

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA**  
**ESCUELA DE BIOLOGÍA**  
**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

Informe de Práctica de Especialidad

**Estudio del potencial de degradación de los  
hidrocarburos por *Acinetobacter sp.* y  
*Pseudomonas putida* para su aplicación  
en la biorremediación de suelos contaminados**

Caroline Braibant Wayens

Cartago, 2004

**Estudio del potencial de degradación de los hidrocarburos  
por *Acinetobacter sp.* y *Pseudomonas putida* para  
su aplicación en la biorremediación de suelos contaminados**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico  
de Costa Rica como requisito parcial para optar al grado de  
Bachiller en Ingeniería en Biotecnología**

**Miembros del Tribunal**

---

**Dra. Silvia Soto Córdoba  
Profesora Asesora**

---

**MSc. Nancy Hidalgo Dittel  
Lectora**

---

**Dr. Miguel Rojas  
Lector**

## ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b>	<b>i</b>
<b>DEDICATORIA</b>	<b>ii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>iii</b>
<b>INDICE DE CUADROS</b>	<b>iv</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>v</b>
<b>INDICE DE ANEXOS</b>	<b>viii</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>La contaminación con hidrocarburos</b>	<b>2</b>
<b>El petróleo y sus hidrocarburos</b>	<b>4</b>
<b>Tratamientos físicos, químicos y biológicos</b>	<b>5</b>
Tratamientos físicos	6
Tratamientos químicos	6
Tratamientos biológicos	7
<b>Los microorganismos que degradan los hidrocarburos</b>	<b>8</b>
<i>Acinetobacter sp.</i> y <i>Pseudomonas putida</i>	9
Microorganismos Genéticamente Modificados (MGM)	10
Biodisponibilidad del agente contaminante : surfactantes naturales y sintéticos	11
<b>El metabolismo de los hidrocarburos</b>	<b>12</b>
Parámetros indicadores de la metabolización de los hidrocarburos	15
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b>	<b>17</b>
<b>La biodegradación de los hidrocarburos</b>	<b>18</b>
<b>Bioaumentación con <i>Acinetobacter sp.</i> y <i>Pseudomonas putida</i></b>	<b>19</b>
<b>Resultados de una bioestimulación con nutrientes inorgánicos y orgánicos</b>	<b>20</b>
<b>Potencial de la biorremediación de los suelos contaminados con hidrocarburos por <i>Acinetobacter sp.</i> y <i>Pseudomonas putida</i></b>	<b>20</b>
<b>OBJETIVO</b>	<b>22</b>
<b>Objetivo general</b>	<b>23</b>
<b>Objetivos específicos</b>	<b>23</b>

<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>24</b>
<b>Material biológico, medios de cultivo y precultivos y preparación de los inóculos</b>	<b>25</b>
Material biológico	25
Medios de cultivo	25
Precultivos y preparaciones de los inóculos	28
<b>Pruebas de biorremediación en medio líquido</b>	<b>28</b>
Pruebas en erlenmeyers de 250 ml	28
Pruebas en reactor de dos litros	28
Lectura del pH	29
Lectura directa de la densidad óptica	29
Lectura indirecta de la densidad óptica	29
Medida de viabilidad	29
Pesos Secos	30
Determinación del consumo de hidrocarburo por el método gravimétrico	30
Determinación de la concentración del hidrocarburo por el kit enzimático Total Petroleum Hydrocarbures (TPH) Immunoassay Method (HACH) para muestras acuosas	30
Determinación del consumo de glucosa por Accutrend® alpha	31
Determinación del consumo de glucosa por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC)	31
<b>Pruebas sobre suelo artificialmente contaminado con diesel</b>	<b>32</b>
Origen de la tierra y determinación de sus características físico-químicas	32
Medida del pH y de la conductividad eléctrica de la tierra	32
Determinación del contenido en materia seca de la tierra	32
Medidas de la densidad y el volumen de la tierra	32
Pretratamiento de la tierra : tamizado, contaminación artificial e inoculación	33
Lectura de la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) : Principio de los métodos VELP Scientifica y OxiTop® OC110	33
Análisis de la evolución de la microbiología	34
Determinación de la concentración del hidrocarburo por el kit enzimático Total Petroleum Hydrocarbures (TPH) Immunoassay Method (HACH) para las muestras de tierra	35
<b>RESULTADOS</b>	<b>36</b>
<b>Cultivo de los microorganismos sobre medio enriquecido</b>	<b>37</b>
<b>Degradación del los hidrocarburos en erlenmeyers de 250 ml</b>	<b>39</b>

Degradación efectuada por <i>Acinetobacter sp.</i> LMG 1056	40
Degradaciones efectuadas por <i>Pseudomonas putida</i> LMG 2257, <i>P. putida</i> ATCC 39213, <i>P. putida</i> DSMZ 6414 y <i>P. putida</i> DSMZ 6899	41
<b>Degradación de los hidrocarburos en reactores de dos litros</b>	<b>46</b>
Degradaciones efectuadas por <i>Acinetobacter sp.</i> LMG 1056	46
<i>Acinetobacter sp.</i> LMG 1056 sobre hexadecano (C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> )	47
Degradación del diesel por <i>Acinetobacter sp.</i> LMG 1056	49
Degradación del decano (C <sub>10</sub> H <sub>22</sub> ) por <i>Acinetobacter sp.</i> LMG 1056	51
Degradación del tolueno (C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> ) por <i>Acinetobacter sp.</i> LMG 1056	52
Degradación del tolueno (C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> ) por <i>Acinetobacter sp.</i> LMG 1056 en presencia de glucosa	54
Degradación del octano (C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> ) por <i>Acinetobacter sp.</i> LMG 1056	56
Degradación del octano (C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> ) por <i>Acinetobacter sp.</i> LMG 1056 en presencia de glucosa	57
Degradaciones realizadas por <i>Pseudomonas putida</i> LMG 2257	59
Degradación del tolueno por <i>Pseudomonas putida</i> LMG 2257	59
Degradación del diesel por <i>Pseudomonas putida</i> LMG 2257	59
<b>Degradación del diesel sobre un suelo artificialmente contaminado</b>	<b>61</b>
Características de la tierra	61
Evaluación de la actividad de degradación de <i>Acinetobacter sp.</i> LMG 1056 en una tierra artificialmente contaminada con diesel	61
Evolución de la Demanda Bioquímica de Oxígeno medida en los ensayos en tierra	61
Evolución de la viabilidad de las poblaciones presentes en las tierras	63
Cuantificación de la concentración de diesel presente en las tierras por el método 10050 TPH Immunoassay method de HACH	64
Evaluación de la actividad de degradación de <i>Acinetobacter sp.</i> LMG 1056 en un slurry que contiene tierra artificialmente contaminada con diesel	65
Evolución de la Demanda Bioquímica de Oxígeno medida en los ensayos en slurry	66
Evolución de la viabilidad de las poblaciones presentes en los slurries	67
Cuantificación de la concentración de diesel presente en los slurries por el método 10050 TPH Immunoassay method de HACH	67
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>69</b>
<b>Condiciones de crecimiento y parámetros controlados</b>	<b>70</b>
La importancia del pH como parámetros indicador de la actividad metabólica	70
La importancia de la temperatura para el crecimiento bacteriano	71
Importancia de la disponibilidad de oxígeno para la actividad metabólica y el crecimiento	71
La importancia de la disponibilidad de la fuente de carbono y de energía para el metabolismo y el crecimiento bacterianos	72

<b>Medida de la viabilidad de las poblaciones</b>	<b>74</b>
La densidad óptica	74
Los plaques	74
El peso seco	75
<b>Medida de la degradación de los hidrocarburos puros y del diesel</b>	<b>75</b>
Método gravimétrico	75
Método enzimático	76
<b>La degradación de los hidrocarburos por <i>Pseudomonas putida</i> en medio acuoso</b>	<b>76</b>
<b>La degradación de los hidrocarburos por <i>Acinetobacter sp.</i> LMG 1056</b>	<b>77</b>
Degradación de los hidrocarburos por <i>Acinetobacter sp.</i> LMG 1056 en medio acuoso	78
Degradación del diesel por <i>Acinetobacter sp.</i> LMG 1056 en tierra y lodo	79
<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b>	<b>81</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>83</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>94</b>

# Estudio del potencial de degradación de los hidrocarburos por *Acinetobacter sp.* y *Pseudomonas putida* para su aplicación en la biorremediación de suelos contaminados

Caroline Braibant Wayens\*

## RESUMEN

El petróleo constituye una fuente de energía de capital importancia en la sociedad actual. La explotación de este combustible natural implica el vertido voluntario o involuntario de hidrocarburos en el agua, el suelo y el aire. En lo que respecta al suelo, los hidrocarburos tienden a adsorberse a las partículas y pueden, como en el caso de los aromáticos, contaminar las napas freáticas. Esta contaminación puede tratarse por medios físicos, químicos y biológicos.

El tratamiento biológico de una contaminación recibe el nombre de biorremediación. Este tratamiento puede llevarse a cabo *in situ* o *ex situ* y por bioatenuación, bioestimulación o bioaumentación. Los microorganismos que se utilizan usualmente en este último caso para la degradación de los hidrocarburos son las bacterias gram negativo.

*Acinetobacter sp.* es un coccobacilo gram negativo aeróbico reconocido por su capacidad para degradar las fracciones alifáticas del petróleo. *Pseudomonas putida* es un bacilo gram negativo aeróbico reconocido por su capacidad para degradar las fracciones aromáticas del petróleo. Estas bacterias presentan las condiciones necesarias para constituir la base para el diseño de un consorcio bacteriano para la degradación de contaminación por hidrocarburos en el suelo.

Se determinó el potencial de degradación de una cepa de *Acinetobacter sp.* y cuatro cepas de *Pseudomonas putida* sobre nueve hidrocarburos puros y diesel en medio acuoso a pequeña (erlenmeyer de 100 ml) y mediana (reactor de dos litros) escala, así como en medio sólido (suelo) y semi-sólido (lodo o slurry). Se tomaron en cuenta la densidad óptica, el peso seco y la viabilidad expresada en UFC/ml para controlar el crecimiento bacteriano. El metabolismo se verificó mediante los parámetros de pO<sub>2</sub>, pH, consumo de ácido o base así como la desaparición del hidrocarburo del medio a lo largo del tiempo medido por un método gravimétrico y por el método enzimático TPH Immunoassay Method 10050 de HACH.

En lo que respecta a los ensayos en medio acuoso, mientras que *P. putida* aparece en la literatura como un microorganismo capaz de degradar el tolueno, se observó una muerte instantánea al colocar a estas bacterias en presencia del hidrocarburo. Sin embargo, se pudo observar un ligero crecimiento sobre diesel. Por su lado, *Acinetobacter sp.* degradó el diesel, el hexadecano y el decano y creció sobre el tolueno. El octano constituyó un sustrato tóxico para la cepa. Los ensayos en suelo y lodo se evaluaron de acuerdo con los cambios de DBO, de viabilidad y de la concentración del diesel en 28 días de estudio. Se obtuvo una desaparición más importante del diesel en los ensayos con lodo que en aquellos preparados con tierra seca.

Mientras que *Acinetobacter sp.* LMG 1056 resultó constituir un microorganismo prometedor para el diseño del consorcio, las diferentes *Pseudomonas putida* no mostraron las capacidades esperadas. Se recomienda estudiar la capacidad de degradación del diesel que presentarían las dos especies trabajando en complementariedad.

---

\* Informe de Práctica de Especialidad para optar al grado de bachiller en Ingeniería en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 2004.

## **DEDICATORIA**

A mis abuelos, mis padres  
y mis hermanos por confiar en mí

A Federico por su apoyo  
a través de la distancia



## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo agradecer de todo corazón al equipo de la Unité de Biotechnologie del Institut Meurice por haberme dado la oportunidad de probarme a mí misma y de descubrir mi país natal desde una nueva perspectiva.

Agradezco también a mis profesores asesores, el Sr. Durieux y la Dra. Soto, por el apoyo que me dieron cada uno a su manera, para hacer de este trabajo algo enriquecedor.

Gracias también a la Sra. Hidalgo por las recomendaciones y los ideales ambientalistas que ella y la Sra. Soto confirmaron en mí.

Finalmente, a mis cinco amigas por las estudiadas y las risas constantes durante los últimos años de universidad especialmente.

## ÍNDICE DE CUADROS

Número	Título	Página
1	Características de los crecimientos de las cepas bacterianas sobre medio LB enriquecido (pH inicial = 7).	38
2	Relación de viabilidad expresada en UFC/ml con respecto a una densidad óptica unitaria para las cinco cepas cultivadas en medio rico.	39
3	Evolución de los pH de los cultivos de <i>Acinetobacter sp.</i> LMG 1056 en medio MM2 que contiene glucosa o hidrocarburos puros (pH inicial = 7).	41
4	Evolución de los pH de los cultivos de <i>Pseudomonas putida</i> LMG 2257 en medio MM2 que contiene glucosa o hidrocarburos puros (pH inicial = 7).	42
5	Evolución de los pH de los cultivos <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 39213 en medio MM2 con glucosa o hidrocarburos (pH inicial = 7).	43
6	Evolución de los pH de los cultivos de <i>Pseudomonas putida</i> DSMZ 6414 en el medio MM2 con glucosa o hidrocarburos (pH inicial = 7).	44
7	Evolución de los pH de los cultivos de <i>Pseudomonas putida</i> DSMZ 6899 en el medio MM2 con glucosa o hidrocarburos (pH inicial = 7).	45
8	Propiedades físicas de la tierra utilizada para los ensayos de biodegradación en medio sólido, después del tamizado.	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

Número	Título	Página
1	Distribución de la contaminación en el medio ambiente	3
2	Rutas de degradación de los alcanos por oxidación del grupo metil terminal, subterminal y biterminal	13
3	Transformación de un ácido graso en el Ciclo de Krebs	14
4	Reacción de degradación del benceno, del tolueno y del xileno	15
5	Curvas de crecimiento de las cinco cepas bacterianas estudiadas (D.O. directa a 660 nm en función del tiempo)	37
6	Evolución de la densidad óptica de los cultivos en erlenmeyers de <i>Acinetobacter sp.</i> LMG 1056 sobre diversos hidrocarburos	40
7	Evolución de la densidad óptica a 660 nm de los cultivos en erlenmeyers de <i>Pseudomonas putida</i> LMG 2257 sobre diversos hidrocarburos	42
8	Evolución de la densidad óptica a 660 nm de los cultivos en erlenmeyers de <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 39213 sobre diversos hidrocarburos	43
9	Evolución de la densidad óptica a 660 nm de los cultivos en erlenmeyers de <i>Pseudomonas putida</i> DSMZ 6414 sobre diversos hidrocarburos	44
10	Evolución de la densidad óptica a 600 nm de los cultivos en erlenmeyers de <i>Pseudomonas putida</i> DSMZ 6899 sobre diversos hidrocarburos	45
11	Evaluación del crecimiento de <i>Acinetobacter sp.</i> LMG 1056 en un medio que contiene HEXADECANO como única fuente de carbono y de energía (concentración inicial = 3,89 g/l)	47
12	Crecimiento de las células bacteriana de la cepa <i>Acinetobacter</i>	47

	<i>sp.</i> LMG 1056 sobre las emulsiones de hexadecano (1000X)	
13	Evolución de los parámetros indicadores de la metabolización del HEXADECANO por <i>Acinetobacter sp.</i> LMG 1056	48
14	Evaluación del crecimiento de <i>Acinetobacter sp.</i> LMG 1056 en un medio que contiene DIESEL como única fuente de carbono y de energía (concentración inicial = 4,13 g/l)	49
15	Crecimiento de <i>Acinetobacter sp.</i> LMG 1056 sobre las emulsiones de diesel (1000X)	50
16	Consumo de base (NaOH 2 M) como indicador del metabolismo del DIESEL por <i>Acinetobacter sp.</i> LMG 1056	50
17	Crecimiento de las células bacterianas de la cepa <i>Acinetobacter sp.</i> LMG 1056 sobre emulsiones de decano (1000X)	51
18	Evaluación del crecimiento de <i>Acinetobacter sp.</i> LMG 1056 en un medio que contiene DECANO como única fuente de carbono y de energía (concentración inicial = 3,65 g/l)	52
19	Evaluación del crecimiento de <i>Acinetobacter sp.</i> LMG 1056 en un medio que contiene TOLUENE como única fuente de carbono y de energía (concentración inicial = 4,33 g/l)	53
20	Evolución de los parámetros indicadores de la metabolización del TOLUENO por <i>Acinetobacter sp.</i> LMG 1056	54
21	Evaluación del crecimiento de <i>Acinetobacter sp.</i> LMG 1056 en un medio que contiene TOLUENO (concentración inicial = 4,33 g/l) y 2 g/l de GLUCOSA	55
22	Evolución de los parámetros indicadores de la actividad metabólica de <i>Acinetobacter sp.</i> LMG 1056 en un medio que contiene TOLUENO en presencia de GLUCOSA	56
23	Viabilidad de <i>Acinetobacter sp.</i> LMG 1056 en un medio que contiene OCTANO como única fuente de carbono y de energía (concentración inicial = 3,51 g/l)	57

