

Obtención de bacterias del río Chacamax, Chiapas con potencial para degradar naproxeno sódico, ibuprofeno y cafeína

Osorio Zendejas, Andrea Abigail

2023

<https://hdl.handle.net/20.500.11777/5910>

<http://repositorio.iberopuebla.mx/licencia.pdf>

Obtención de bacterias del río Chacamax, Chiapas con potencial para degradar naproxeno sódico, ibuprofeno y cafeína

Osorio Zendejas Andrea Abigail (tercer semestre en Ingeniería en Biotecnología)^{1,*}, Huerta Flores Valeria Camila (tercer semestre en Ingeniería en Biotecnología)¹, Lara Ortega María José (tercer semestre en Ingeniería Biomédica)¹, Ramírez Rodríguez Rocío (profesor responsable)¹, Pacheco Cabañas Rita Karen (profesor asesor)¹, López Cruz Lesther Emmanuel (profesor asesor)¹.

¹Laboratorio de Ecología y Biotecnología Aplicada (LEBA), Universidad Iberoamericana Puebla, San Andrés Cholula, Puebla, México.

Resumen

Los contaminantes emergentes (CE) plantean una amenaza al ecosistema ya que las plantas de tratamiento de aguas residuales no están diseñadas para eliminarlos eficazmente, aunado a esto hay una falta de legislación y normativas para regular su uso. El naproxeno sódico, ibuprofeno y cafeína son catalogados como contaminantes emergentes. Ante esta problemática, el uso de microorganismos en los procesos de biorremediación es una posible solución. El objetivo fue obtener aislados bacterianos del río Chacamax. Se obtuvieron un total de 48 aislados, de los cuales en las pruebas de tolerancia se seleccionaron 3, las cuales tuvieron mayor crecimiento en los tres contaminantes, denominadas como RC11, RC12 y RC36. Posteriormente estas fueron inoculadas en medio mínimo mineral (MM9) con una concentración de 1 mM de naproxeno sódico, ibuprofeno y cafeína como única fuente de carbono, donde se obtuvo crecimiento en los tres aislados indicando que pueden consumir estos CE como única fuente de carbono. Los resultados pueden contribuir a posteriores investigaciones y proyectos que puedan beneficiar el estudio y análisis de los tratamientos de aguas residuales.

Palabras clave: Contaminantes emergentes, ibuprofeno, naproxeno sódico, cafeína, bacterias.

***Autor Corresponsal:** andreaabigail.osorio@iberopuebla.mx

Introducción

En las últimas décadas, se ha detectado la presencia en cuerpos acuáticos de una variedad de compuestos producidos por la actividad humana, denominados como contaminantes emergentes (CE), los cuales se han clasificado en diferentes grupos: compuestos farmacéuticos, hormonas, productos de cuidado personal, retardantes de llama, drogas, surfactantes, PCP y plastificantes [1]. El ingreso de estos compuestos en los ecosistemas acuáticos sucede a través de diversas vías, que incluyen a las aguas residuales de origen doméstico, industrial, agrícolas, así como de los hospitales y laboratorios [2]. Asimismo, no existen normativas internacionales ni nacionales que indiquen los límites permisibles de CE en cuerpos de agua. Además, los sistemas de tratamiento de aguas residuales convencionales no están diseñados para eliminar a los CE con eficiencia debido a las propiedades fisicoquímicas que poseen, lo que resulta en la descarga dentro de los cuerpos de agua [3]. Como consecuencia los CE pueden bioacumularse en las células y tejidos de la flora y fauna, produciendo daño a los organismos acuáticos, afectando su comportamiento, el crecimiento y su reproducción [4]. La bioacumulación de estos contaminantes puede escalar a lo largo de la cadena trófica, representando un riesgo para la salud humana [5]. Uno de los grupos de CE con mayor interés son los fármacos, principalmente, los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). Como el naproxeno (Ácido (S)-2-(6-metoxi-2-naftil) propanoico, C₁₄H₁₄O₃) y el ibuprofeno (ácido (RS)-2-(4-isobutilfenil) propanoico, C₁₃H₁₈O₂), que son utilizados de forma constante anualmente debido a sus propiedades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias, además de su libre venta [6]. Estos compuestos, se combinan en ocasiones con la cafeína (C₈H₁₀N₄O₂) como parte de tratamientos terapéuticos

