pp.
- Holmstrom, C., Kjelleberg, S. 1999. Marine Pseudoalteromonas species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *Microbiology Ecology*. Vol. 30: 285-293 pp.
- Holt, J.G., Krieg N.R., Sneath, P.H.A., Stanley J.T., Williams S.T. 2004. Bergey's Manual Determinative Bacteriology. 9na Edicion. Lippincott Williams and Wilkins Impressions.
- Jonas, R., B., Gilmour, C., C., Stoner, D., L., Weir, M., M., Tuttle, J., H. 1984. Comparison of methods to measure acute metal and organometal toxicity to natural aquatic microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 47: 1005-1011pp.

- Kotrikla, A. 2009. Environmental management aspects for TBT antifouling wastes from the shipyards. *Journal of Environmental Management*. Vol. 90: 77–85pp.
- Kunze, G. y Schmidt, J. K. 1817. Chaetomium Mykologische Hefte nebst einem allgèmein-botanischen Anzeiger 1, Leipzig.
- Landameyer, J. E., Tanner T. L., Watt, B. E. 2004. Biotransformation of tributyltin to tin in freshwater river sediments contaminated by an organotin release, *Environmental Science and Technology*. Vol. 38 (15): 4106-4112pp.
- Larsen, H., E. y Seeliger, H., P., R. 1966. A manitol fermenting listeria: *Listeria grayi* sp. Proceedings of the third international symposium on Listeriosis.
- Lehmann y Neumann, 1896 stdterms.in GBIF Secretariat (2017). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei>
- Lendner A. 1907. "Sur quelques Mucorinées". *Bulletin de l'Herbier Boissier* (in French). Vol. 7 (3): 49–51pp.
- Linnaeus, C. 1758. Systema Naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. *Editio decima, reformata. Laurentius Salvius: Holmiae*. 824 pp.
- Linnaeus, C. 1767. *Systema naturae per regna tria naturae: secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Ed. 12. 1., *Regnum Animale. 1 & 2*. Holmiae, Laurentii Salvii. *Holmiae [Stockholm], Laurentii Salvii*. 532pp.
- Lloyd, C., G. 1921. *Mycological Notes (Cincinnati)* Vol. 65: 1045pp.
- Ludgate, J.W. 1987. The economic and technical impact of TBT legislation on the USA marine industry. Proceedings of the Oceans - An International Workplace Conference. Vol. 4: 1309-1313pp.
- Maguire, R. J. 2000. Review of the persistence, bioaccumulation and toxicity of tributyltin in aquatic environments in relation to Canada's toxic substances management policy. *Water Quality Research Journal of Canada*. Vol. 35 (4): 633–679pp.
- Márquez, F., Hernández, V., Lamela, T. 2001. Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium. *Water Air Soil Pollut*. Vol. 128: 313–320pp.
- Martins, J., D., Jurado, A., S., Moreno, A.,J.,M., Madeira, V.,M.,C. 2005. Comparative study of tributyltin toxicity on two bacteria of the genus *Bacillus*. *Toxicology in Vitro*. Vol 19: 943–949pp.
- Miller, C., E., Wuertz, S., Cooney, J., J., Pfiste, R., M. 1995. Plasmids in tributyltin-resistant bacteria from fresh and estuarine waters. *Journal of Industrial Microbiology*. Vol 14: 337-342pp.