24	Evaluación del crecimiento de <i>Acinetobacter sp.</i> LMG 1056 en un medio que contiene OCTANO (concentración inicial = 3,51 g/l) y 2 g/l de GLUCOSA	58
25	Evolución de los parámetros indicadores de la actividad metabólica de <i>Acinetobacter sp.</i> LMG 1056 en un medio que contiene OCTANO en presencia de GLUCOSA	58
26	Evaluación del crecimiento de <i>Pseudomonas putida</i> LMG 2257 en un medio que contiene DIESEL como única fuente de carbono y de energía (concentración inicial = 4,13 g/l)	59
27	Evolución de los parámetros indicadores de la metabolización del DIESEL por <i>Pseudomonas putida</i> LMG 2257	60
28	Evolución de la Demanda Bioquímica de Oxígeno de los sistemas de degradación del diesel por <i>Acinetobacter sp.</i> LMG 1056 sobre una tierra artificialmente contaminada	62
29	Evolución de la población microbiana total en las muestras de tierra a lo largo de los 28 días de seguimiento	63
30	Concentración de diesel en el momento inicial y después de 28 días de seguimiento de la actividad de <i>Acinetobacter sp.</i> LMG 1056 en tierra	65
31	Demanda Bioquímica de Oxígeno de los sistemas de degradación del diesel por <i>Acinetobacter sp.</i> LMG 1056 en lodo	66
32	Evolución de la población microbiana total de las muestras de lodo a lo largo de los 28 días del seguimiento	67
33	Concentración del diesel en el tiempo inicial y después de 28 días del seguimiento de la actividad de <i>Acinetobacter sp.</i> LMG 1056 en lodo	68
34	Elementos constitutivos de la biorremediación	70

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Número</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Medios de cultivo empleados en la investigación	84
2	Biorreactor BIOSTAT®B de dos litros	85
3	Autoclave y olla de presión empleadas para la esterilización	86
4	Espectrofotómetro utilizado para las lecturas de absorbancia	87
5	Utensilios utilizados para el sembrado o plaqueo de las bacterias	88
6	Centrifugadoras empleadas durante el estudio	89
7	Rotavapor utilizado para el método gravimétrico	90
8	Detalles del método enzimático	91
9	Roller Bottle para homogeneizar el diesel en el suelo	93
10	Sistemas de lectura de Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO)	94

# **I. INTRODUCCIÓN**

## I.1. LA CONTAMINACIÓN CON HIDROCARBUROS

El petróleo y sus derivados constituyen una importante fuente de contaminación. Se estima que de 0,08 % a 0,46 % (más de tres millones de toneladas) de la producción total del petróleo termina formando parte, bajo diversas formas, de la contaminación ambiental (Jacobucci *et al.*, 2000). Una de las formas de controlar los derrames de petróleo es utilizando la biorremediación. Al respecto, la USEPA (United States Environment Protection Agency) indica que un 30 % de esta contaminación en los Estados Unidos se combate por biorremediación (Olson *et al.*, 1999).

Con formato: Español  
(España - alfab. tradicional)

Con formato: Español  
(España - alfab. tradicional)

Con formato: Español  
(España - alfab. tradicional)

Con formato: Español  
(España - alfab. tradicional)

Con formato: Español  
(España - alfab. tradicional)

El petróleo contamina el ambiente en las diferentes etapas de su explotación, extracción, transporte y refinado (Vasudevan ; Rajaram, 2001). Existen dos tipos de contaminación : 1) la involuntaria, que ocurre por defectos mecánicos, la corrosión de las tuberías y las fugas durante las etapas de transferencia y la contaminación y 2), la voluntaria, que se da con las prácticas de incineración y los vertidos en suelo y agua (Stelmack ; Gray ; Pickard, 1998).

La contaminación con hidrocarburos generalmente no se considera un problema en el suelo ; esta percepción está basada en los últimos accidentes importantes que implicaron el vertido de grandes cantidades de petróleo en el mar (el Erika en 1999, el Exxon Valdez en 2001 (Marchand, 2001) y el Prestige en 2002). Sin embargo, la contaminación del suelo existe principalmente concentrada en los alrededores de las refinadoras, pozos de petróleo, depósitos de petróleo, aeropuertos, bases militares y estaciones gasolineras (Jacobucci *et al.*, 2000).

Con respecto a las técnicas de tratamiento de los hidrocarburos utilizando microorganismos, es relativamente más sencillo biorremediar la contaminación en un ambiente acuoso, ya que el hidrocarburo se extiende horizontalmente sobre la superficie del agua, donde es más accesible para los microorganismos. Además de la biodegradación, el hidrocarburo puede mediante otros procesos físico-químicos adicionales, evaporarse de manera que disminuya su concentración (Franzmann *et al.*, 2002).

En el suelo, la adsorción de la contaminación constituye una forma de inmovilización que disminuye la toxicidad del contaminante pero aumenta su longevidad y permanencia en este compartimiento ambiental. El desplazamiento de la contaminación en el suelo, contrariamente al que ocurre en el agua, se produce de manera vertical hasta alcanzar las fuentes de agua potable provocando con ello serios problemas de degradación de los recursos naturales (Harris, 1997), como lo presenta la figura 1.



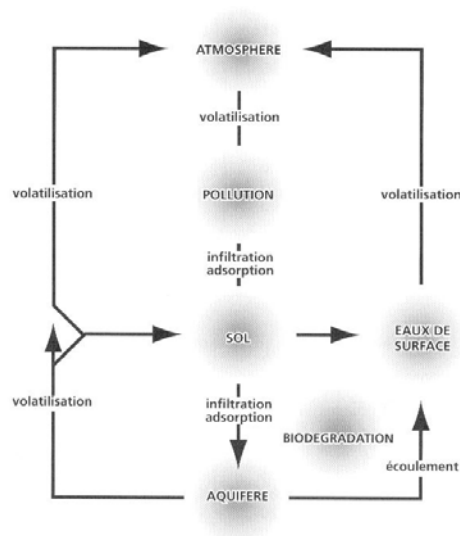


Fig. 1 : Distribución de la contaminación en el medio ambiente (Ballerini ; Gatellier ; Vogel, 1998).

La contaminación del suelo con hidrocarburos impide la utilización de este para actividades como la agricultura y la urbanización y adicionalmente pone en riesgo las napas freáticas que en algunos países constituyen la fuente principal de agua potable. He aquí la importancia primordial de remediar estos suelos (Hanson *et al.*, 1997).

El suelo es una matriz de partículas orgánicas e inorgánicas con diferentes características físicas y químicas que dependen del clima, altitud y latitud. Estas partículas están organizadas en forma de agregados particulares, que tienen propiedades que explican la absorción y la adsorción de contaminantes (Weber ; Young ; Hillers, 1998). Cuando los hidrocarburos entran en contacto con las partículas del suelo, se adsorben a ellas y modifican las propiedades de las mismas (fig. 1). Los agregados del suelo se vuelven más estables al endurecerse con el tiempo y se vuelven menos porosos, más hidrofóbicos y su contenido en aire disminuye (Cassidy ; Irvine, 1998). Los cambios causados por la contaminación

provocan un desequilibrio tal en el suelo, que toda clase de vida, vegetal como microbiana, se ve limitada en cantidad y diversidad y puede inclusive desaparecer rápidamente (Venosa *et al.*, 1999).

Los agentes contaminantes pueden encontrarse bajo cuatro formas o fases en el suelo y su presencia bajo una u otra de ellas implicará una disponibilidad y una toxicidad determinadas (Harris, 1997). Un contaminante presenta por lo tanto, una toxicidad relacionada con su estructura química, y una toxicidad de fase, que depende de la presentación del contaminante en el medio (Schwartz ; Bar, 1995) :

- VP (*Vapor Phase*) : el contaminante presenta un carácter volátil de manera que permanece aprisionado en los poros del suelo en fase gaseosa. La disminución de la concentración de oxígeno reduce las posibilidades de colonización del suelo por microorganismos capaces de consumir este contaminante (Hanson *et al.*, 1997).
- AP (*Adsorbed Phase*) : el contaminante es superficialmente adsorbido a las partículas del suelo y queda difícilmente disponible para los microorganismos.
- DP (*Dissolved Phase*) : el contaminante se encuentra disuelto en la fase acuosa del suelo según un equilibrio, donde es accesible para los microorganismos (Harris, 1997).
- NAPL (*Non-Aqueous-Phase Liquid*) : el contaminante líquido en fase no acuosa forma gotas o películas sobre las partículas del suelo. Esta fase es característica de los hidrocarburos (Stelmack ; Gray ; Pickard, 1998).

## **I.2. EL PETRÓLEO Y SUS HIDROCARBUROS**

El petróleo es un combustible natural compuesto de varios tipos de hidrocarburos, es decir, de moléculas que contienen básicamente, carbono e hidrógeno. Estas moléculas pueden estar formadas de cadenas de átomos de carbono largas o cortas y que pueden adoptar diferentes estructuras. Los hidrocarburos del petróleo pueden dividirse en cuatro categorías de compuestos :

- I. Los saturados : los alcanos como el hexano, el octano, el decano, el hexadecano, los isoalcanos y los cicloalcanos como el ciclohexano.
- II. Los aromáticos : benceno, tolueno, xileno y naftaleno agrupados también bajo la apelación BTEX y los poliaromáticos o PAHs (Rittman, 1994).
- III. Las resinas : sólidos polares amorfos disueltos que contienen nitrógeno, azufre y oxígeno.
- IV. Los asfaltenos : grandes moléculas polares coloidales sin disolver que son más resistentes a la biodegradación (Balba ; Al-Awadhi ; Al-Daher, 1998).

En términos generales, de un 70 a un 97% de los hidrocarburos del petróleo es degradable (la fracción de hidrocarburos saturados y aromáticos) y el resto representa los asfaltenos y las resinas esencialmente inertes (Prince *et al.*, 1999).

Cada una de las categorías agrupa compuestos con características de solubilidad, volatilidad y toxicidad propias. Desde un punto de vista de biodegradabilidad, los hidrocarburos pueden ordenarse de mayor a menor biodegradabilidad en: alcanos lineales > alcanos ramificados > aromáticos ligeros > alcanos cíclicos > aromáticos pesados > compuestos polares (Olson, et al., 1999 ; Harris, 1997).

Los alcanos son moléculas químicamente muy estables en las que el esqueleto carbonado se encuentra saturado de hidrógeno. Presentan estructuras lineales, ramificadas o cíclicas. Los ramificados conforman la mayor parte del petróleo ; en caso de una contaminación con petróleo, son degradados más lentamente y después de haberse degradado los lineales (Rittman, 1994). Los de cadena corta son más tóxicos que los de cadena larga, siendo estos últimos más hidrofóbicos (Balba ; Al-Awadhi ; Al-Daher, 1998). El hexadecano, un alcano de 16 átomos de carbono, es un sustrato selectivo ideal para aislar microorganismos capaces de degradar los alcanos (Wrenn ; Venosa, 1996).

En la segunda categoría se encuentran los compuestos aromáticos y poliaromáticos caracterizados por sus productos de degradación intermediarios muy contaminantes y cancerígenos, estos compuestos son más solubles que otros hidrocarburos y contaminan en general las aguas subterráneas (Burland ; Edwards, 1998). Por esta razón, la USEPA los ha clasificado como contaminantes a tratar con prioridad. Están conformados por tres o más núcleos bencénicos, eventualmente asociados con cadenas carbonadas lineales. Se acumulan en el ambiente debido a su estabilidad química, su baja solubilidad en el agua y su fuerte adsorción a las partículas del suelo (Pothuluri ; Cerniglia, 1998).

El diesel y los otros combustibles son mezclas de hidrocarburos saturados, aromáticos (33% m/m), poliaromáticos (8 % p/p) y azufre (400 ppm) (Olson *et al.*, 1999). Según las particularidades de cada composición, la gasolina es menos biodegradable que el diesel o el queroseno ; ~~estos últimos contienen una mayoría de hidrocarburos de cadena larga mientras que la primera contiene en general hidrocarburos de cadena corta (Harris, 1997). Sin embargo, las nuevas gasolinas producidas mediante tecnologías modernas son más biodegradables que el diesel ; las investigaciones se enfocan en reducir la cantidad de compuestos tóxicos contenidos en la gasolina (Speidel ; Lightner ; Ahmed, 2000).~~

Eliminado:

### **I.3. TRATAMIENTOS FÍSICOS, QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS**

Desde un punto de vista económico, la descontaminación inmediata de zonas afectadas implica el desplazamiento y la paralización de las actividades ejecutadas sobre el terreno contaminado. Esto suma al desastre ecológico un costo adicional

para la comunidad, debido al incidente financiero y social generado por la contaminación (Harris, 1997).

Uno de los factores que limita la eliminación de los hidrocarburos contaminantes es la transferencia de masa. Los tratamientos de limpieza del suelo utilizan usualmente métodos que permitan el arrastre de los hidrocarburos pero deben vencer para ello, las fuerzas de adsorción sobre las partículas del suelo por modificación de temperatura, de las interacciones químicas (extracción, emulsificación) o de la tensión de vapor. En el caso de la contaminación con hidrocarburos, se proponen tratamientos físicos, químicos y biológicos que pueden ser utilizados en complementariedad (Thomassin-Lacroix *et al.*, 2002).

### I.3.a. Tratamientos físicos

Los tratamientos físicos recurren a técnicas que modifican o utilizan los parámetros físicos, como la temperatura o la presión, para descontaminar el suelo. Cuando el contaminante es recuperado, es tratado con el fin de disminuir el peligro que representa. En el marco de una contaminación con hidrocarburos, existen diferentes alternativas (Troquet ; Troquet, 2003) :

- La contención : es posible confinar o controlar el volumen de la contaminación con materiales impermeables o agregando solidificantes como el cemento, cenizas de silicio o calcio o polímeros orgánicos. Esta alternativa no descontamina pero aísla la contaminación y evita su expansión.
- Bombeo (*skimming, pump and treat*) : cuando los hidrocarburos alcanzan las napas freáticas y forman sobre el agua un sobrenadante insoluble, se construye un pozo hasta el lugar de la contaminación. Esta es absorbida a lo largo del pozo por bombeo con el fin de separarla de la napa y del suelo. En algunos casos, esta contaminación es fácilmente separada del medio pero en otros, la separación es imposible de realizar y debe de bombearse y tratarse todo el contenido de la napa freática.
- Extracción bajo vacío (*venting*) : en el caso de los hidrocarburos volátiles, provocar una depresión en el suelo permite aspirar los hidrocarburos, adsorberlos a un soporte o en un recipiente para gases y transformarlos por oxidación térmica o catalítica.
- Inyección de aire (*air sparging*) : para numerosos hidrocarburos es útil inyectar aire hacia el fondo de las napas de manera que el aire arrastre los contaminantes cuando asciende a través del agua y del suelo.
- Procedimiento eléctrico : en los suelos con una tasa de humedad mínima de 14 a 18 % es posible hacer migrar los contaminantes cargados utilizando campos eléctricos.
- Desorción térmica : el suelo contaminado deber ser excavado y colocado a 600 - 800 °C con el fin de desorber su agua y sus contaminantes. Esto implica el desplazamiento del suelo y constituye un tratamiento honeroso.
- Incineración : el suelo contaminado se coloca a 1000 - 1100 °C y el gas y las cenizas restantes se tratan posteriormente. Por su aplicabilidad y su costo, es una de las técnicas más utilizadas.
- Vitricación : electrodos de carbono se colocan en el suelo y generan temperaturas de 1500-1600 °C de modo que el suelo y su contenido se derritan y vitrifiquen.