tradicionales contra artritis, problemas músculo esqueléticos y en apoyo durante enfermedades infecciosas [7], la cafeína también es parte de diferentes bebidas energéticas y es usado como suplemento alimenticio. Una de las formas de desechos de estos contaminantes es mediante la excreción del cuerpo humano, donde salen en forma de metabolitos secundarios. Las investigaciones sobre metabolismos secundarios provenientes de compuestos farmacéuticos no solo inciden en los procesos de aguas residuales, sino que también sus repercusiones en el medio ambiente carecen aún de resultados concluyentes. Por ende, no se tiene certeza del riesgo que impone su existencia en los ambientes acuáticos [8]. En consecuencia, se han buscado alternativas funcionales, una de ellas han sido las bacterias en los procesos de depuración de las aguas residuales. Que, a diferencia de los procesos químicos, las bacterias comúnmente no producen compuestos dañinos como producto de las reacciones metabólicas. Estudios recientes han descubierto que ciertas bacterias producen enzimas específicas que descomponen sustancias químicas complejas en componentes más simples para utilizarlos como fuentes de carbono y energía para sus funciones vitales. Además, tienen la capacidad de descomponer múltiples tipos de contaminantes, incluso si estos contaminantes no están presentes en su entorno natural; tal es el caso de *Bacillus thuringiensis* B1(b2015) la cual fue aislada del suelo de una fábrica en Polonia, donde incluso sin estar en contacto con los AINES la bacteria poseían la capacidad de degradar naproxeno e ibuprofeno [9]. Cabe recalcar que algunas bacterias poseen la capacidad de consumir como única fuente de carbono el contaminante emergente, ejemplificado por la cepa *Planococcus* sp. S5. Que utiliza como monosustrato (única fuente de carbono) el naproxeno [10]. Esto favorece

debido a que algunas bacterias requieren cometabolitos a menudo dependen de la presencia de esos nutrientes adicionales (como fenol o glucosa) para cometabolizar y que posiblemente no se encuentren en el medio ambiente, representando la reducción de su eficiencia. Como resultado a esto existe una mayor posibilidad de poder obtener bacterias con capacidad degradante en ambientes contaminados, ya que suelen ser ecosistemas dominados por aquellos organismos capaces de utilizar o de sobrevivir a compuestos tóxicos [11]. En México los ecosistemas acuáticos son contaminados constantemente debido al vertimiento de aguas residuales sin tratamiento alguno [12], tal es el caso del río Chacamax. Este sistema forma parte de la cuenca hidrológica del río Usumacinta, posee una longitud de 15.g kilómetros y abarca los municipios de Palenque, Catazajá, Salto de agua y La Libertad en el estado de Chiapas [13]. Este río es importante para estos municipios, ya que es una fuente de agua para sus actividades diarias. Sin embargo, existen descargas de aguas residuales principalmente domésticas debido a la ineficiencia de las redes de alcantarillados, así como de las industrias cercanas [14]. Esta situación provoca una deficiencia en la calidad del agua, así como la pérdida de biodiversidad y la alteración de las cadenas tróficas. En la actualidad no existen registros de estudios que evalúen en específico la diversidad microbiana presente o presencia de contaminantes emergentes en el río Chacamax.

Por lo cual el presente proyecto tiene como objetivo obtener aislados bacterianos con la capacidad potencial para degradar naproxeno sódico, ibuprofeno y cafeína en condiciones *in vitro*.

Metodología

Aislamiento microbiano de muestras de agua del río Chacamax

Se realizó un muestreo en el río Chacamax, Chiapas en las coordenadas: 17°30'00.7"N 91°57'42.5"W durante la temporada de seca (mayo de 2023). Las muestras de agua con sedimento se recolectaron en tubos falcon de 50 mL estériles y transportadas en una hielera a 4°C en oscuridad hasta su uso. El aislamiento de los microorganismos se realizó mediante diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-5}) e inoculadas por extensión en placas Petri con agar Luria Bertani (LB). Las muestras fueron incubadas a 35°C durante 48 horas, posteriormente, las bacterias fueron purificadas por la técnica de sembrado por estriado cruzado en placas Petri con medio agar LB hasta obtener un cepario axénico [15].

Identificación microbiológica por tinción de Gram

Los aislados obtenidos fueron caracterizados por tinción de Gram. La observación de las muestras fue hecha en un microscopio Leica DM500 a 100x.