- Mimura, H., Sato, R., Furuyama, Y., Taniike, A., Yagi, M., Yoshida, K., Kitamura, A. 2008. Adsorption of tributyltin by tributyltin resistant marine *Pseudoalteromonas* sp. Cells. *Marine Pollution Bulletin*. Vol 57: 877–882pp.
- Miñana-Galbis D., F., M., Fuste M., C., Loren J., G. 2004. *Aeromonas molluscorum* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. *Int J Syst Evol Microbiol*. Vol. 54: 2073-2078pp.
- Mincer, C., Jensen, P.R., Kauffman, C.A., Fenical, W. 2002. Widespread and persistent populations of a major new marine *Actinomycet* taxon in ocean sediments. *Applied Environmental Microbiology*. Vol. 68:5005–5011pp.
- Mohamat-Yusuff, F., Wui-Sien K., Lutfi-Wan W.J., ISMAIL, A., Zahmir-Zulkir Z., Mustafa, M. 2014. Potential tributyl-tin (TBT) biodegradation agent in contaminated sediment. *Malayan Nature Journal*. Vol. 66: 81-93pp.
- Muroga, K., Higashi, M. Keitoku H. 1987. The isolation of intestinal microflora of farmed red seabream (*Pagrus major*) and black seabream (*Acanthopagrus schlegeli*) at larval and juvenile stages. *Aquaculture*. Vol. 65: 79-88pp.
- Narváez-Flóres, Z., Gómez, M, Martínez, M.M. 2008. Selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos aisladas a partir de sedimentos del caribe colombiano. *Boletín de investigaciones marinas y costeras*. Vol. 37 (1): 61-75pp.
- Narváez-Flóres, S., Gómez, L.M., Martínez, M.M. 2008. Selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos aisladas a partir de sedimentos del Caribe Colombiano. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*. Vol. 37 (1): 61-75pp.
- Oliver, J.D. 1982. Taxonomic scheme for the identification of marine bacteria. *Deep-sea Research*. Vol. 29: 795-798pp.
- Olson, B. H., and I. Thornton. 1982. The resistance patterns to metals of bacterial populations in contaminated land. *Journal of Soil Science*. Vol 33:271-277pp.
- Omae, I. 2003. Review: Organotin antifouling paints and their alternatives. *Applied Organometallic Chemistry*. Vol. 17: 81–105pp.
- Orsler, R. J., Holland, G. E. 1982. Degradation of tributyltin oxide by fungal culture filtrates. *International Biodeterioration Bulletin*. Vol. 18(4): 95–98pp.
- Programa maestro de desarrollo portuario del puerto de Manzanillo 2015-2020. Administración Portuaria Integral de Manzanillo S.A. de C.V. p. 69
- Rajendran, P., Muthukrishnan, J., Gunasekaran, P. 2003. Microbes in heavy metal remediation. *Indian Journal of Experimental Biology*, 41: 935-944 pp.

- Rato, M., Gaspar, M. B., Takahashi, S., Yano, S., Tanabe, S., Barroso, C. 2008. Inshore/offshore gradients of imposex and organotin contamination in *Nassarius reticulatus* (L.) along the Portuguese coast. *Marine Pollution Bulletin*. Vol. 56(7): 1323-1331pp.
- Rilovl, G., Gasith, A., Stewart, M.E., Yehuda, B. 2000. Unregulated use of TBT-based antifouling paints in Israel (eastern Mediterranean): high contamination and imposex levels in two species of marine gastropods. *Marine ecologyprogress series*. Vol. 192: 229-238pp.
- Rodríguez-Romero, F. 2010. Imposex en la laguna de Terminos, Campeche, Mexico. *Revista Científica UDO Agrícola*. Vol. 10 (1): 141-149pp.
- Rosenbach. 1884. stdtermsin GBIF Secretariat (2017). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei>
- Ruiz, J. M., Bachelet, G., Caumette, P., Donard, O. F. X. 1996. Three decades of tributyltin in the coastal environment with emphasis on Arcachon Bay, France. *Environmental Pollution*. Vol 93(2): 195–203pp.
- Ruiz, M., Quintela, M. and Barreiro R. 1998. Ubiquitous imposex and organotin bioaccumulation in gastropods *Nucella lapillus* from Galicia (NW Spain): a possible effect of nearshore shipping. *Marine ecology progress series*. Vol. 164: 237-244pp.
- Sampath, R., Venkatakrishnan, H., Ravichandran, V., Chaudhury R. R. 2012. Biochemistry of TBT Degrading Marine Pseudomonads Isolated from Indian Coastal Waters *Water Air Soil Pollution*. Vol. 223: 99–106pp.
- Say, T. 1822. An account of some of the marine shells of the United States. *Journal of the Academy of Natural Sciences, Philadelphia*. Vol (2) 2: 221-248pp.
- Smith, B.S. 1971. Sexuality in the American mud snail, *Nassariusobsoletus*. *Society Proceedings of the Malacological Society of London*. Vol. 39: 377-378pp.
- Stolp, H. 1988. *Microbial ecology, organisms - habitats - activities*. Cambridge University Press, Cambridge. p. 79.
- Valkirs, A. O., Seligman, P. F., Lee, R. F. 1986. Butyltin partitioning in marine waters and sediment. *Oceans 86 Proceedings*, 4. Piscataway, NJ: IEEE Service Center, 1986:1165]1170.
- Wuertz, S., Miller, C.E., Pfister, R.M., Cooney, J.J. 1991. Tributyltin-resistant bacteria from estuarine and freshwater sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 57: 2783-2789pp.