Eliminado:

### I.3.b. Tratamientos químicos

Los tratamientos químicos destruyen o transforman los contaminantes por reacción química, es decir, las técnicas necesitan un compuesto químico que es agregado al

suelo para reaccionar con el contaminante. A veces este reactivo puede constituir un nuevo contaminante en caso de que sea demasiado recalcitrante o que se haya agregado en cantidades excesivas. En el caso de los hidrocarburos, es por lo general necesario agregar un emulsificante sintético que facilita el acceso a las moléculas hidrófobas de hidrocarburo pero también existen otros métodos (Troquet ; Troquet, 2003) :

- Inmovilización química y quelación : algunos contaminantes pueden estabilizarse formando un complejo con otras sustancias. Estas sustancias se aplican sobre el suelo por inundación o nebulización y estabilizan los contaminantes. De esta manera, es más fácil extraerlos y tratarlos pero en general las sustancias estabilizantes utilizadas son también contaminantes.
- Extracción con fluidos supercríticos : algunos gases como el gas carbónico, el propano y el butano, licuados a temperatura y presión críticas son inyectados al suelo de manera que ocupen todo el espacio de este. Cuando recuperan su estado gaseoso se volatilizan arrastrando los contaminantes.
- Oxidación química : fuertes oxidantes como el peróxido de hidrógeno y el dióxido de cloro, se incorporan al suelo para que oxiden los contaminantes y disminuyan su toxicidad.

### **I.3.c. Tratamientos biológicos**

Los tratamientos biológicos representan usualmente la mejor alternativa. Además de no implicar los costos de equipos, materiales, productos y maquinaria necesarios para los tratamientos físicos y químicos, pueden aplicarse sobre el sitio mismo de la contaminación, sin exigir el desplazamiento de los suelos contaminados. El tratamiento biológico de descontaminación recibe también el nombre de biorremediación.

La biorremediación constituye el nuevo medicamento contra el malestar ecológico del ambiente (Samanta ; Singh ; Jain, 2002). Consiste en promover la conversión de compuestos contaminantes en energía, masa celular y en productos biológicos inofensivos. Esta conversión es efectuada por organismos vivos que presentan funciones catabólicas que permiten el consumo de los contaminantes (Rahman *et al.*, 2001).

Los hidrocarburos provenientes de los productos petroleros pueden funcionar como fuente de carbono y de energía para el crecimiento de diferentes microorganismos que pueden de este modo, colonizar los sitios contaminados y degradar el agente contaminante (Thomassin-Lacroix *et al.*, 2002).

Según si el tratamiento biorremediativo se efectúe directamente sobre el sitio contaminado o en otro sitio después de haber excavado los suelos contaminados, se hablará respectivamente de una biorremediación *in situ* o una *ex situ*. Considerando

que el desplazamiento del suelo contaminado puede desequilibrar la capacidad autorremediante de los ecosistemas, se recomienda por lo general la biorremediación *in situ*, considerada también como el tratamiento menos invasor (Harris, 1997). Puede llevarse a cabo bajo tres formas :

- La bioatenuación : seguimiento (monitoreo y documentación) de la degradación natural por la flora y fauna endógenas al sitio contaminado (Harris, 1997).
- La bioestimulación : estimulación de las micropoblaciones nativas por adición de nutrientes esenciales para su actividad metabólica (principalmente una fertilización inorgánica a base de nitrógeno, fósforo y minerales u orgánica a base de compost) (Swannell *et al.*, 1999).
- La bioaumentación : aporte de biomasa exógena especializada para la degradación de los contaminantes (Balba ; Al-Awadhi ; Al-Daher, 1998).

La bioatenuación es la más favorable de las biorremediaciones visto que deja la recuperación del equilibrio natural en manos de las poblaciones autóctonas. Sin embargo, la persistencia de algunos compuestos tóxicos en el ambiente permite suponer que la diversidad metabólica natural de los microorganismos autóctonos no resulta suficiente para proteger al suelo de algunas contaminaciones (antropogénicas) y el ser humano debe entonces intervenir (Pieper ; Reineke, 2000).

La biorremediación *in situ* presenta las ventajas siguientes :

- Es utilizable en el lugar mismo de la contaminación sin causar perturbaciones irreversibles en los alrededores ; favorece la entera destrucción de la contaminación sin causar perturbaciones colaterales.
- Elimina las contaminaciones antes consideradas recalcitrantes (poco biodegradables).
- Se adapta a la heterogeneidad de la contaminación, a sus importantes concentraciones así como a la variabilidad de las condiciones ambientales durante la aplicación del tratamiento (Timmis ; Pieper, 1999).

La biorremediación *ex situ*, por otro lado, permite supervisar la degradación del contaminante por los microorganismos bajo condiciones óptimas controladas. Todos los parámetros de descomposición son examinadas con el fin de obtener un estudio completo de cada caso de contaminación y poder dirigir con él, la biorremediación en el sitio (Harris, 1997).

#### **I.4. LOS MICROORGANISMOS QUE DEGRADAN LOS HIDROCARBUROS**

Los microorganismos se adaptan o desarrollan su metabolismo en función de los parámetros físico-químicos (pH, temperatura, humedad) así como de los compuestos químicos que se encuentran en su ambiente inmediato. El petróleo y los

hidrocarburos se encuentran naturalmente presentes en el suelo, lo que ha permitido a muchos microorganismos acostumbrarse a su presencia y utilizarlos para sobrevivir. En el caso de los hidrocarburos, las bacterias gram negativas parecen encontrarse más adaptadas a estas fuentes de carbono (Venosa *et al.*, 1999).

Diversos estudios permiten hoy en día establecer una lista de 160 géneros de microorganismos que degradan los hidrocarburos (Prince *et al.*, 1999), los consorcios más empleados contienen las especies *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter* y en menos ocasiones *Mycobacterium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhodotorula* y *Candida*. Las bacterias son más empleadas que los hongos y las levaduras (Balba ; Al-Adawadhi ; Al-Daher, 1998 ; Vasudevan ; Rajaram, 2001 ; Rahman *et al.*, 2001).

Es importante estudiar qué poblaciones existen en el suelo contaminado ya que estas probablemente ya se habrán adaptado al ambiente contaminado (Hanson *et al.*, 1997). Las poblaciones nativas pueden ser sensibles a la presencia y la actividad de poblaciones extranjeras especializadas. Estas poblaciones, visto las diferencias metabólicas, producen en algunos casos metabolitos e intermediarios tóxicos para la microflora nativa. Muchas veces también, estas poblaciones agregadas no se adaptan a las condiciones del sitio contaminado y debido a ello, no realizan la descontaminación con la misma eficiencia con la que lo hacen las poblaciones nativas (Thomassin-Lacroix *et al.*, 2002).

El suelo es un medio complejo orgánico y/o mineral en el que muchas condiciones determinan la variabilidad de la microflora (Madigan ; Martinko ; Parker, 1998). La biodegradación de los hidrocarburos se realiza de preferencia a una temperatura entre 15 y 30°C. Visto la complejidad del suelo, deben controlarse también el pH, los nutrientes, la disponibilidad de oxígeno y del contaminante (Thomassin-Lacroix *et al.*, 2002).

La biodisponibilidad de los hidrocarburos es esencial para su descomposición. La adición de agentes de superficie (surfactantes o emulsificantes) permite mejorar esta disponibilidad (Harris, 1997). Cuando los microorganismos producen sus propios surfactantes (biosurfactantes o bioemulsificantes), en general, al principio de la fase estacionaria de crecimiento (Ron ; Rosenberg, 2002), se recomienda no agregar emulsificantes sintéticos debido a que sus efectos sobre la actividad microbiana aún no son claros (Stelmack ; Gray ; Pickard, 1998).

#### **I.4.a. *Acinetobacter sp.* y *Pseudomonas putida***

Las bacterias representan los microorganismos más numerosos en el suelo. Entre ellas, *Acinetobacter* y *Pseudomonas* presentan un gran interés para la biodegradación de xenobióticos (Davids ; Flemming ; Wilderer, 1998). Su actividad de



biodegradación es complementaria puesto que la degradación de los aromáticos por *Pseudomonas* depende en algunos casos de los metabolitos producidos por la degradación de los alcanos por *Acinetobacter* (Komukai-Nakamura, *et al.*, 1996). *Acinetobacter* es considerado como el componente ideal de los consorcios de degradación de los hidrocarburos debido a que descompone un gran número de alcanos además de producir un bioemulsificante que facilita el acceso a los hidrocarburos para las demás cepas del consorcio (Ron ; Rosenberg, 2002).

*Pseudomonas* es un bacilo gram negativo aeróbico que existe en el suelo pero también en el agua dulce y salada. Este género consume todo tipo de sustratos orgánicos como los azúcares y aminoácidos, alcoholes, hidrocarburos, ácidos húmicos e inclusive algunos plaguicidas sintéticos (Davids ; Flemming ; Wilderer, 1998). Los biosurfactantes de bajo peso molecular, como el ramnolípido, el lípido de trehalosa y el lípido sofórico producidos por algunas cepas, están compuestos por carbohidratos asociados con ácidos alifáticos de largas cadenas o lipopéptidos (Ron ; Rosenberg, 2002).

*Acinetobacter* es un cocobacilo gram negativo aeróbico resistente a la ampicilina. Se encuentra en el agua, el suelo y sobre la piel humana. Forma parte del grupo de organismos que alteran la carne fresca, las aves y el pescado (Madigan ; Martinko ; Parker, 1999). Su capacidad para consumir los hidrocarburos se ve relacionada con el hecho de que produce un biosurfactante o bioemulsificante (Marín ; Pedregosa ; Laborda, 1996). Este emulsificante de importante peso molecular está constituido por polisacáridos, proteínas, lipopolisacáridos y lipoproteínas (Ron ; Rosenberg, 2002).

#### **I.4.b. Microorganismos Genéticamente Modificados (MGM)**

Estudios genéticos han demostrado que los genes que codifican para las enzimas responsables de la metabolización de los hidrocarburos contaminantes se encuentran generalmente en el ADN plasmídico de la bacteria. Por ejemplo, las enzimas responsables de la conversión de los alcanos en acetyl-CoA son codificadas por genes llamados *Alk* que se encuentran sobre los plásmidos de la cepa *Acinetobacter sp.* ADP1. Estos genes portan el código de enzimas diferentes según la especie en la que se encuentran (Ratajczak ; Geißdörfer ; Hillen, 1998). Este ADN puede transferirse de un organismo a otro taxonómicamente cercano por transformación. De esta manera natural se construyen poblaciones dotadas de las enzimas necesarias para la degradación del contaminante (Harris, 1997). Si bien la frecuencia de transferencia natural del material genético entre dos especies bacterianas es débil, (Nielsen ; Smalla ; Van Elsas, 1999), las barreras pueden vencerse en laboratorio con la producción de Microorganismos Genéticamente Modificados (MGM).

Como los microorganismos producen las enzimas según las condiciones de los alrededores y son capaces de intercambiar naturalmente este material genético, se recomienda aislar aquellos que sobreviven en el medio contaminado antes de

transformar genéticamente microorganismos para volverlos más especializados pero seguramente menos adaptados (Prince *et al.*, 1999).

Los MGM en biorremediación presentan un gran inconveniente en comparación con los microorganismos naturales: la inestabilidad plasmídica no garantiza un mantenimiento de los genes clonados en ausencia de contaminación como presión de selección (Pieper ; Reineke, 2000). Su utilización para la degradación de los hidrocarburos no ha sido aún profundizada y levanta muchas veces un debate ético importante desde el punto de vista de la bioseguridad relativa a la utilización de los MGM en el ambiente (O'Gara, 2002).

Además, las actividades microbianas naturales son y han sido siempre el punto de partida para todas las aplicaciones de la biotecnología. Contrariamente a otros casos de contaminación con productos xenobióticos, la contaminación con hidrocarburos quizá no merezca todavía la intervención de MGM concebidos en laboratorio puesto que los microorganismos naturales que presentan potencial para degradar los contaminantes existen probablemente en suficiencia (Pieper ; Reineke, 2000).

#### I. 4.c. Biodisponibilidad del agente contaminante : Surfactantes naturales y sintéticos

La bioacumulación de un agente contaminante en el suelo se ve directamente relacionada con el carácter hidrófilo o hidrófobo (es decir, lipofóbico o lipofílico) de su estructura química. Entre más soluble es en el agua más tóxico es, mientras que un carácter lipofílico permite su acumulación y consecuentemente, su longevidad (De Brouwer, 2002).

Los detergentes naturales o sintéticos emulsifican los hidrocarburos para incrementar su dispersión ; las cadenas carbonadas hidrófobas exponen hacia el exterior funciones hidrófilas que facilitan el contacto entre la contaminación y los microorganismos que degradan esta última (Pennel ; Abriola, 1998). Los bioemulsificantes son en general glicolípidos (con grupos hidrófobos e hidrófilos) de importante masa molecular que envuelven las moléculas de hidrocarburos y modifican su orientación molecular de manera que sean menos adsorbables por las partículas del suelo, y por lo tanto más accesibles para los microorganismos. De esta manera, estos logran incorporarse a la interfase donde el oxígeno y las demás condiciones son favorables para la actividad de degradación realizada por las poblaciones microbianas (Abdel-El-Haleem, 2003).

Observaciones al microscopio han mostrado que *Acinetobacter* construye capas membranosas amorfas sobre los sustratos hidrófobos para poder establecer un contacto con estos últimos. Después del contacto, sucede un reconocimiento seguido por una oxidación y transformación del hidrocarburo para prepararlo para las rutas metabólicas de la célula (Marín ; Pedregosa ; Laborda, 1996). Los microorganismos

productores de emulsificantes lo utilizan para controlar las propiedades de su superficie con el fin de anclarse a o liberarse de un sustrato determinado. La carencia de nutrientes estimula muchas veces a las bacterias para que liberen emulsificantes y aumenten las probabilidades de encontrar un sustrato adecuado para las necesidades de crecimiento (Ron ; Rosenberg, 2002).

La mayoría de las cepas que consumen hidrocarburos secretan un bioemulsificante, cuando esta secreción es inexistente, emulsificantes artificiales pueden ser añadidos al sitio. Algunos ejemplos de estos emulsificantes son los detergentes aniónicos como el Dodecil Sulfato de Sodio (SDS), catiónicos como el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), no-iónicos como el Tritón X-100 y los ramnolípidos. Por razones aún desconocidas, algunos de estos emulsificantes sintéticos inhiben el crecimiento e impiden la biodegradación (Hanson *et al.*, 1996). Se recomienda utilizar bioemulsificantes en lugar de surfactantes químicos debido a que los primeros son más selectivos, menos estables y por lo tanto más compatibles desde un punto de vista ambiental (Ron ; Rosenberg, 2002).

## **I.5. EL METABOLISMO DE LOS HIDROCARBUROS**

Dado que *Acinetobacter* y *Pseudomonas* utilizadas a lo largo de este trabajo son bacterias aeróbicas, únicamente serán consideradas las rutas aeróbicas de metabolización de los hidrocarburos. Para que un hidrocarburo sea reconocido por un microorganismo como sustrato utilizable por este mismo, los receptores localizados sobre la membrana celular deben reconocer algunos grupos químicos con el fin de adsorber las moléculas. Cuando un hidrocarburo es demasiado soluble, penetra la membrana, la vuelve inestable y provoca una lisis celular. Por esta razón es que muchos compuestos solubles son considerados tóxicos para las bacterias (Pieper ; Reineke, 2000).

Por otro lado, los compuestos no tóxicos son transportados selectivamente (reconocimiento bioquímico) hacia el citoplasma de la bacteria y toman diferentes rutas de metabolización. Pasando por varias etapas, el compuesto puede ser parcial o completamente degradado o mineralizado. La mineralización implica la transformación total del reactivo en agua y dióxido de carbono (Harris, 1997).

La metabolización de compuestos tóxicos puede dividirse en dos fases donde la polaridad del compuesto, y por lo tanto su solubilidad y su toxicidad, serán modificadas :

1. Funcionalización : la polaridad del compuesto va aumentar por una oxidación, reducción o hidroxilación de manera que pueda sufrir otras transformaciones.
2. Conjugación : por asociación con un molécula polar, la polaridad del contaminante se ve acentuada de manera que el compuesto se desintoxique y que disminuyan las posibilidades de bioacumulación (De Brouwer, 2002).