Crecimiento bacteriano en medio mínimo mineral (MM9)

Los aislados axénicos fueron estriados en placas Petri con medio mínimo mineral (MM9) que tiene la siguiente composición por 1 L, contiene 1X sales M9, Na₂HPO₄ 70 g;

KH₂PO₄ 30 g; NH₄Cl 10 g, NaCl 5 g; 1 M MgSO₄ 7H₂O; 6 g FeCl₂; y Goodies (trazos minerales). El medio de cultivo MM9 fue suplementado con 0.5 mM de cada compuesto por separado (naproxeno sódico, ibuprofeno y cafeína) como la única fuente de carbono. Las placas Petri con agar MM9 inoculadas con cada una de las bacterias fueron incubadas a 35 °C durante 48h.

Identificación bioquímica de aislados bacterianos

Se realizaron seis pruebas bioquímicas para los aislados bacterianos con mayor crecimiento en las placas de MM9 con cada compuesto (naproxeno sódico, ibuprofeno y cafeína); las pruebas bioquímicas realizadas fueron agar triple azúcar - hierro (TSI), agar McConkey, agar MIO, agar Citrato de Simmons, ensayo catalasa y oxidasa. Cada una de las pruebas fueron hechas por triplicado para los aislados bacterianos seleccionados. Las placas Petri con agar McConkey y Citrato de Simmons fueron inoculadas por estriado cruzado; los tubos de ensayo contenían 5 mL de TSI en posición inclinada y fueron inoculadas mediante una asada microbiológica con cada aislado bacteriano en la superficie del agar desde la parte inferior a la superior; los tubos de ensayo con 5 mL de agar MIO se inocularon con una asada microbiológica por picadura en el agar semisólido; el ensayo de la enzima oxidasa se realizó con el kit de la marca Sigma Aldrich, se realizó un frotis bacteriano en el disco de la prueba y se humedeció con agua destilada estéril. Finalmente, para la prueba de enzima catalasa se aplicó una gota de H₂O₂ al 3% sobre un frotis de cada bacteria en un portaobjeto.

Curvas de crecimiento de los aislados bacterianos

Se prepararon inóculos bacterianos en tubos falcón de 50 mL con 10 mL de medio de cultivo líquido LB y se pusieron en incubación con agitación a 180 rpm durante 24 horas. Posteriormente, se realizaron lavados celulares a 5000 rpm por 10 minutos con agua destilada estéril para eliminar residuos del medio de cultivo original, el proceso se realizó 3 veces [17]. Seguidamente, a 15 matraces se les agregó 50 mL del MM9 y a 3 de ellos se les adicionó 0.5 mM de naproxeno sódico, ibuprofeno y/o cafeína por separado como la única fuente de carbono disponible en el medio de cultivo. Cada uno de los matraces correspondientes fueron inoculados con 50 µL de cada bacteria por separado y se cuantificó el número de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) a las 0 horas y 48 horas posteriores a la inoculación en el medio de cultivo con el método de goteo en sellado masivo (GSPM) [16].

Resultados y Discusión

Cultivo, purificación e identificación microbiológica de los aislados bacterianos del río Chacamax

Se obtuvieron un total de 48 aislados bacterianos provenientes de las muestras de agua del río Chacamax, a los que se les asignó la clave de RC1-RC48 (Río Chacamax, con

numeración de acuerdo con el orden de aparición morfológica durante el proceso de aislamiento microbiológico). Mediante la técnica de tinción de Gram se pudieron identificar bacterias con características de bacilos, 22 Gram positivos y 11 Gram negativas, también se identificaron cocos, 7 de ellos Gram positivos y 8 Gram negativos (Tabla 1).

Tabla 1. Morfologías de los aislados bacterianos obtenidos de las muestras del río Chacamax y su clasificación por tinción de Gram

Morfología	+(Positiva)	-(Negativa)
Bacilos	22 aislados	11 aislados
Cocos	7 aislados	8 aislados

Evaluación y selección de bacterias con capacidad de crecimiento con Naproxeno sódico, ibuprofeno y/o cafeína

Los 48 aislados bacterianos fueron inoculados en las placas con MM9 y 0.5 mM de cada uno de los compuestos (naproxeno sódico, ibuprofeno y cafeína) como su principal fuente de carbono en el medio de cultivo. Se observó un mayor crecimiento de las bacterias por la capacidad de formación de colonias en los aislados RC36, RC12 y RC11 (ver, Fig. 1) donde todas fueron Gram positivas. En el caso de la RC11 y RC36 poseen morfología de cocos mientras que la RC12 tuvo morfología de bacilos (ver, Tabla 2).