## Anexo I: Protocolos

### *Preparación de medios de cultivo*

#### **Medio sólido Zobell**

Formulación para 1 litro:

Bactopeptona	5 g
Extracto de levadura	1 g
Cloruro Férrico al 1%	1 mL
Bacto agar	13 g
Agua de mar	1 L

1. Calentar hasta que el agar se disuelva completamente.
2. Esterilizar durante 15 minutos a 121°C en autoclave.
3. Cuando este tibio servir en cajas Petri.

#### **Medio sólido Zobell con TBT**

Formulación para 1 litro:

Bactopeptona	5 g
Agar bacteriológico	13 g
Extracto de levadura	1 g
Cloruro Férrico al 1%	1 mL
Agua de mar estéril	1 L
TBT Añadido:	mL/ L
420 µM	0.116
840 µM	0.233
1.26 mM	0.333
2.5 mM	0.694
3.75 mM	1.04
5 mM	1.30
7.5 mM	2.08

1. Calentar hasta que el agar se disuelva completamente
2. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, no dejar que solidifique (mantener en agitación a 60° C).
3. En un frasco previamente esterilizado añadir la cantidad de TBT deseada.  
Aforar con el medio a un litro.
4. Dejar enfriar y servir en cajas Petri estando tibio el medio.
5. Envolver cajas Petri en papel aluminio para evitar la exposición a la luz.

### **Medio líquido Zobell (medio enriquecido)**

Formulación para 500 ml:

Bactopeptona	2.5 g
Extracto de levadura	0.5 g
Cloruro Férrico al 1%	0.5 mL
Agua de mar	500 mL

1. Agitar el medio hasta disolver.
2. Esterilizar el medio durante 15 minutos a 121 °C en autoclave.
3. Esperar a que se enfríe para utilizarlo.

### **Medio líquido mínimo**

Formulación para 500 ml:

Bactopeptona	0.5 g
Extracto de levadura	0.1 g
Cloruro Férrico al 1%	0.05 mL
Agua de mar	500 mL

1. Agitar el medio hasta disolver.
2. Esterilizar el medio durante 15 minutos a 121 °C en autoclave.
3. Esperar a que se enfríe para utilizarlo.