Según las estructuras particulares de los hidrocarburos, diferentes enzimas se encargan de su digestión y biodegradación; existen varias rutas enzimáticas. Los hidrocarburos alifáticos de tipo alcano lineal son oxidados en ácidos grasos catabolizados por  $\beta$ -oxidación (Rittman, 1994). La figura 2 presenta estas reacciones bioquímicas:

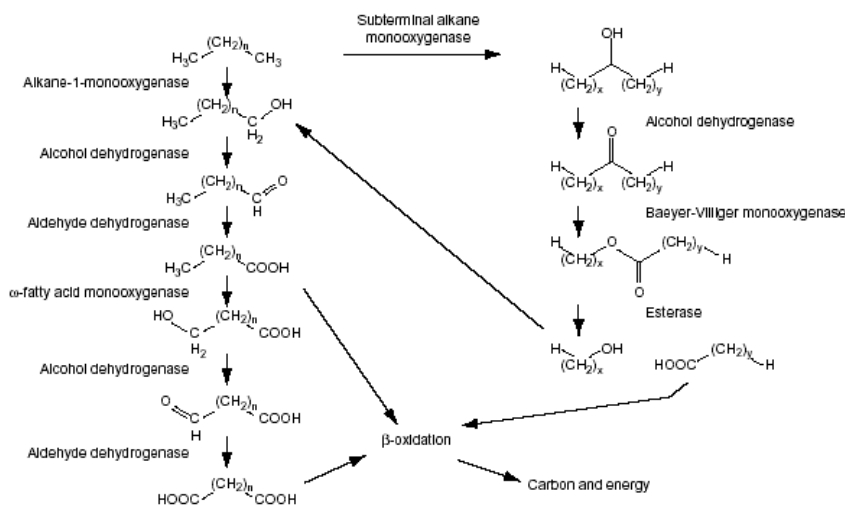


Fig. 2: Rutas de degradación de los alcanos por oxidación del grupo metil terminal, subterminal y biterminal (van Beilen, *et al.*, 2003).

La hidroxilasa, también llamada monooxygenasa, transfiere un solo átomo de la molécula de oxígeno y transforma el alcano en alcohol primario oxidando al grupo metil terminal. Las deshidrogenasas se encargan de los compuestos siguientes para obtener un ácido graso que pueda ser oxidado de manera que el microorganismos obtenga energía por medio del ciclo de Krebs y oxalato para fabricar materiales celulares nuevos (figura 3) (Rittman, 1994).

Puede ocurrir también que los microorganismos degraden los hidrocarburos mediante una oxidación del grupo metil subterminal para producir un alcohol secundario en vez del alcohol primario producido por la oxidación del grupo metil terminal. Esta oxidación es realizada por lo general por aquellas cepas que co-oxidan los alcanos durante su crecimiento sobre otros sustratos por co-metabolismo. La importancia de los consorcios es clave visto que varias cepas diferentes son necesarias para descomponer cada producto intermedio (Franzmann *et al.*, 2002).

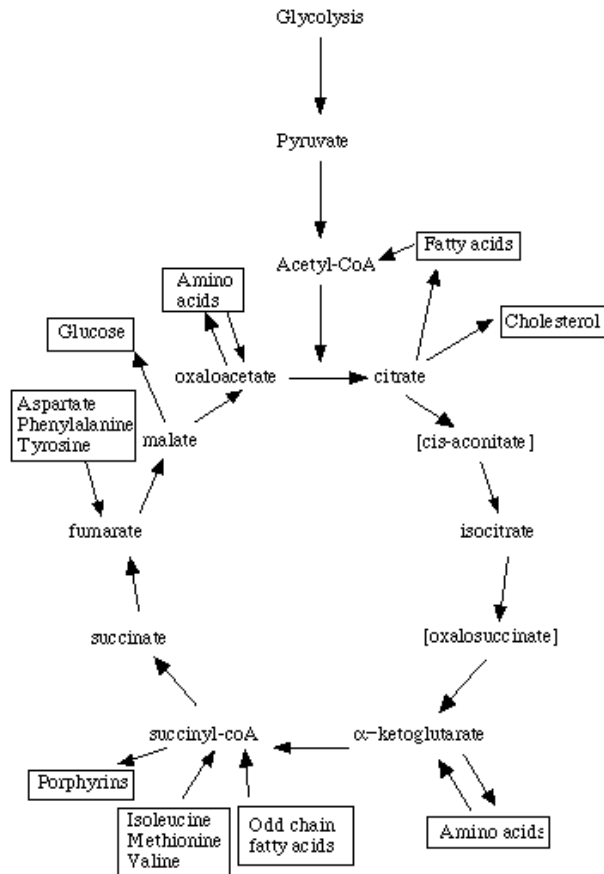


Fig. 3 : Transformación de un ácido graso en el Ciclo de Krebs (Caprette, 2000)

Los alcanos ramificados son sustratos muy pobres pero constituyen una gran parte del petróleo y de sus productos refinados. Su oxidación comienza por una hidroxilación y deshidrogenaciones sucesivas. La estructura ramificada no permite obtener una oxidación eficiente de los ácidos producidos por lo cual pocos microorganismos los logran utilizar como única fuente de carbono y energía.

Los hidrocarburos alicíclicos son más difíciles de degradar puesto que las enzimas responsables de su metabolización son más especializadas y por entonces, raras. Los consorcios, como en el caso de los alcanos ramificados, constituyen la mejor opción de degradación debido a que cada especie interviene a un nivel diferente de desintoxicación del contaminante (Aitken, 1998). Por ejemplo, *Nocardia sp.* y *Pseudomonas sp.* logran degradar juntas (por la actividad de sus monooxigenasas particulares) al ciclohexano (Rittman, 1994).

En el caso de los hidrocarburos aromáticos, la degradación del benceno es similar a la de los otros aromáticos. El benceno es digerido por las dioxigenasas que provocan la ruptura del núcleo por hidroxilación de manera que la molécula sea químicamente más accesible. Esta reacción se presenta en la figura 4 (Rittman, 1994).

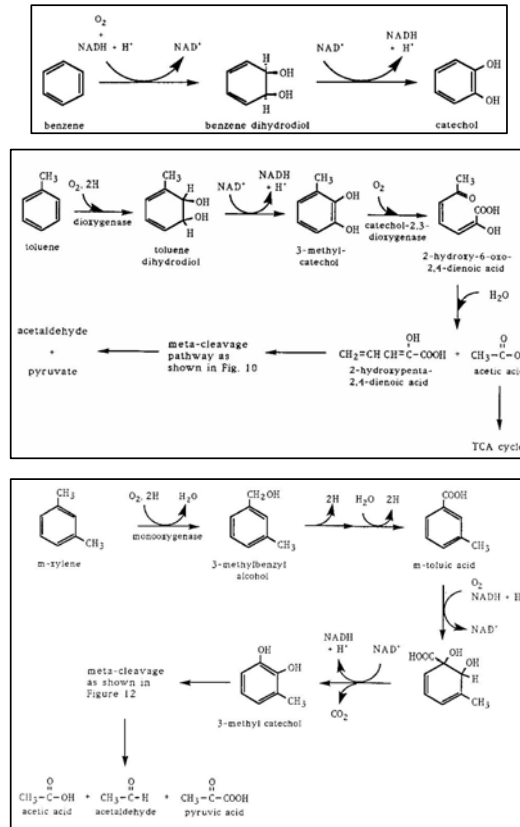


Fig. 4: Reacción de degradación del benceno, del tolueno y del xileno (Rittman, 1994).

### I.5.a. Parámetros indicadores de la metabolización de los hidrocarburos

Como lo indican las figuras anteriores, la oxidación de los hidrocarburos produce ácidos grasos que son utilizados por las bacterias o liberadas en el medio. Si este es el caso, el pH del medio disminuye. Esta acidificación se emplea como parámetro para evaluar la degradación, junto con :

- El incremento de la población microbiana a lo largo del tiempo es el resultado del consumo de los hidrocarburos como fuente de carbono y energía. Este

aumento de población puede visualizarse al medir la turbidez del medio (la densidad óptica), la evolución de la materia seca y la viabilidad (UFC/ml) en el tiempo.

- La disminución de la concentración de hidrocarburo en el medio puede ser un segundo indicador de la degradación. Si la población logra utilizar el contaminante como fuente de carbono, la concentración del mismo debe disminuir con el tiempo y ser reemplazado en el medio por nuevos metabolitos. La determinación de la concentración puede hacerse por métodos analíticos (cromatografía, absorción IR) o de Immunoassay (kit enzimáticos).
- La evolución de la Demanda Bioquímica de Oxígeno puede también constituir un indicador de la actividad de degradación que realizan los microorganismos sobre las fuentes de carbono empleando al oxígeno como aceptor de electrones. Una prueba respirométrica puede llevarse a cabo sobre un suelo contaminado en presencia de microorganismos (Balba *et al.*, 1998).

## **II. REVISIÓN DE LITERATURA**



## II.1. LA BIODEGRADACIÓN DE LOS HIDROCARBUROS

Los hidrocarburos presentan la particularidad de adsorberse rápida y fuertemente a las partículas del suelo. Esta peculiaridad junto con la gran variedad de hidrocarburos hace necesario concebir consorcios bacterianos que logran trabajar juntos para la descomposición natural de los contaminantes. Rahman *et al.* (2001) mostraron que la degradación de la gasolina alcanza un nivel óptimo al combinar apropiadamente los microorganismos, nutrientes inorgánicos y orgánicos y surfactantes, el todo asociado con buenas condiciones de oxigenación.

Hace diez años, el tolueno y otros compuestos volátiles se consideraban como muy poco tolerados por las cepas de *Pseudomonas*, *Achromobacter* y *Nocardia* disponibles en ese momento ; para el benceno, ninguna cepa tolerante se conocía aún (Moriya ; Horikoshi, 1993). Desde entonces, muchos estudios han demostrado que los compuestos volátiles son metabolizados por algunas cepas en medio anaerobio, relacionado con las reducciones de nitratos, sulfatos, hierro, óxido de manganeso y con la producción de metano. Diferentes alternativas de aceptores de electrones como el fumarato, el humus y las quinonas han sido igualmente propuestas (Burland ; Edwards, 1998 ; Cervantes *et al.*, 2001 ; Franzmann *et al.*, 2002).

En medio aerobio, métodos paralelos como la condensación, la absorción sobre carbono activado y la oxidación térmica se aplican para captar y degradar los hidrocarburos volátiles (Li *et al.*, 2001). Estos métodos aprovechan que los microorganismos que se encuentran inmovilizados sobre algunas superficies ideales bajo forma de *biofilms*, se encuentran menos expuestos a la toxicidad de los compuestos volátiles y soportan concentraciones mayores del agente contaminante (Franzmann *et al.*, 2002).

Existe una diferencia entre las tasas de degradación de los contaminantes en estado puro y aquellos que forman parte de una mezcla de hidrocarburos, como en el caso del diesel y la gasolina (Greene *et al.*, 2000). Algunas pruebas han permitido verificar que mezclados, el tolueno es degradado antes que el benceno (fenómeno llamado *preferential biodegradation*) (Franzmann *et al.*, 2002). Para una degradación más rápida y completa es preferible degradarlos a partir de su forma pura antes que en presencia de otros hidrocarburos (Greene *et al.*, 2000).

La baja solubilidad de los hidrocarburos en medio acuoso necesita la acción de surfactantes para incrementar su biodisponibilidad y su metabolización por los microorganismos (Harris, 1997). Como el efecto de los emulsificantes químicos sobre las bacterias y la dispersión de los hidrocarburos no está muy claro, es preferible trabajar con cepas que producen un bioemulsificante a la vez que degradan los hidrocarburos. Ha sido comprobado por varios autores que los surfactantes de origen químico pueden provocar una inhibición del crecimiento de los microorganismos y una disminución del rendimiento de la biodegradación. Su fuerte actividad tensoactiva disminuye la estabilidad de las membranas celulares y produce una lisis

celular. Sin embargo, los biosurfactantes producidos por los microorganismos degradadores no son tóxicos para estos (Lepo *et al.*, 2001).

Debe también considerarse el problema de la concentración residual de los contaminantes después de su degradación. Este residuo permanece sin importar el tratamiento aplicado pero debe ser minimizado. Por esto, Nocentini, Pinelli y Fava (2000) recomiendan los consorcios bacterianos en vez de los cultivos puros. Juntas, varias bacterias pueden degradar varios hidrocarburos del diesel o del petróleo hasta obtener un residuo mínimo.

## **II.2. BIOAUMENTACIÓN CON *Acinetobacter sp.* Y *Pseudomonas putida***

Visto que son originarias del suelo, que degradan respectivamente alcanos y compuestos aromáticos y que producen sus propios surfactantes, *Acinetobacter sp.* y *Pseudomonas putida* son excelentes candidatas para la constitución de consorcios bacterianos especializados en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos (Komukai-Nakamura, 1996).

La utilización de los alcanos de largas cadenas por *Acinetobacter sp.* fue estudiada en la Facultad de Agricultura de la Universidad de Kyoto. Los resultados muestran que la cepa M-1 aislada de una muestra de suelo, crecía utilizando varios hidrocarburos (C<sub>13</sub>-C<sub>44</sub>) como única fuente de carbono (Sakai *et al.*, 1994). En 1997, Hanson *et al.* obtuvieron un 60% de consumo de los BHCO (Bombay High Crude Oils) por la cepa A-3 de *Acinetobacter sp.* en erlenmeyers agitados. Un diez por ciento adicional del BHCO es eliminado por evaporación o reacciones foto- y geo-químicas (Komukai-Nakamura, 1996).

Las fracciones volátiles (compuestos de en general menos de 12 átomos de carbono y que presentan una presión de vapor superior a 0,0007 atm) como el tolueno (que conforma de un 5 a un 7% de la gasolina (Cervantes *et al.*, 2001)), el xileno y el benceno desaparecen por evaporación y terminan en el aire. Es fundamental trabajar con cepas capaces de metabolizar rápidamente los compuestos volátiles antes de que estos escapen y formen el *smog* (Li *et al.*, 2001). *Pseudomonas putida* presenta las dioxigenasas necesarias para la degradación de estos compuestos aromáticos y puede de este modo trabajar en complementariedad con *Acinetobacter sp.* en la degradación del diesel y otras mezclas de hidrocarburos (Samanta ; Singh ; Jain, 2002).

El Marine Biotechnology Institut de Japón obtuvo pruebas sobre la actividad complementaria entre *Acinetobacter sp.* y *Pseudomonas putida* para la degradación de las fracciones de alcanos y aromáticos del Arabian Light Crude Oil (ALCO). *Acinetobacter sp.* consumiría los alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>) y los alquilbencenos de largas cadenas laterales y liberaría los productos de la  $\beta$ -oxidación (8-feniloctanoato, 6-fenilhexanoato y 4-fenilbutirato) en el medio ; estos últimos servirían de co-sustratos

para *P. putida* para que pueda consumir, a su vez, el benceno y los alquilbencenos de cadenas laterales cortas del ALCO (Komukai-Nakamura *et al.*, 1996).

### **II.3. RESULTADOS DE UNA BIOESTIMULACION CON NUTRIENTES INORGANICOS Y ORGANICOS**

Los hidrocarburos deben presentar una dispersión óptima de manera que su emulsión sea facilitada y se garantice su descomposición (Prince *et al.*, 1999). Si se agregan nutrientes, es importante verificar que no favorezcan únicamente el crecimiento de los microorganismos sino también la degradación del contaminante. Vasudevan y Rajaram (2001) observaron que el compost agregado sobre un suelo contaminado con hidrocarburos, por ejemplo, no mejora la degradación de estos últimos sino que únicamente aumenta el crecimiento de los microorganismos.

En la Universidad de Alcalá de Henares se aisló la cepa MM5 de *Acinetobacter calcoaceticus* y demostró que esta producía un surfactante que permitía su adhesión a los hidrocarburos del petróleo y a los compuestos alifáticos y aromáticos puros. No se recomienda por lo tanto agregar agentes de superficie sino elementos que estimulen la producción del surfactante natural para garantizar el correcto desarrollo de los procedimientos específicos de interacción de las células, la colonización de sustratos, su oxidación y transformación (Marín ; Pedregosa ; Laborda, 1996).