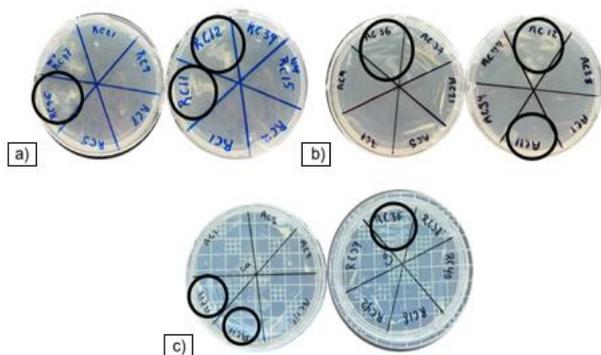


Fig 1. Evaluación del crecimiento bacteriano en placas Petri con agar MM9 con 0.5 mM de a) naproxeno sódico, b) ibuprofeno c) cafeína, como su única fuente de carbono. Selección de los aislados RC11, RC12 y RC36. Los círculos indican el crecimiento de los aislados seleccionados.

En la Fig. 2 se muestra el porcentaje de crecimiento de un total de 48 aislados bacterianos evaluados, después de las 48 horas de incubación a 35 °C en placas Petri con MM9 y 0.5 mM de naproxeno sódico, ibuprofeno y/o cafeína. En las placas con naproxeno sódico se observó el crecimiento de 33 bacterias, que representa el 69% del total de aislados bacterianos evaluados. La misma cantidad de bacterias crecieron cuando la fuente de carbono fue el ibuprofeno, aunque no todas las bacterias fueron las mismas comparadas

con el primer compuesto. Finalmente, cuando la cafeína fue la principal fuente de carbono del medio de cultivo, 36 bacterias crecieron en las placas Petri, lo que equivale al 75% de los 48 aislados bacterianos obtenidos, para este último compuesto también hubo diferencia de aislados con crecimiento.

El crecimiento de estas bacterias en los ensayos en placa Petri puede deberse a la evolución adaptativa, ya que al estar expuestas a una variedad de contaminantes en su medio natural, de donde fueron aisladas y donde existe una presión selectiva debido a las condiciones de estrés y poca disponibilidad de los nutrientes asimilables, como estrategia de supervivencia, estos microorganismos tienen la posibilidad de desarrollar mecanismos enzimáticos como la producción de dioxigenasas, monooxigenasas y peroxidasas que les permite transformar los contaminantes y usarlos como fuente de energía [9].

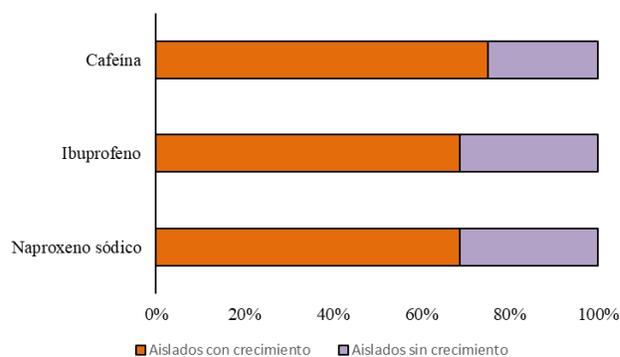


Fig 2. Porcentaje de crecimiento bacteriano en placas Petri con agar MM9 y 0.5 mM del contaminante emergente como fuente de carbono. cafeína 75%, ibuprofeno 69% y naproxeno sódico 69%.

Caracterización bioquímica de los aislados bacterianos seleccionados

Las pruebas bioquímicas se realizaron a los tres aislados bacterianos seleccionados RC36, RC12 y RC11, estos ensayos permitieron generar un perfil metabólico de las bacterias de interés (Tabla 2). Las tres bacterias presentaron actividad oxidasa, enzima que juega un papel importante en la regulación de las especies reactivas de oxígeno (EROS), su acción es la reducción del oxígeno intracelular en agua (H_2O) o formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2), producto metabólico que activa a las enzimas catalasas, parte del sistema de defensa antioxidante, la actividad enzimática solo fue observada en el aislado bacteriano RC36.