## **Anexo 2: Protocolos Biología molecular**

### **Extracción de ADN**

Se realizó la extracción de DNA mediante el “kit Dneasy blood and tissue” QIAGEN

1. Añadir 200 µl de PBS al concentrado bacteriano (pellet) y homogenizar la muestra
2. Agregar 20 µl de proteinasa K y dar vortex
3. Agregar 200 µl de buffer, vortex e incubar por 20 min a 56 °C.
4. Preparar la columna de unión en un tubo de 2 ml y añadir 500 µl de la solución de preparación de columna. Centrifugar a una velocidad máxima de 12000 x g durante 1 minuto. Desechar el líquido.
5. Añadir la mezcla bacteriana a la columna de unión y centrifugar a 10000 x g durante 1. Desechar el líquido.
6. Agregar 500 µl de buffer, centrifugar a 10000 x g durante 1. Desechar el líquido.
7. Agregar 500 µl de buffer 2, centrifugar a 10000 x g durante 1. Desechar el líquido. Volver a centrifugar por 3 min a 14000 x g.
8. Transferir la columna a un tubo nuevo de 2 ml y añadir 200 µl de Solución de Elución dejando reposar durante 3 min. Posteriormente centrifugar a 8000 x g durante 1 min.
9. Almacenar el DNA genómico a -20°C.

### **Preparación de la muestra para PCR**

1. Agregar 20µl de agua desionizada en microtubos de PCR.
2. Tomar una muestra de la colonia bacteriana y añadir al microtubo, y revolver.
3. Meter los tubos a 95°C durante 10 minutos.
4. Centrifugar durante 1 a 1:30 minutos.
5. Tomar 1 de la muestra para realizar el PCR.

## Condiciones de PCR del gen ribosomal 16S

Para una reacción de 25µl:

---

Dream Taq Green PCR Master Mix (2X)	12.5µl
Forward primer	1 µl
Reverse primer	1 µl
Muestra bacteriana	2 µl
Agua desionizada	8.5 µl

---

## Preparación de geles de agarosa al 1%

1. Disolver 0.3g de agarosa en 30 ml de buffer TAE 1X.
2. Calentar hasta disolver.
3. Esperar a que se enfrié un poco y vaciar en la cámara de electroforesis.
4. Esperar de 20 a 30 minutos para que solidifique bien.

## Electroforesis de geles de agarosa al 1%

1. Colocar el gel dentro de la cámara de electroforesis con buffer TAE 1X.
2. Con una micropipeta de 10µl cargar de 7 a 10µl de productos de PCR.
3. Correr el gel a un voltaje de 100 volts durante 45 minutos.
5. Al terminar, retirar el gel de la cámara y teñir el gel con Safe DNA gel stain, (Invitrogen) durante 30 minutos.
6. Observar en el fotodocumentador de geles con luz UV.

## Purificación de fragmentos de PCR

La purificación de los fragmentos de PCR se realizó mediante el uso del kit “GenElute™ Gel Extration kit” (NA1111) de Sigma-Aldrich.

1. Cortar la banda del gel deseada y colocarlo en un tubo de 1.5 ml.
2. Por cada 100mg de gel de agarosa, añadir 300µl de Solución de Solubilización.
3. Calentar el tubo de 50°C – 60°C por 10 min para disolver el gel.
4. Preparar la columna de unión en un tubo de 2 ml y añadir 500 µl de la solución

1. de preparación de columna. Centrifugar a una velocidad máxima de
2. 12000 x g durante 1 minuto. Desechar el líquido.
5. Una vez disuelto el gel, añadir 1 volumen del gel de isopropanol al 100% y
3. homogenizar.
6. Añadir la mezcla del gel a la columna de unión en porciones de 700 µl,
4. centrifugar a una velocidad máxima de 12000 x g por 1 min y desechar el
5. líquido.
6. Añadir 700 µl de Solución de lavado a la columna y centrifugar a una velocidad
7. máxima de 12000 x g por 1 min. Desechar el líquido y volver a centrifugar
8. para eliminar el exceso del etanol de la Solución de lavado.
9. Transferir la columna a un tubo nuevo de 2 ml y añadir 50 µl de Solución de
10. Elución dejando reposar durante un minuto.
10. Centrifugar a una velocidad máxima de 12000 x g por 1 min.
- 11.** Almacenar el DNA purificado a -20°C.