En 1996, la Facultad de Ciencias de la Universidad de Baroda preconiza una adición de fuentes de nitrógeno y fósforo. Cuando existe una contaminación con hidrocarburos, la proporción entre las concentraciones de carbono, nitrógeno y fósforo sufre por lo general un desequilibrio. Puede ser interesante agregar los elementos faltantes con el fin de reequilibrar las proporciones naturales (100 C : 10 N : 1 P) por bioaumentación (Ballerini ; Gatellier ; Vogel, 1998).

### **II.4. POTENCIAL DE LA BIORREMEDIACION DE LOS SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS POR *Acinetobacter sp.* Y *Pseudomonas putida*.**

Los suelos contaminados son, por lo general, colonizados por diferentes especies que se adaptaron a las fuentes de energía presentes en el sitio. Para esto, los aislamientos de bacterias realizados sobre muestras de suelos contaminados permiten obtener varias cepas interesantes. Marín *et al.* (1995) aislaron más de 20 cepas bacterianas a partir de una muestra de suelo contaminado con hidrocarburos ; De ellas, 15 degradaban los hidrocarburos puros, en presencia y en ausencia de glucosa ; entre ellas *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Acinetobacter*. El hecho de que ya compartan un ambiente sugiere que han creado relaciones simbióticas para sobrevivir en él.

Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que las bacterias *Acinetobacter sp.* y *Pseudomonas putida* serían excelentes candidatas para el saneamiento de suelos contaminados con hidrocarburos. Queda por verificar, visto las diferencias que existe de una cepa a otra en una misma especie y según las condiciones de crecimiento, si estas bacterias pueden degradar individualmente hidrocarburos puros en fermentadores (reactores) y erlenmeyers agitados en vista de utilizarlas para la biorremediación de los suelos contaminados.

### **III. OBJETIVO**

### III.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los potenciales de las cepas *Acinetobacter sp.* LMG 1056, *Pseudomonas putida* LMG 2257, *P. putida* DSMZ 6414, *P. putida* DSMZ 6899 y *P. putida* ATCC 39213 para la degradación del benceno, el tolueno, el xileno, el ciclohexano, el hexano, el octano, el decano, el hexadecano y el diesel en erlenmeyers agitados, en reactor así como en un suelo y un lodo artificialmente contaminados.

### III.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- III.2.a. Realizar un seguimiento de la degradación de nueve hidrocarburos en fase líquida al :
- III.2.a.i. Determinar el crecimiento de cinco cepas de bacterias en medios de cultivo agitados que contienen hidrocarburos contaminantes a escala de erlenmeyer y reactor mediante la medida de densidad óptica directa e indirecta, la medida de peso seco y por conteo de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro de cultivo (UFC/ml).
  - III.2.a.ii. Evaluar los cambios de pH, pO<sub>2</sub> así como de consumo de ácido y base como indicadores del consumo de los hidrocarburos agregados como única fuente de carbono en los medios de cultivo.
  - III.2.a.iii. Medir el consumo de los hidrocarburos en medio acuoso por método gravimétrico tras una extracción al hexano y por el método 10050 del kit enzimático de Immunoassay para detección de TPH (*Total Petroleum Hydrocarbons*) de la empresa HACH.
- III.2.b. Realizar un seguimiento de la degradación del diesel efectuado por *Acinetobacter sp.* LMG 1056 sobre un suelo contaminado artificialmente con 5000 ppm de diesel mediante la medida de la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO), la evolución de la microbiología y la concentración del diesel en cuatro semanas.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

## IV.1. MATERIAL BIOLÓGICO, MEDIOS DE CULTIVO Y PRECULTIVOS Y PREPARACIÓN DE LOS INÓCULOS

### IV.1.a. Material biológico

Las diferentes cepas utilizadas se obtuvieron de las tres colecciones siguientes :

- **Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent** (Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Gand), Gand, Bélgica : *Acinetobacter sp.* LMG 1056 y *Pseudomonas putida* LMG 2257.
- **Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen** (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares), Braunschweig, Alemania : *Pseudomonas putida* DSMZ 6414 y *P. putida* DSMZ 6899.
- **American Type Culture Collection** (Colección de Cultivos Tipo de los Estados Unidos) Manassas-Virginia, Estados Unidos : *Pseudomonas putida* ATCC 39213.

Todas las cepas se cultivaron inicialmente en 100 ml de medio líquido Luria Bertani (**LB**) líquido en erlenmeyers de 250 ml con agitación durante una noche. El día siguiente, la pureza del cultivo fue verificada al microscopio y el cultivo puro se repartió en pequeños tubos con glicerol al 40% v/v para conservarlo a  $-80^{\circ}\text{C}$  en las refrigeradoras REVCO.

Las cinco cepas fueron cultivadas en medio LB líquido con el fin de realizar un seguimiento de la densidad óptica a 660 nm, del pH y de la viabilidad (UFC/ml) de las cepas en un transcurso de 24 horas. Estos datos permitieron construir una curva de crecimiento para cada cepa y calcular el tiempo de generación ( $g$ ) así como la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de cada una por un método gráfico a partir de la curva semi-logarítmica de la evolución de la densidad óptica en el tiempo.

### IV.1.b. Medios de cultivo (Anexo 1)

Los precultivos y plaqueos se realizaron sobre un medio **LB** compuesto por :

- 10 g/l de triptona (DIFCO)
- 5 g/l de extracto de levadura (MERCK)
- 10 g/l de NaCl (MERCK)
- 15 g/l de agar para la preparación del medio sólido

Las pruebas con hidrocarburos se realizaron sobre medio mineral líquido **MM2** compuesto por :

- 0,1 g/l de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (MERCK)
- 3 g/l de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (MERCK)



- 3 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (*MERCK*)
- 2 g/l de NaCl (*MERCK*)
- 0,2 ml/l de Tween 80 (*SIGMA*)
- 2 g/l de Yeast Nitrogen Base sin aminoácidos ni  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  compuesto por vitaminas, sales y elementos traza (*DIFCO*) :

<b>Vitaminas :</b>	<b>Elementos traza :</b>	<b>Sales :</b>
- 2 µg/l Biotina	- 500 µg/l Ácido Bórico	- 1 g/l Monohidrogenofosfato de Potasio
- 400 µg/l Pantotenato de Calcio	- 40 µg/l Sulfato de Cobre	- 0,5 g/l Sulfato de Magnesio
- 2 µg/l Ácido Fólico	- 100 µg/l Ioduro de Potasio	- 0,1 g/l Cloruro de Sodio
- 2000 µg/l Inositol	- 200 µg/l Cloruro de Hierro	- 0,1 g/l Cloruro de Calcio
- 400 µg/l Niacina	- 400 µg/l Sulfato de Magnesio	
- 200 µg/l Ácido p-Aminobenzoico	- 200 µg/l Molybdato de Sodio	
- 400 µg/l Hidrocloruro de Piridoxina	- 400 µg/l Sulfato de Zinc	
- 200 µg/l Riboflavina		
- 400 µg/l Hidrocloruro de Tiamina		

Los testigos positivos y algunas pruebas de metabolismo en presencia de glucosa se prepararon agregando 2 g/l de una solución al 50% de glucosa estéril al medio **MM2**.

Todos los medios se prepararon con agua desmineralizada y fueron autoclavados durante 20 minutos a 121°C. El medio **LB** presenta un pH neutro desde su preparación pero el medio **MM2** fue neutralizado (pH 7) antes de su esterilización, con una solución de NaOH 2 M.

Los hidrocarburos siguientes fueron agregados al medio MM2 esterilizado con una concentración de 0,5% v/v con el fin de probar la biodegradación realizada por las diferentes cepas :

- **Benceno ( $\text{C}_6\text{H}_6$ ) :**
  - Fabricación : RPL-UCB (Bélgica)
  - Masa Molecular : 78,12 g/mol
  - Densidad : 0,8765 g/ml
  - Temperatura de ebullición : 80,1°C
  - Tensión de Vapor : 0,100 atm
  - Solubilidad en el agua : 0,188 % m/m (à 23,5 °C)
- **Ciclohexano ( $\text{C}_6\text{H}_{12}$ ) :**
  - Fabricación : Merck
  - Masa Molecular : 84,16 g/mol
  - Densidad : 0,7786 g/ml

- Temperatura de ebullición : 80,7 °C <sup>(760)</sup>
- Solubilidad en el agua : 0,0052 % p/p (a 23,5 °C) ; 0,055 g/l
- **Decano (C<sub>10</sub>H<sub>22</sub>)** :
  - Fabricación : Merck-Schuchardt
  - Masa Molecular : 142,29 g/mol
  - Densidad : 0,729-0,731 g/ml
  - Temperatura de ebullición : 174,10 °C
  - Solubilidad en el agua : 5,2 x 10<sup>-5</sup> g/l
- **Diesel**
  - Fabricación : Total Fina Elf (Total, S.A.)
  - Densidad : 0,825 g/ml
  - Temperatura de ebullición : 160 – 370 °C
  - Solubilidad en el agua : 2,6 x 10<sup>-3</sup> g/l
- **Hexadecano (C<sub>16</sub>H<sub>34</sub>)** :
  - Fabricación : Sigma Chemical
  - Masa Molecular : 226,4 g/mol
  - Densidad : 0,7749 - 0,7770 g/ml
  - Temperatura de ebullición : 285 - 287 °C
  - Solubilidad en el agua : 5 x 10<sup>-8</sup> g/l
- **Hexano (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>)** :
  - Fabricación : May & Baker (Inglaterra)
  - Masa Molecular : 86,177 g/mol
  - Densidad : 0,6593 g/ml
  - Temperatura de ebullición : 68,95 °C
  - Solubilidad en el agua : insoluble ; 9,5 x 10<sup>-3</sup> g/l
- **Octano (C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>)** :
  - Fabricación : Riedel-de Haën
  - Masa Molecular : 114,23 g/mol
  - Densidad : 0,7027-0,7040 g/ml
  - Temperatura de ebullición : 125,6 °C
  - Solubilidad en el agua : insoluble ; 6,6 x 10<sup>-4</sup> g/l
- **Tolueno (C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>)** :
  - Fabricación : Merck
  - Masa Molecular : 92,14 g/mol
  - Densidad : 0,8669 g/ml
  - Temperatura de ebullición : 110,6 °C
  - Solubilidad en el agua : 0,067 % p/p (a 23,5 °C) ; 0,515 g/l
- **Xileno (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>)** :
  - Fabricación : RPL-UCB (Bélgica)
  - Masa Molecular : 106,17 g/mol
  - Densidad : 0,860 g/ml
  - Temperatura de ebullición : 139,3 °C

- Solubilidad en el agua : insoluble ; 0,198 g/l

#### **IV.1.c. Precultivos y preparaciones de los inóculos**

Doce horas antes de inocular los erlenmeyers o el reactor, se lanzaron dos precultivos por cepa. Para esto, 1 ml del glicerol que contiene la cepa de interés se adicionaron a 100 ml de medio LB líquido y el todo se incubó a 30°C bajo una agitación de 200 rpm. Los precultivos se observaron al microscopio para asegurarse de su pureza y se midió la densidad óptica (D.O.). Los precultivos se mezclaron y se centrifugaron tres veces 10 minutos a 12000 rpm en una centrífuga Sorvall® RC-5B (DuPont Instruments) con el fin de lavar las células y de eliminar todo residuo del medio de precultivo. Después de las dos primeras centrifugaciones, el precipitado se resuspendió en 200 ml de solución fisiológica estéril (9 g/l NaCl), después de la última en 50 ml para concentrar la población. Los erlenmeyers se inocularon con 2 ml de esta suspensión y los reactores se inocularon con la suspensión completa.

### **IV.2. PRUEBAS DE BIORREMEDIACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO**

#### **IV.2.a. Pruebas en erlenmeyers de 250 mililitros**

Un testigo positivo se preparó con 100 ml de medio MM2 y 1 ml de la solución de glucosa al 50% m/v en un erlenmeyer de 250 ml; el testigo se preparó con únicamente 100 ml de medio MM2 y sin fuente de carbono. Los erlenmeyers para las pruebas se prepararon con 100 ml de medio MM2 y 0,5 ml del hidrocarburo de interés. Todos los erlenmeyers se agitaron a 200 rpm y se incubaron a 30°C. Una muestra de cada uno se tomó cada hora para realizar un examen microscópico, medir el pH y leer la densidad óptica directa o indirecta según la presencia de hidrocarburo en el medio de cultivo.

#### **IV.2.b. Pruebas en reactor de dos litros**

Se prepararon dos litros de medio de cultivo MM2 sin hidrocarburo en un reactor de tipo BIOSTAT®B 2 L (Anexo 2). Después de esterilizarlo a 121°C durante 20 minutos (Anexo 3), el fermentador se conectó, las condiciones de cultivo se ajustaron a 30°C, 500 rpm, pH 7 y una inyección continua de aire a un débito de 1 l/min. Después del ajuste, se agregaron 10 ml del hidrocarburo por probar. El pH se verificó y la pO<sub>2</sub> se calibró al cero y 100% de saturación de oxígeno por medio de una inyección de aire. Los consumos de ácido (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10 %v/v) y base (NaOH 2 M) se calibraron en cero antes de inocular. Una vez que se inoculó, el registro continuo de los parámetros de fermentación (temperatura, pH, consumo de ácido y de base, pO<sub>2</sub> y velocidad de agitación) se realizó con el *software* Micro Fermentation Control

System (MFCS) de B. Braun con el fin de obtener un gráfico sobre la evolución de las condiciones del cultivo. En el momento de la inoculación, cada hora durante las primeras seis horas y todas las 24 horas durante una semana, se tomó una muestra del cultivo para medir el pH, la D.O. indirecta y observar el cultivo al microscopio. El peso seco y la viabilidad del cultivo también se revisaron repetidas veces.

#### **IV.2.c. Lectura del pH**

Las muestras de los erlenmeyers o del fermentador se recogieron en tubos de ensayo y después de homogeneizarlos sobre un Vortex-Génie 2 (Scientific Industries), se leyó el pH en un aparato Consort P 307 (Microcomputer Ionmeter).

#### **IV.2.d. Lectura directa de la Densidad Óptica**

La medida de la D.O. directa se realizó para las muestras tomadas sobre los testigos positivos y negativos (que no contienen hidrocarburos) de las pruebas en erlenmeyers. Se vertieron aproximadamente dos mililitros de la muestra en una celda 10 x 10 x 45 mm (Greiner Labortechnik) y se llevó a cabo la lectura de la turbiedad a 660 nm sobre un espectrofotómetro Jenway 6100 (Anexo 4). Al valor obtenido se le sustrajo el valor de la turbidez del medio de cultivo solo con el fin de obtener un valor representativo de la turbidez producida por la población bacteriana en unidades de densidad óptica (u. D.O.). Cuando la lectura sobrepasó las 0,600 u. D.O., se prepararon diluciones de la muestra en solución fisiológica, de manera que los valores se mantuvieran en la zona de linealidad definida por la ley de Beer & Lambert (de 0,200 a 0,600 u. D.O.). En este caso la lectura se multiplicó por el factor de dilución.

#### **IV.2.e. Lectura indirecta de la Densidad Óptica**

En el caso de las muestras de los cultivos que contienen hidrocarburos, la emulsión formada por los hidrocarburos se eliminó debido a que interfiere con la medida de turbidez relacionada con la población bacteriana. Para esto, cinco mililitros de la muestra se centrifugaron durante diez minutos en una centrifuga Sorvall® GLC-2B (DuPont Instruments) a 6000 rpm. El sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en cinco mililitros de solución fisiológica sobre el vortex. La lectura de turbidez de esta resuspensión se realizó a 660 nm sobre un espectrofotómetro siguiendo el mismo procedimiento que el de la lectura de D.O. directa.

#### **IV.2.f. Medida de viabilidad**

Para las pruebas en fermentador, se prepararon diluciones decimales (en solución fisiológica estéril) de las muestras en el momento de la inoculación, después de seis,

24 y 48 horas. Tres veces 0,1 ml de las diluciones se sembraron en tres placas de Petri mediante un rastrillo de vidrio anteriormente esterilizado a la llama (procedimiento llamado plaqueo) (Anexo 5). Las cajas de Petri de cada dilución se incubaron a 30°C durante 24 horas con el fin de obtener entre 30 y 300 colonias por caja. El conteo de las colonias permitió construir una curva representativa de las Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/ml) en el medio contra el tiempo.