El citrato puede ser metabolizado por las tres bacterias seleccionadas, este es el primer intermediario formado del ciclo de Krebs, esta molécula es desdoblada a oxalacetato y piruvato, que, en un medio alcalino, mismo que es observable por el cambio de coloración azul en la placa, produce ácidos orgánicos que pueden ser utilizados como fuente de carbono por la actividad de la enzima citrato permeasa (Fig. 3).

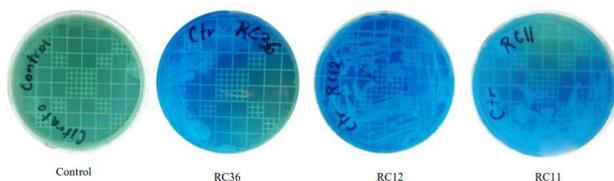


Fig 3. Resultados de la prueba bioquímica de Citrato de Simmons de los aislados bacterianos RC36, RC12 y RC11.

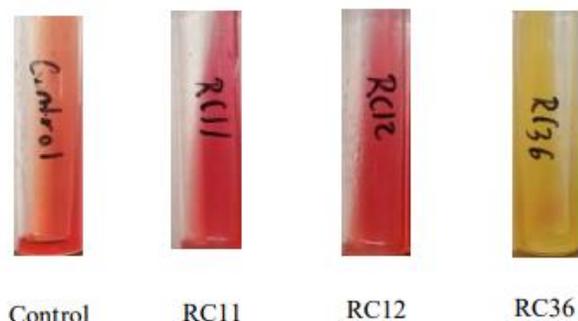


Fig 4. Resultados de la prueba bioquímica de Agar de triple azúcar de los aislados bacterianos RC36, RC12 y RC11.



Fig. 5 Resultados de la prueba bioquímica de Agar MIO de los aislados bacterianos RC36, RC12 y RC11.

Con el medio TSI se evaluó la capacidad de fermentar los azúcares glucosa, sacarosa y/o lactosa. Los aislados RC11 y RC12 no fermentan ninguno de los tres carbohidratos. RC36 tiene la capacidad de utilizar los tres compuestos (Fig.4).

La prueba con el medio MIO permitió la identificación de la movilidad de los aislados por lo que estos aislados poseen flagelos (ver, Fig. 5), las estructuras celulares responsables de este mecanismo, la actividad de la enzima ornitina descarboxilasa también se evaluó con este medio de cultivo y si estos microorganismos tienen la capacidad de formar indol. El medio MIO posee también glucosa, la fermentación de esta molécula se observa con el cambio de una coloración amarilla, la falta de la enzima ornitina descarboxilasa se puede observar en los aislados RC11 y RC12 pues el medio no genera coloración púrpura. Para el aislado RC36, produce la enzima ornitina descarboxilasa por lo que el medio de cultivo se torna más oscuro. No hubo producción de indol con el aislado RC36.

Tabla 2. Características bioquímicas de los tres aislados seleccionados

Ensayo	RC11	RC12	RC36
Catalasa	-	-	+
Oxidasa	+	+	+
Lactosa	-	-	+
Sacarosa	-	-	+
Glucosa	+	+	-
Indol	-	-	-
Citrato	+	+	+
Movilidad	+	+	+
Ornitina descarboxilasa	+	+	+

Curvas de crecimiento

La cuantificación de las UFC/mL se realizó a las 0 horas y 48 horas posteriores a la inoculación de cada uno de los aislados, la Tabla 3. muestra la viabilidad celular de las bacterias inoculadas en MM9 con cada compuesto, se puede observar que la viabilidad disminuye a las 48 horas, esto puede ser por la poca asimilación de las bacterias para poder consumir el sustrato y no siendo lo suficiente para generar colonias en el medio de cultivo, lo que podría sugerir dos cosas, que las bacterias entran a una fase de muerte celular o a una fase de latencia, el estado viable no cultivable, algunos microorganismos como *E.coli* y *Pseudomonas putida* KT2440 pueden generar este mecanismo como una estrategia de supervivencia cuando la disponibilidad de los nutrientes es limitado [19-20].