#### **IV.2.g. Pesos secos**

Después de cinco, 24 y 48 horas, dos muestras de 50 ml se tomaron del reactor y se centrifugaron tres veces a 12000 rpm durante 15 minutos para eliminar los residuos del medio de cultivo. El precipitado se resuspendió las dos primeras veces en 100 ml de agua fisiológica y en 15 ml de agua destilada después de la última centrifugación (Anexo 6). Este volumen se trasvasó a un beaker de 30 ml anteriormente tarado y se coloca en la estufa a 105°C durante 24 horas. El peso seco se expresó en gramos por litro (g/l).

#### **IV.2.h. Determinación del consumo del hidrocarburo por método gravimétrico**

Este método aprovecha la afinidad que existe entre los diferentes hidrocarburos estudiados y el hexano. En el momento de la inoculación, a la hora seis, 24 y 48, muestras de 10 ml se tomaron sobre el fermentador y se congelaron inmediatamente a -80°C. Para la extracción, las muestras se centrifugaron cinco minutos a 6000 rpm con el fin de eliminar la biomasa y el sobrenadante se trasvasó a un beaker de 50 ml. Veinte mililitros de hexano se agregaron y se mezclaron con el sobrenadante con agitación magnética durante diez minutos. Después de la agitación, la fase orgánica se trasvasó a un balón de fondo redondo o bombillo anteriormente tarado y la fase acuosa se volvió a mezclar con 20 ml de hexano. La fase orgánica de la segunda extracción se trasvasó al balón que ya contenía la primera extracción. Este balón se colocó sobre un rotavapor Büchi R 110 a 70°C conectado a un sistema de vacío. La evaporación se llevó a cabo hasta la recuperación completa del hexano (Anexo 7). Seguidamente el balón se pesó para obtener los gramos por litro de hidrocarburo restante en el medio. Esta técnica se aplicó para los ensayos con los compuestos poco volátiles.

#### **IV.2.i. Determinación de la concentración del hidrocarburo por el kit enzimático Total Petroleum Hydrocarbures (TPH) Immunoassay Method (HACH) para muestras acuosas (Anexo 8)**

En el momento de la inoculación, a la hora seis, 24 y 48, una muestra de 10 ml se tomó del reactor y se congelaron inmediatamente a -80°C. Estas muestras se

centrifugaron por 10 minutos a 6000 rpm. El sobrenadante se recuperó en un tubo de ensayo y el precipitado que contenía la biomasa se desechó. Seguidamente se prepararon diluciones de los sobrenadantes y se siguió el procedimiento del kit enzimático indicado en el método de immunoassay 10050 definido por HACH. Este constituye una prueba de resultados semi-cuantitativos que se obtienen sobre un espectrofotómetro HACH DR 4000. Para el método, se pipeteó medio mililitro de cada muestra en una celda cuyo interior se encuentra cubierto por un anticuerpo (celda-anticuerpo) individual en la que se adicionan metanol y un conjugado enzimático. La reacción entre el anticuerpo y la muestra dura diez minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo, fue necesario vaciar y lavar repetidas veces la celda con agua desmineralizada para agregar seguidamente una solución que actúa durante diez minutos adicionales para permitir el desarrollo del color. Una vez transcurrido este tiempo, la *Stop Solution* detuvo la reacción y estabilizó el color para realizar una lectura de absorbancia a 450 nm sobre el espectrofotómetro. Los valores de absorbancia de las muestras se compararon con los que se obtienen de las celdas que contienen las soluciones calibradas (*Calibrators*) del kit TPH Immunoassay Method. La intensidad de la absorbancia a 450 nm es mayor conforme disminuye la concentración en hidrocarburos. Este método enzimático permitió obtener un intervalo de concentración para todas las muestras evaluadas.

#### **IV.2.j. Determinación del consumo de glucosa por Accutrend® alpha.**

En algunos casos, las cepas fueron probadas sobre medios que contenían hidrocarburos y 2 g/l de glucosa. Para las pruebas, el consumo de glucosa como prueba del metabolismo de las bacterias fue comprobado por medio de un test Accutrend® alpha 4289. Se tomaron dos muestras de 1,5 ml en tubos Eppendorf® cada hora durante las seis primeras horas de funcionamiento del fermentador. Los tubos con las muestras se centrifugaron inmediatamente cinco minutos a 14000 rpm en una centrífuga Hawksley MBC para precipitar y eliminar la biomasa. El sobrenadante se trasvasó a un tubo Eppendorf® nuevo y una gota se analizó por Accutrend® alpha con el fin de obtener la concentración de glucosa que sigue en el medio en mg/dl.

#### **IV.2.k. Determinación del consumo de glucosa por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC).**

Se tomaron dos muestras de 1,5 ml cada hora durante las seis primeras horas del fermentador. Los tubos con las muestras se centrifugaron inmediatamente cinco minutos a 14000 rpm en una centrífuga Hawksley MBC para precipitar y eliminar la biomasa. El sobrenadante se trasvasó a un tubo Eppendorf® nuevo y 25 µl de cada muestra se inyectaron (inyector automático 717) a una columna Sugar PaK 1 Waters termostatazada a 90 °C y la glucosa es detectada por un refractómetro 410

termostatzado a 40 °C. La muestra recorre la columna en una soluci3n de EDTA-Ca 50 mg/l con un d3bito 0,5 ml/min mediante una bomba 515 Waters durante aproximadamente 20 min. Los cromatogramas permitieron obtener las concentraciones de glucosa en los medios de cultivo a lo largo del tiempo.

### IV. 3. PRUEBAS SOBRE SUELO ARTIFICIALMENTE CONTAMINADO CON DIESEL

Eliminado: TIERRA

#### IV.3.a. Origen del suelo y determinaci3n de sus caracterfsticas ffsico-qufmicas

El suelo se tom3 de los alrededores del lago del campus del CERIA en Anderlecht, B3lgica. La medida del pH, de la conductividad el3ctrica, de la materia seca, de la densidad y del volumen asf como la determinaci3n de la capacidad de retenci3n de agua y aire se llevaron a cabo segun los procedimientos propuestos por la empresa Norland de B3lgica (Euronature Group), productora de sustratos naturales.

##### IV.3.a.i. Medida del pH y de la conductividad el3ctrica del suelo

Una muestra de 100 gramos de suelo se diluy3 y homogeneiz3 en 500 ml de agua desmineralizada por agitaci3n magn3tica durante 15-20 minutos. El pH se ley3 sobre un aparato Consort P 307 (Microcomputer ionmeter) y la conductividad sobre un conductivmetro Consort K 810.

##### IV.3.a.ii. Determinaci3n del contenido en materia seca del suelo

Un beaker de 200 ml se tar3 sobre balanza analftica ( $m$ ) y 100 gramos de suelo ( $m1$ ) fresca se colocaron en 3l. El todo se coloc3 en la estufa a 105°C durante una noche y se dej3 enfriar al dfa siguiente en un desecador. Una vez frfos el beaker y su contenido, el todo se vuelve a pesar sobre la misma balanza analftica ( $m2$ ). La materia seca se calcula de acuerdo con la acuaci3n matem3tica siguiente :  $[(m2 - m) / (m1 - m)] * 100\%$  y se exprime en porcentaje.

##### IV.3.a.iii. Medidas de la densidad y el volumen del suelo

Se coloc3 una muestra de 100 gramos analfticos del suelo tamizado en una probeta de 200 ml y despu3s de haber estabilizado el nivel de suelo, el volumen en mililitros se ley3 sobre la graduaci3n de la probeta. La densidad se obtuvo dividiendo el peso (100 g) entre el volumen (en ml).

#### **IV.3.b. Pretratamiento del suelo : tamizado, contaminación artificial e inoculación**

Inicialmente se filtró el suelo por un tamiz Endecotts de 18 Mesh (1 mm) con el fin de eliminar piedritas o raíces. Quinientos gramos de suelo tamizado se colocaron en una botella de tres litros de capacidad. Con una agitación manual constante se agregaron seis veces 0,5 ml de diesel (un total de 3 ml (2,5 g) con el fin de obtener una concentración final de 10 000 ppm de diesel). La botella herméticamente cerrada se colocó sobre un Roller Bottle (CEL-GRO Rotator, LAB-LINE) (Anexo 9) con una velocidad de rotación de 8 rpm durante tres días con el fin de homogeneizar al máximo la contaminación. Las respectivas pruebas de biorremediación en suelos y lodos se prepararon al adicionar los compuestos siguiente en los recipientes VELP Scientifica (testigos) y OxiTop® OC110 (otras pruebas) :

- Testigo Negativo de Suelo : 10 g de suelo tamizada sin contaminar + 1 ml de agua estéril.
- Testigo Positivo de Suelo : 10 g de suelo tamizada contaminada + 1 ml de agua estéril.
- Suelo  $10^6$  UFC/g : 10 g de suelo tamizado contaminado + 1 ml de suspensión con  $10^7$  UFC/ml de *Acinetobacter sp.* LMG 1056 (en duplicado).
- Testigo Negativo de Lodo : 10 g de suelo tamizado sin contaminar + 90 ml de agua estéril (con agitación magnética de 300-500 rpm por el sistema VELP Scientifica).
- Testigo Positivo de Lodo : 10 g de suelo tamizado contaminado + 90 ml de agua estéril (con agitación magnética de 300-500 rpm por el sistema VELP Scientifica).
- Lodo  $10^4$  UFC/ml : 10 g de suelo tamizado contaminado + 90 ml de agua estéril + 1 ml de suspensión con  $10^6$  UFC/ml de *Acinetobacter sp.* LMG 1056 (en duplicado y con agitación magnética de 300-500 rpm sobre base VarioMag® (Electronicrührer Multipoint HP 15)).
- Lodo  $10^5$  UFC/ml : 10 g de suelo tamizado contaminado + 90 ml de agua estéril + 1 ml de suspensión con  $10^7$  UFC/ml de *Acinetobacter sp.* LMG 1056 (en duplicado y con agitación magnética de 300-500 rpm sobre base VarioMag® (Electronicrührer Multipoint HP 15)).

#### **IV.3.c. Lectura de la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) : Principio de los métodos VELP Scientifica y OxiTop® OC110 (Anexo 10)**

Los recipientes de todas las pruebas se cerraron herméticamente con el fin de garantizar la eficacia del método respirométrico. Los testigos se conectaron a un aparato VELP Scientifica sobre el cual el consumo de oxígeno se leyó sobre una escala de mercurio a lo largo de una columna graduada. La actividad aeróbica de los microorganismos implicó un consumo de oxígeno y una liberación de CO<sub>2</sub> en el recipiente. Este último fue atrapado por 10 g de pastillas de KOH y el consumo de



oxígeno causó entonces una despresurización en el recipiente. La despresurización permitió el ascenso del mercurio en función de la disminución de presión por un capilar graduado en mg/l de oxígeno. Todos los días a la misma hora durante 28 días, el nivel alcanzado por el mercurio en el capilar se leyó sobre la escala.

Las muestras restantes se conectaron al sistema electrónico OxiTop® OC110 en el que la lectura del consumo de oxígeno es efectuado automáticamente por una cabeza en la que se encuentra un sistema de detección que memoriza los datos cada dos horas durante 28 días y que permite la construcción de gráficos sobre la evolución de la DBO de cada muestra. El principio de ambos aparatos es el mismo con la excepción de que el último realiza las lecturas y trata los datos automáticamente según la ecuación matemática siguiente :

$$DBO = \frac{MO_2}{R \cdot T_m} \cdot \left[ \frac{V_t - V_i}{V_i} + \alpha \frac{T_m}{T_0} \right] \cdot \Delta pO_2$$

Donde :

$MO_2$  : Masa molecular del  $O_2$  (32 000 mg/mol)  
 $R$  : Constante de los gases (83,144 L.mbar/mol.K)  
 $T_0$  : Temperatura de referencia (273,15 K)  
 $T_m$  : Temperatura de medida (ambiente)  
 $V_t$  : Volumen de la botella (volumen nominal en ml)  
 $V_i$  : Volumen de la muestra (en ml)  
 $\alpha$  : Coeficiente de absorción de Bunsen (0,03103)  
 $\Delta pO_2$  : Diferencia de presión parcial del  $O_2$  (mbar)

#### IV.3.d. Análisis de la evolución de la microbiología

Para cada prueba se preparó y lanzó en paralelo, un equivalente en erlenmeyers de un litro de capacidad con el objetivo de poder tomar muestras semanales para realizar plaques sobre medio LB. Estas muestras no podían ser tomadas de los cultivos conectados a los sistemas VELD y OxiTop® OC110 debido a que el abrirlos provoca un cambio de aire y presión contenidos en ellos y falsearía los datos de consumo de oxígeno. Por esto, se prepararon pruebas paralelas en erlenmeyers de las que resultaría posible obtener una idea de la evolución de la comunidad bacteriana total. Aunque paralelas, las pruebas para microbiología variaron en que el  $CO_2$  no era capturado por KOH, la agitación magnética se llevó a cabo sobre bases IKAMag® Reo (IKA® Werke, Drehzahl Electronic) y el cierre no era hermético.

Para los lodos, un mililitro de los cultivos se diluyeron y sembraron sobre medio LB mediante un rastrillo de vidrio esterilizado a la llama. La incubación se llevó a cabo durante 24 horas a 30°C. Para los suelos, un gramo se colocó en una bolsa para extracción en Stomacher (IUL 50 Hz) con 10 ml de agua estéril. Una extracción al Stomacher se realizó durante cinco minutos después de los cuales las muestras se

dejaron decantar durante 10 minutos. Un mililitro del sobrenadante se recuperó para preparar las diluciones y realizar la siembra del modo que se hizo para los lodos. El resultado se expresó en microorganismos totales por mililitro de lodo o por gramo de suelo.

#### IV.3.e. Determinación de la concentración del hidrocarburo por el kit enzimático Total Petroleum Hydrocarbures (TPH) Immunoassay Method (HACH) para las muestras de suelo

Este método sigue el mismo principio que para las muestras acuosas (IV.2.i.) con la diferencia de que los hidrocarburos contenidos en las muestras de suelo fueron anteriormente extraídos de estas antes de preparar la dilución y de proceder como lo define el método 10050 de HACH. Para esto, diez gramos de cada muestra fueron mezclados con cinco gramos de sulfato de sodio y diez mililitros de solución extractora, el todo fue vigorosamente agitado durante un minuto. Después de la decantación de la mezcla, un mililitro del sobrenadante fue recuperado en un recipiente a filtración y movido a través de un filtro. El producto de la filtración fue diluido y la solución resultante fue utilizado en el procedimiento de cuantificación del kit enzimático TPH Immunoassay Method (HACH) para las muestras de suelo.

## **V. RESULTADOS**

## V.I. CULTIVO DE LOS MICROORGANISMOS SOBRE MEDIO ENRIQUECIDO

La evaluación de los crecimientos sobre medio enriquecido permitió obtener información sobre las poblaciones bacterianas que servirán ulteriormente de inóculo en los medios que contienen los hidrocarburos. El objetivo fue conocer las velocidades específicas de crecimiento con el fin de determinar el tiempo de precultivo necesario para poder reducir toda posibilidad de latencia en el momento de transferirlo a un medio fresco.

Los seguimientos del crecimiento dan una idea del tiempo que toma la población en adaptarse a los compuestos del medio de cultivo (fase de latencia), del tiempo que toma en dividirse (fase exponencial) y del tiempo durante el que se mantiene antes de entrar en fase de mortalidad (fase estacionaria). Las curvas de crecimiento de las cepas utilizadas se presentan en la figura 5.

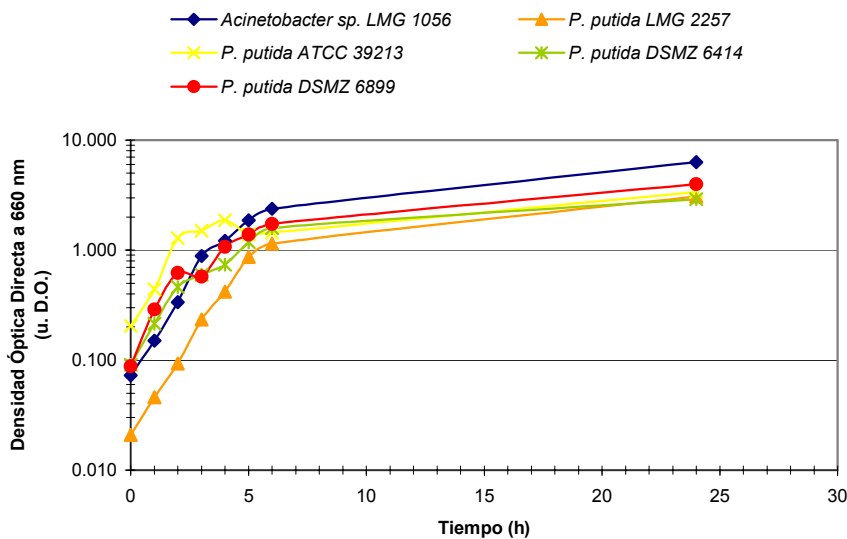


Fig. 5 : Curvas de crecimiento de las cinco cepas bacterianas estudiadas (D.O. directa a 660 nm en función del tiempo).

De acuerdo con la ley definida por Beer & Lambert, una relación lineal puede establecerse entre la viabilidad de una población microbiana y la opacidad (de 0,200 a 0,600 u. D.O.) del medio de cultivo en el que se encuentra esta población en crecimiento. Las curvas de la figura 5 se obtienen a partir de cultivos

inoculados con bacterias colectadas después de una noche de precultivo. Después de este precultivo, las células se refrescan en un medio LB nuevo (tiempo 0) y se encuentran rápidamente en fase exponencial de crecimiento. Actuar de esta manera para preparar los inóculos permite asegurarse de que las bacterias inoculadas presenten un estado fisiológico favorable para el crecimiento inmediato.

Sin embargo, incluso si el medio LB contiene todos los compuestos de base necesarios para permitir el aumento en biomasa, una vez en el medio MM2 que servirá para el crecimiento en presencia de hidrocarburos, las bacterias deben readaptarse a los compuestos minerales contenidos en este. Una población inoculada en fase de latencia o estacionaria puede tomar más tiempo en adaptarse al medio de cultivo y sobre todo a la presencia de un hidrocarburo, que aquella población en fase exponencial. El cuadro 1 presenta las características de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas.

**Cuadro 1 : Características de los crecimientos de las cepas bacterianas sobre medio LB enriquecido (pH inicial = 7).**

CEPA	D.O. inicial (t = 0 h)	D.O. final (t = 24 h)	pH final (t = 24 h)
<i>Acinetobacter sp.</i> LMG 1056	0,073	6,315	8,77
<i>P. putida</i> LMG 2257	0,021	3,088	7,76
<i>P. putida</i> ATCC 39213	0,204	3,375	7,94
<i>P. putida</i> DSMZ 6414	0,091	2,895	7,95
<i>P. putida</i> DSMZ 6899	0,088	4,002	7,94

Una alcalinización del medio se observa en todos los casos. Este aumento de pH se ve ligado a una desaminación oxidativa de los aminoácidos del medio en el momento de su metabolización. El cuadro 1 permite observar una primera diferencia entre el metabolismo de *Acinetobacter sp.* y los de *Pseudomonas putida* : en 24 horas, el aumento de la densidad óptica y del pH del medio de cultivo son más fuertes para *Acinetobacter sp.* LMG 1056.

La turbiedad del medio puede resultar de células vivas o muertas así como de desechos celulares. La medida de la viabilidad es indispensable para evaluar la toxicidad del medio o de los potenciales de crecimiento de una suspensión celular, razón por la cual la medida de D.O. es complementada por observaciones al microscopio y plaqueos. Estos últimos permiten verificar que

**la D.O. de la muestra corresponde con la opacidad producida por la presencia de células viables en el medio.**

**Cuadro 2 : Relación de viabilidad expresada en UFC/ml con respecto a una densidad óptica unitaria para las cinco cepas cultivadas en medio rico.**

CEPA	1 u. D.O. = (UFC/ml)	g* (h)	μ** (h <sup>-1</sup> )
<i>Acinetobacter sp.</i> LMG 1056	2,55 x 10 <sup>8</sup>	1,40	0,50
<i>Pseudomonas putida</i> LMG 2257	2,56 x 10 <sup>8</sup>	1,90	0,40
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 39213	1,22 x 10 <sup>8</sup>	1,40	0,50
<i>Pseudomonas putida</i> DSMZ 6414	3,51 x 10 <sup>7</sup>	2,60	0,30
<i>Pseudomonas putida</i> DSMZ 6899	6,52 x 10 <sup>8</sup>	1,80	0,40

\* g = tiempo de generación o de duplicación de la población bacteriana.

\*\* μ = velocidad específica de crecimiento de la población bacteriana.

El tiempo de generación puede calcularse a partir de un gráfico semi-logarítmico que represente la evolución de la densidad óptica del cultivo a lo largo del tiempo. Los valores del cuadro 2 muestran que las cepas *Acinetobacter sp.* LMG 1056 y *Pseudomonas putida* ATCC 39213 presentan un crecimiento más rápido que las demás cepas. *Pseudomonas putida* DSMZ 6414 presenta el crecimiento más lento. Es probable que estos comportamientos se presenten de igual manera en el medio MM2 en presencia de hidrocarburos.

En el medio MM2, la glucosa o los hidrocarburos constituyen una fuente de energía carbonada. En este caso, otra maquinaria enzimática se utiliza y los tiempos de generación pueden variar con respecto a los que se obtuvieron en el medio LB. Considerando que las condiciones de crecimiento son probablemente menos favorables en el medio MM2, es probable que las bacterias tomen más tiempo para crecer en este.

## V.II. DEGRADACIÓN DE LOS HIDROCARBUROS EN ERLENMEYERS DE 250 ml

Con respecto a un estudio anterior (Ngabonziza, 2003), se probó un mayor panel de hidrocarburos puros para estudiar sus biodegradabilidades respectivas por *Acinetobacter sp.* LMG 1056 y las cuatro cepas de *Pseudomonas putida*. Todas las cepas probadas fueron preseleccionadas a partir de listas provenientes de los bancos de cepas como utilizadoras potenciales de hidrocarburos.

Las pruebas en erlenmeyers permiten obtener una idea preliminar, a pequeña escala, de los potenciales de degradación de los hidrocarburos por las bacterias. Sólo la D.O.

y el pH han sido medidos en los cultivos en erlenmeyers. Una evolución de la D.O. representa un cambio de la turbiedad del medio, muchas veces indicador de un crecimiento bacteriano. En el caso del testigo positivo, el consumo de glucosa implica la liberación de ácidos orgánicos en el medio, lo que provoca una disminución del pH. Para las pruebas en presencia de hidrocarburos, la evolución de la turbiedad así como la disminución del pH, atribuida a la liberación de ácidos grasos en el medio, pueden confirmar la metabolización de los hidrocarburos debido a que los microorganismos no disponen de otras fuentes de carbono o de energía en este medio.

**Con el fin de evitar toda interferencia en la medida de la densidad óptica por la presencia de la emulsión que forman los hidrocarburos, un método indirecto fue desarrollado y descrito en el capítulo Materiales y Métodos (IV.2.e.).**

#### V.II.a. Degradación efectuada por *Acinetobacter sp.* LMG 1056

La evolución del cultivo de la cepa LMG 1056 en presencia de glucosa (testigo positivo), de diferentes hidrocarburos puros así como en ausencia de fuente de energía (testigo negativo) se presenta en la figura 6.

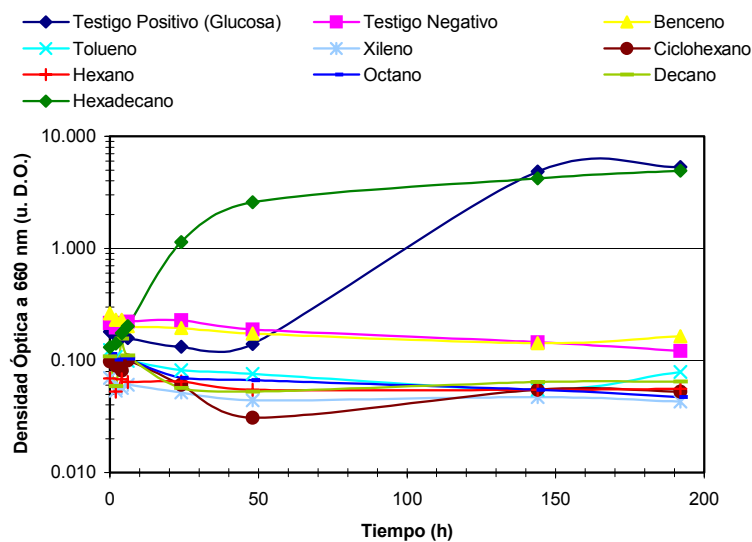


Fig. 6: Evolución de la densidad óptica de los cultivos en erlenmeyers de *Acinetobacter sp.* LMG 1056 sobre diversos hidrocarburos.



La D.O. evoluciona para los cultivos en presencia de glucosa y de hexadecano debido a que las poblaciones utilizan estos compuestos carbonados como fuentes de energía. Esta metabolización, contrariamente a lo que ocurre en los medios del testigo negativo y en aquellos que contienen los hidrocarburos, implica cambios de pH que se presentan en el cuadro 3.

**Cuadro 3 : Evolución de los pH de los cultivos de *Acinetobacter sp.* LMG 1056 en medio MM2 que contiene glucosa o hidrocarburos puros (pH inicial = 7).**

MEDIO	pH inicial (t = 0 h)	pH (t = 24 h)	pH final (t = 168 h)
MM2 (testigo negativo)	6,81	6,79	6,72
MM2 + Glucosa (testigo positivo)	6,81	4,18	4,90
MM2 + Benceno	6,79	6,77	6,74
MM2 + Tolueno	6,81	6,77	6,74
MM2 + Xileno	6,81	6,75	6,72
MM2 + Ciclohexano	6,79	6,74	6,72
MM2 + Hexano	6,81	6,75	6,71
MM2 + Octano	6,79	6,75	6,72
MM2 + Decano	6,78	6,76	6,72
MM2 + Hexadecano	6,80	6,47	4,36

Contrariamente a lo que presentaba la figura 6, la digestión de la glucosa parece empezar antes del de hexadecano debido a que la disminución de pH en el medio que la contiene inicia antes que en el medio que contiene el hidrocarburo (pH a t = 24 h), incluso si el cultivo en presencia de glucosa parece entrar inicialmente en una fase de latencia.

Después de 48 horas, sólo la glucosa y el hexadecano han sido utilizados como fuentes de carbono. El hecho de que no se haya observado variación significativa alguna de la D.O. o del pH en los medios que contenían otros hidrocarburos además del hexadecano, impide concebir una utilización de estos hidrocarburos como únicas fuentes de carbono y de energía para el crecimiento. Ha de precisarse que el carácter volátil de algunos hidrocarburos engendra una eliminación gradual de los compuestos del medio. Esto limita en el transcurso del tiempo, las posibilidades de crecimiento para los microorganismos.

### V.II.b. Degradaciones efectuadas por *Pseudomonas putida* LMG 2257, *P. putida* ATCC 39213, *P. putida* DSMZ 6414 y *P. putida* DSMZ 6899

Las diferentes cepas de *Pseudomonas putida* presentaron un comportamiento similar sobre todos los hidrocarburos probados. Los resultados se presentan en las cuatro figuras siguientes (figuras 7, 8, 9 y 10) :

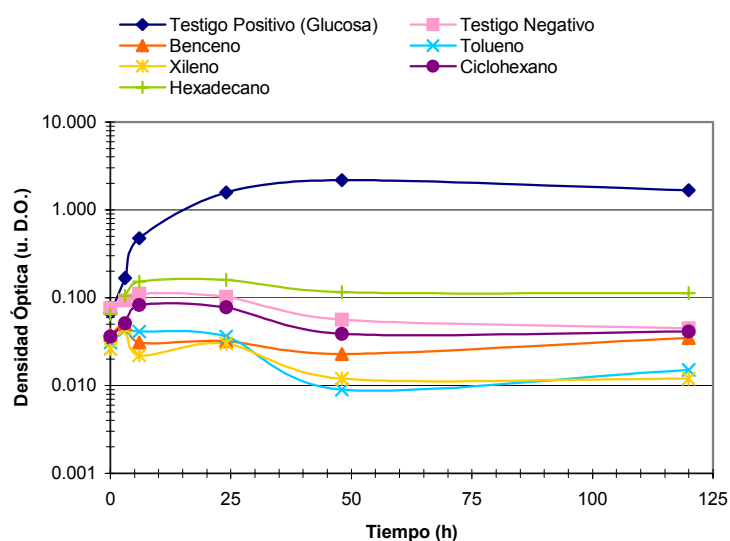


Fig. 7 : Evolución de la densidad óptica a 660 nm de los cultivos en erlenmeyers de *Pseudomonas putida* LMG 2257 sobre diversos hidrocarburos.

La cepa LMG 2257 parece crecer únicamente sobre la glucosa y en 48 horas, ninguno de los otros sustratos es metabolizado por la misma. El aumento de la D.O. debido al consumo de la glucosa comienza inmediatamente después de la inoculación. Debido a que la evolución de la densidad óptica de los cultivos sobre los hidrocarburos presenta el comportamiento de la curva del testigo negativo (sin fuente carbonada) parecería que *Pseudomonas putida* LMG 2257 no es capaz de utilizar los BTX o los alcanos probados como únicas fuentes de energía y carbono o que estos sustratos tienen un efecto tóxico sobre esta cepa.

Cuadro 4 : Evolución de los pH de los cultivos de *Pseudomonas putida* LMG 2257 en medio MM2 que contiene glucosa o hidrocarburos puros (pH inicial = 7).

MEDIO	pH inicial (t = 0 h)	pH (t = 24 h)	pH final (t = 120 h)
MM2 (testigo negativo)	6,74	6,79	6,82
MM2 + Glucosa (testigo positivo)	6,73	5,42	4,41
MM2 + Benceno	6,74	6,79	6,83
MM2 + Tolueno	6,82	6,83	6,87
MM2 + Xileno	6,83	6,82	6,86
MM2 + Ciclohexano	6,82	6,83	6,84
MM2 + Hexadecano	6,82	6,82	6,82

Los valores del cuadro 4 confirman que la cepa LMG 2257 no reconoce ninguno de los sustratos carbonados propuestos como fuentes de energía, fuera de la glucosa. La cepa ATCC 39213 presenta, como lo indica la figura 8, un comportamiento muy similar al de la primera *Pseudomonas putida* probada.

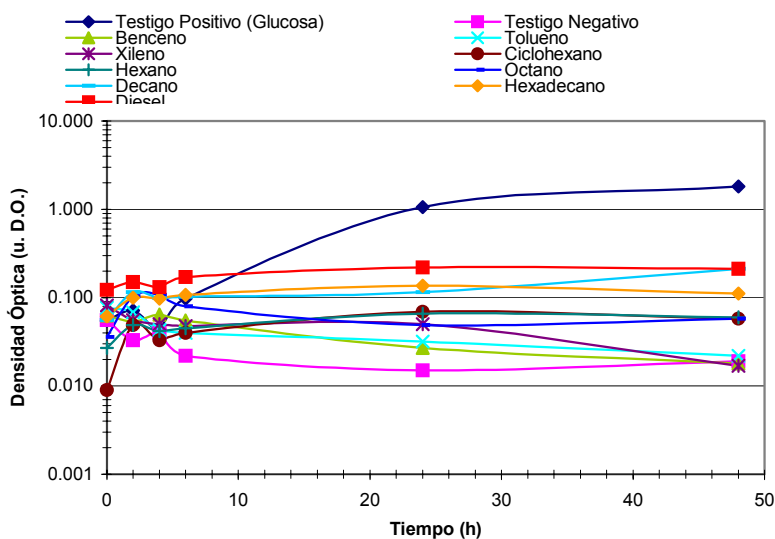


Fig. 8 : Evolución de la densidad óptica a 660 nm de los cultivos en erlenmeyers de *Pseudomonas putida* ATCC 39213 sobre diversos hidrocarburos.

Para la cepa ATCC 39213, la variación de D.O. es importante únicamente en el caso del testigo positivo que contiene la glucosa. Los cultivos en presencia de los hidrocarburos exponen un comportamiento similar al del cultivo en ausencia de

fuente de energía. La evolución del pH (cuadro 5) confirma nuevamente que sólo la glucosa es metabolizada por *Pseudomonas putida* ATCC 39213.