Tabla 3. Viabilidad celular de las bacterias inoculadas en LogUFC/mL

	RC11		RC12		RC36	
	0 horas	24 horas	0 horas	24 horas	0 horas	24 horas
NPX	4.46	0	5.33	0	5.11	0
IBP	5.91	0	4.96	0	5.13	2.98
CAF	4.61	0	4.8	0	4.20	0

Conclusiones, perspectivas y recomendaciones

Se seleccionaron bacterias a partir de muestras del río Chacamax con capacidad de crecer en placa Petri con un medio restringido de nutrientes, MM9, y con una única fuente de carbono que fue naproxeno sódico, ibuprofeno o cafeína, tres aislados bacterianos fueron evaluados posteriormente en medio de cultivo líquido con una concentración de 0.5 mM de los compuestos ya referidos. Sin embargo, al ser inoculados en estas condiciones de cultivo, la viabilidad celular disminuye a las 48 horas de monitoreo, no fue posible cuantificar las UFC/mL de los microorganismos en este tiempo posterior a la inoculación, a excepción del aislado bacteriano RC36 con ibuprofeno como fuente de carbono, el LogUFC/mL fue de 2.98 (Tabla 3). El trabajo cumple con la obtención de bacterias de interés por

su posible potencial metabólico para la degradación de los compuestos utilizados, no obstante, se realizará una estandarización del método de cultivo en medio líquido para optimizar el crecimiento bacteriano, modificando concentraciones de los compuestos que funcionan como fuente de carbono, además de analizar variantes como es el co-metabolismo con alguna fuente primaria como glucosa o citrato que permita activar posibles genes involucrados en el proceso de degradación.

Referencias

1. J. A. Martínez García, **Química verde: eliminación de contaminantes emergentes en efluentes mediante biomasa lignocelulósica de bajo coste procedentes de la industria agroalimentaria. Trabajo fin de máster, univ. Politéc. Cartagena**, Cartagena, 2019. Accedido el 22 de octubre de 2023. Disponible: <https://repositorio.upct.es/xmlui/bitstream/handle/10317/8130/tfm-mar-qui.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. (Activo octubre de 2023)
2. O. D. Gil, Soto, Usma y Gutiérrez, **Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos**, *Prod. + Limpia*, vol. 7, n.º 2, art. n.º 52-73. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/pml/v7n2/v7n2a05.pdf>. Diciembre de 2012. (Activo octubre de 2023)
3. Jacobo Marín, D., & Santacruz de León, G. **Contaminantes emergentes en el agua: Regulación en México, principio precautorio y perspectiva comparada**. *Revista de Derecho Ambiental*, 15, 51. <https://doi.org/10.5354/0719-4633.2021.57414>. 2021. (Activo octubre de 2023)
4. Vieira, L. R., Soares, A. M. V. M., & Freitas, R. **Caffeine as a contaminant of concern: A review on concentrations and impacts in marine coastal systems**. *Chemosphere*, 286, 131675. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131675>. 2022 (Activo noviembre de 2023).
5. Sanchez Ramírez, J. E. **Contaminantes emergentes en nuestros ecosistemas acuáticos: enemigos invisibles**. *Ingeniería y Región*, 19, 18–21. <https://doi.org/10.25054/22161325.1750>. 2018. (Activo octubre de 2023)
6. Ferrándiz Santos, J., & Mataix Sanjuan, A. **Fármacos antiinflamatorios no esteroideos y gastroprotección**. *FMC - Formación Médica Continuada en Atención Primaria*, 11(10), 641–650. [https://doi.org/10.1016/s1134-2072\(04\)76225-8](https://doi.org/10.1016/s1134-2072(04)76225-8). 2004. (Activo octubre de 2023)
7. Pardo Lozano, R., Álvarez García, Y., Barral Tafalla, D., & Farré Albaladejo, M. **Cafeína: un nutriente, un fármaco, o una droga de abuso**. *Adicciones*, 19(3), 225. <https://doi.org/10.20882/adicciones.303>. 2007. (Activo octubre de 2023)
8. C. E. M. Tovar, Quiñones-Bolaños, Peña. “Contaminantes Emergentes en Aguas: Metabolitos de Fármacos. Una Revisión”. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*. Accedido el 4 de noviembre de 2023. Disponible: https://www.researchgate.net/publication/305196476_Contaminantes_Emergentes_en_Aguas_Metabolitos_de_Farmacos_Una_Revision/citation/download (Activo noviembre de 2023)
9. A. Marchlewicz, D. Domaradzka, U. Guzik y D. Wojcieszynska, **Bacillus thuringiensis B1(b2015) is a Gram-Positive Bacteria Able to Degrade Naproxen and Ibuprofen**, *Water, Air, & Soil Pollut.*, vol. 227, n.º 6. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11270-016-2893-0>. Mayo de 2016. (Activo octubre de 2023)
10. D. Domaradzka, U. Guzik, K. Hupert-Kocurek y Wojcieszynska, D., **Cometabolic Degradation of Naproxen by Planococcus sp. Strain S5**, *PubMed Central (PMC)*, vol. 1, pp. 226-297, doi: 10.1007/s11270-015-2564-6. Agosto 2015 (Activo noviembre de 2023)
11. R. M. Pérez Silva, **Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo**, *Rev. CENIC. Cienc. Biol.*, vol. 39, n.º 1, p. 9, 2008. Accedido el 29 de octubre de 2023. Disponible: <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181214889004.pdf> (Activo octubre de 2023)
12. M. E. Medina, **Disponibilidad del agua en México**, *Agua en México*, p. 46. Accedido el 29 de octubre de 2023. Disponible: <https://agua.org.mx/wp-content/uploads/2017/07/Agua-en-Mexico-Un-prontuario-para-la-correcta-toma-de-decisiones-2017.pdf> (Activo octubre de 2023)
13. INEGI, **Cuenca hidrológica Chacamax Humedales**, Instituto Nacional de Estadística y Geografía, México, 2020. Disponible en: Disponible:

https://www.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva_estruc/702825196950.pdf. (Activo octubre de 2023)

14. SEMARNAT Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. **Aguas residuales**. semarnat.gob.mx. Disponible en: https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/informe_resumen14/06_agua/6_2_3.html. 2014. (Activo octubre de 2023)

15. Solís Castillo, B., Ortiz Pérez, M. A., & Solleiro Rebolledo, E. (2014). **Unidades geomorfológico-ambientales de las Tierras Bajas Mayas de Tabasco-Chiapas en el río Usumacinta: Un registro de los procesos aluviales y pedológicos durante el Cuaternario**. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, 66(2), 279–290. Disponible en <https://doi.org/10.18268/bsgm2014v66n2a5> (Activo octubre de 2023)

16. S. Jiménez Vargas, L. Labra López, X. Romero García, L. E. López Cruz, R. Ramírez Rodríguez, Universidad Iberoamericana Puebla & Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana (LEMM), Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. (2 de diciembre del 2022). **Adaptación de cepas del género Pseudomonas provenientes de composta para la degradación de naproxeno sódico**. Universidad Iberoamericana Puebla. Repositorio Institucional. Disponible: <https://hdl.handle.net/20.500.11777/5575> (Activo noviembre de 2023).

17. A. Corral-Lugo. **Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de "Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo"**. SciELO Colombia- Scientific Electronic Library Online. Accedido el 4 de noviembre de 2023. Disponible: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0123-34752012000200016&lng=e . (Activo noviembre de 2023)

18. Morante Carriel, Canchignia, Morante Carriel, Romero Meza, Cedeño Moreria, Abasolo Pacheco. (2018). **Bacterias con potencialidades para la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados de Quevedo, Ecuador**. Revista cubana de ciencias biológicas, 6(3), Artículo 3. <https://revistas.uh.cu/rccb/article/view/1134> (Activo noviembre de 2023)

19. M. Boaretti, M. M. Lledò, B. Bonato, C. Signoretto, P. Canepari, Dipartimento di Patologia, Università di Verona, Strada Le Grazie, 37124 Verona, Italy. **Involvement of rpoS in the survival of Escherichia coli in the viable but non-culturable state**, NIH, p. 21, 2019. Disponible: <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00497.x> (Activo noviembre de 2023)

20. L. A. Pazos Rojas, L. C. Muñoz Arenas, O. Rodríguez Andrade, L. E. López Cruz, O. López Ortega, F. Lopes Olivares, S. Luna Suarez, A. Baez, Y. E. Morales García, V. Quintero Hernández, M. A. Villalobos López, J. Muñoz Rojas, J. De la Torre. **Desiccation-induced viable but nonculturable state in Pseudomonas putida KT2440, a survival strategy**, NIH, p. 31, 2019. Accedido el 20 de noviembre de 2023. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219554> (Activo noviembre de 2023)