Cuadro 5 : Evolución de los pH de los cultivos *Pseudomonas putida* ATCC 39213 en medio **MM2** con glucosa o hidrocarburos (pH inicial = 7).

MEDIO	pH inicial (t = 0 h)	pH (t = 24 h)	pH final (t = 48 h)
MM2 (testigo negativo)	<b>6,80</b>	<b>6,77</b>	<b>6,77</b>
MM2 + Glucosa (testigo positivo)	<b>6,82</b>	<b>5,61</b>	<b>5,32</b>
MM2 + Benceno	<b>6,84</b>	<b>6,79</b>	<b>6,77</b>
MM2 + Tolueno	<b>6,82</b>	<b>6,77</b>	<b>6,75</b>
MM2 + Xileno	<b>6,83</b>	<b>6,78</b>	<b>6,76</b>
MM2 + Ciclohexano	<b>6,78</b>	<b>6,76</b>	<b>6,75</b>
MM2 + Hexano	<b>6,76</b>	<b>6,75</b>	<b>6,80</b>
MM2 + Octano	<b>6,83</b>	<b>6,80</b>	<b>6,75</b>
MM2 + Decano	<b>6,82</b>	<b>6,77</b>	<b>6,74</b>
MM2 + Hexadecano	<b>6,76</b>	<b>6,75</b>	<b>6,76</b>
MM2 + Diesel	<b>6,76</b>	<b>6,77</b>	<b>6,72</b>

El crecimiento de una tercera cepa de *Pseudomonas putida* fue estudiado sobre los mismos hidrocarburos puros pero la misma no parece metabolizar tampoco los hidrocarburos presentes en el medio MM2 (figura 9).

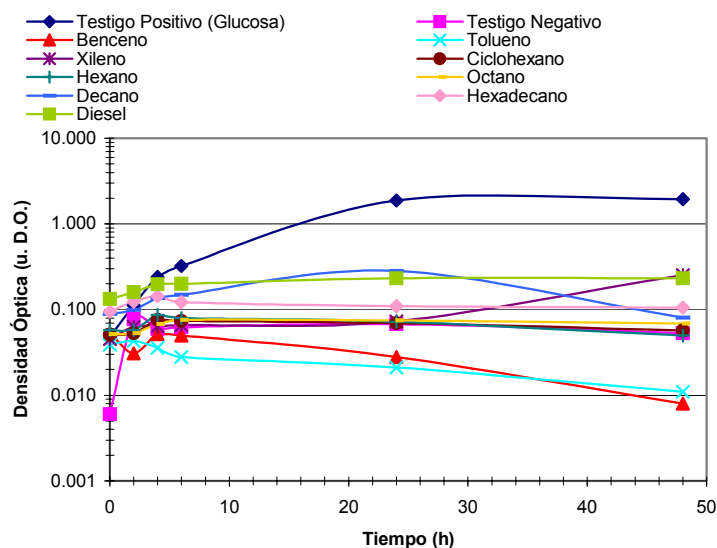


Fig. 9 : Evolución de la densidad óptica a 660 nm de los cultivos en erlenmeyers de *Pseudomonas putida* DSMZ 6414 sobre diversos hidrocarburos.

Esta tercera cepa de *Pseudomonas putida*, usualmente destacada por su potencial de degradación del tolueno, no logra degradar este último ni los demás hidrocarburos propuestos. Sólo el testigo positivo presenta una evolución de D.O. inmediata. Los pH presentados en el cuadro 6 confirman los valores presentados en la figura 9. En esta, el benceno y el tolueno parecen tener un efecto de toxicidad sobre las poblaciones de la cepa *P. putida* DSMZ 6414 que implica una disminución de la densidad óptica en el tiempo, como resultados de una posible lisis celular. Esto debería confirmarse con una disminución de la viabilidad expresada en UFC/ml.

Cuadro 6 : Evolución de los pH de los cultivos de *Pseudomonas putida* DSMZ 6414 en el medio **MM2** con glucosa o hidrocarburos (pH inicial = 7).

MEDIO	pH inicial (t = 0 h)	pH (t = 24 h)	pH final (t = 48 h)
MM2 (testigo negativo)	6,80	6,80	6,70
MM2 + Glucosa (testigo positivo)	6,83	6,27	6,47
MM2 + Benceno	6,79	6,78	6,70
MM2 + Tolueno	6,81	6,80	6,69
MM2 + Xileno	6,80	6,76	6,48
MM2 + Ciclohexano	6,77	6,77	6,66
MM2 + Hexano	6,75	6,75	6,67
MM2 + Octano	6,82	6,79	6,73
MM2 + Decano	6,80	6,77	6,73
MM2 + Hexadecano	6,75	6,76	6,70
MM2 + Diesel	6,75	6,76	6,70

La figura 10 presenta la evolución de la D.O. de los cultivos en erlenmeyers de *P. putida* DSMZ 6899 sobre diversos hidrocarburos.

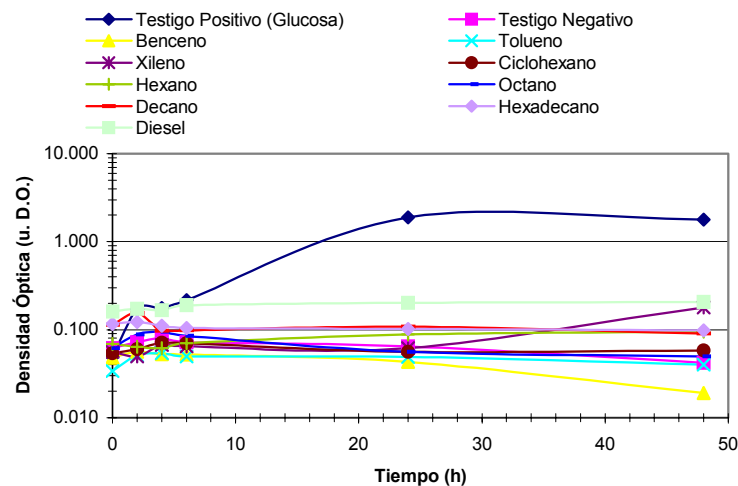


Fig. 10 : Evolución de la densidad óptica a 600 nm de los cultivos en erlenmeyers de *Pseudomonas putida* DSMZ 6899 sobre diversos hidrocarburos.

La última cepa de *P. putida* no parece metabolizar tampoco los hidrocarburos agregados a los medios de cultivo. Sólo un crecimiento sobre la glucosa y un

mantenimiento de las D.O. sobre los hidrocarburos puros y el diesel se observan para la cepa DSMZ 6899 (figura 10). El benceno, como para la cepa DSMZ 6414, parece provocar una disminución de la D.O. que podría asociarse con una lisis celular a lo largo del tiempo.

Cuadro 7 : Evolución de los pH de los cultivos de *Pseudomonas putida* DSMZ 6899 en el medio **MM2** con glucosa o hidrocarburos (pH inicial = 7).

MEDIO	pH inicial (t = 0 h)	pH (t = 24 h)	pH final (t = 48 h)
MM2 (testigo negativo)	<b>6,83</b>	<b>6,74</b>	<b>6,63</b>
MM2 + Glucosa (testigo positivo)	<b>6,83</b>	<b>5,95</b>	<b>6,46</b>
MM2 + Benceno	<b>6,84</b>	<b>6,82</b>	<b>6,71</b>
MM2 + Tolueno	<b>6,83</b>	<b>6,78</b>	<b>6,70</b>
MM2 + Xileno	<b>6,82</b>	<b>6,74</b>	<b>6,79</b>
MM2 + Ciclohexano	<b>6,78</b>	<b>6,77</b>	<b>6,68</b>
MM2 + Hexano	<b>6,77</b>	<b>6,77</b>	<b>6,77</b>
MM2 + Octano	<b>6,82</b>	<b>6,77</b>	<b>6,71</b>
MM2 + Decano	<b>6,80</b>	<b>6,77</b>	<b>6,71</b>
MM2 + Hexadecano	<b>6,77</b>	<b>6,76</b>	<b>6,71</b>
MM2 + Diesel	<b>6,76</b>	<b>6,76</b>	<b>6,74</b>

Además de la glucosa, ninguna variación importante se observa tanto en el caso de los seguimientos de la D.O. como para los del pH. La evaporación de los hidrocarburos es limitada por la presencia de tapones herméticos sobre los erlenmeyers. Es probable que sean tolerantes a la presencia de los hidrocarburos pero que no posean la maquinaria enzimática para degradarlos. La ausencia de metabolización indica por entonces una incapacidad de las cepas de *Pseudomonas putida* para utilizar estos hidrocarburos puros como única fuente de carbono y de energía. Esta incapacidad puede explicarse por :

- Una toxicidad que se traduce por una disminución de la viabilidad con respecto al testigo negativo.
- La necesidad de disponer de otro sustrato como fuente de carbono y de energía para metabolizar los hidrocarburos.
- La demanda de una cantidad importante de oxígeno para la metabolización de los hidrocarburos, que no puede satisfacerse con la realización del cultivo en erlenmeyers cerrados agitados.

Estas diferentes cepas de *Pseudomonas putida* no serán consideradas en un futuro para la formulación de un consorcio degradador de hidrocarburos.

### **V.III. DEGRADACIÓN DE LOS HIDROCARBUROS EN REACTORES DE DOS LITROS**

#### **V.III.a. Degradaciones efectuadas por *Acinetobacter sp.* LMG 1056**

Los cultivos en reactor permiten controlar las condiciones de agitación, aireación, temperatura y pH del medio con el fin de optimizar el metabolismo de la cepa. La  $pO_2$  (presión parcial en oxígeno) así como el consumo de ácido y de base se siguen continuamente.

La realización de cultivos en reactor con inyección continua de aire permite una mejor transferencia de oxígeno de la fase gaseosa hacia la fase líquida para los cultivos en erlenmeyers.

En vez de mantener un seguimiento del crecimiento a partir de la evolución de la D.O. indirecta solamente, es posible obtener muestras con el fin de seguir también la viabilidad y la concentración de biomasa expresada en cantidad de materia seca por unidad de volumen. El volumen superior de cultivo (dos litros en lugar de 100 ml en erlenmeyers) permite tomar muestras para cuantificar la concentración del hidrocarburo en el medio con el fin de verificar su consumo.



V.III.a.i. *Acinetobacter sp.* LMG 1056 sobre hexadecano (C<sub>16</sub>H<sub>34</sub>)

Las medidas de D.O., los plaques y las determinaciones de materia seca para el cultivo de *Acinetobacter sp.* LMG 1056 sobre hexadecano se representan en la figura 11.

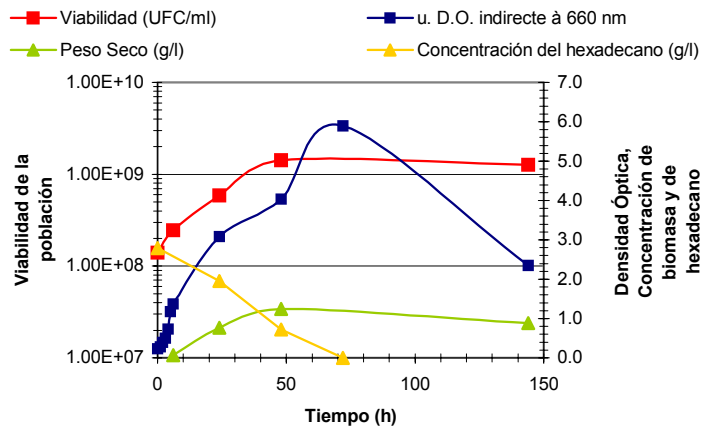


Fig. 11 : Evaluación del crecimiento de *Acinetobacter sp.* LMG 1056 en un medio que contiene HEXADECANO como única fuente de carbono y de energía (concentración inicial = 3,89 g/l).

La figura 11 permite observar el aumento de la densidad óptica que se traduce por un aumento del número de células viables (dos log) y de la concentración en materia seca.

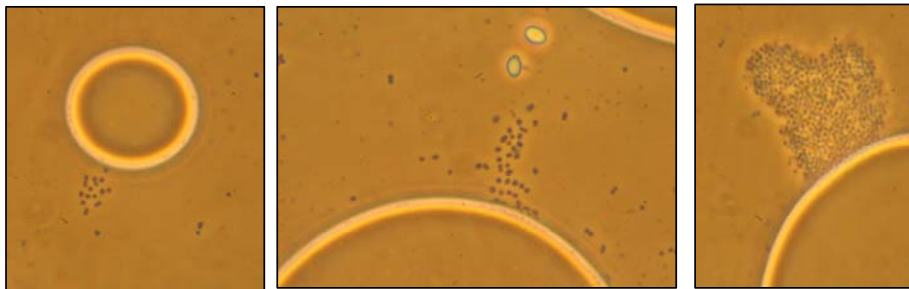


Fig. 12 : Crecimiento de las células bacteriana de la cepa *Acinetobacter sp.* LMG 1056 sobre las emulsiones de hexadecano (1000X).

Las fotografías permiten visualizar las bacterias en la interfase hexadecano/agua que favorece la accesibilidad con respecto al sustrato carbonado para su metabolización.

El crecimiento de *Acinetobacter sp.* LMG 1056 en el medio depende de un consumo del hidrocarburo presente en este debido a que la concentración del hexadecano disminuye de manera proporcional al aumento de los parámetros indicadores de crecimiento. Aún cuando el hexadecano no presenta un carácter volátil, la concentración agregada no logra cuantificarse enteramente con la técnica gravimétrica probablemente debido a una pérdida durante la extracción con el hexano.

La figura 13 presenta los consumos de base y la evolución de la  $pO_2$  del cultivo de *Acinetobacter sp.* LMG 1056 sobre el hexadecano.

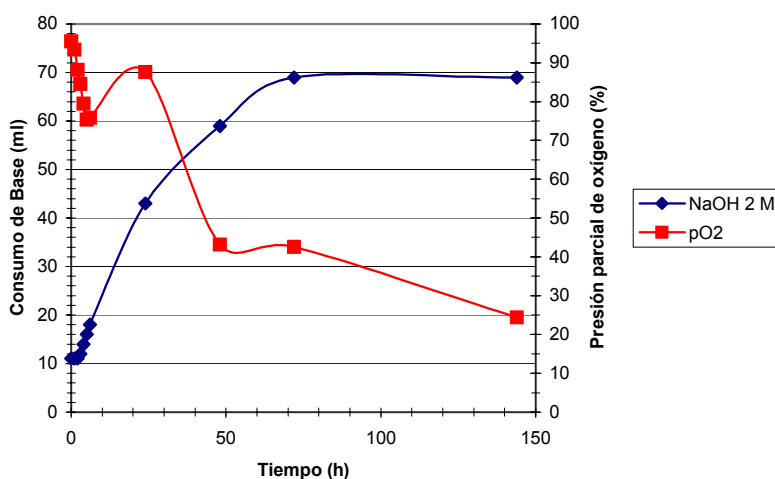


Fig. 13: Evolución de los parámetros indicadores de la metabolización del HEXADECANO por *Acinetobacter sp.* LMG 1056.

El metabolismo del hexadecano por *Acinetobacter sp.* LMG 1056 implica la liberación de ácidos orgánicos en el medio, que es compensado por un consumo de base con el fin de mantener el pH en 7. Este consumo es claramente visible en la figura 13 y puede correlacionarse con la evolución de los parámetros indicadores de viabilidad y la disminución de la concentración en hexadecano presentados en la figura 12.

El metabolismo aeróbico de *Acinetobacter sp.* LMG 1056 implica una disminución de la saturación de oxígeno en el medio, lo cual es visible sobre la curva roja de la figura 13.

De acuerdo con el comportamiento de los parámetros indicadores, es posible confirmar que *Acinetobacter sp.* LMG 1056 degrada rápidamente el hexadecano bajo condiciones controladas de reactor.

V.III.a.ii. Degradación del diesel por *Acinetobacter sp.* LMG 1056

**El diesel constituye una mezcla de hidrocarburos alifáticos y aromáticos. Como lo indican los parámetros de cultivo presentados en la figura 14, *Acinetobacter sp.* LMG 1056 logra utilizar algunos compuestos de la mezcla como fuentes de carbono y de energía.**

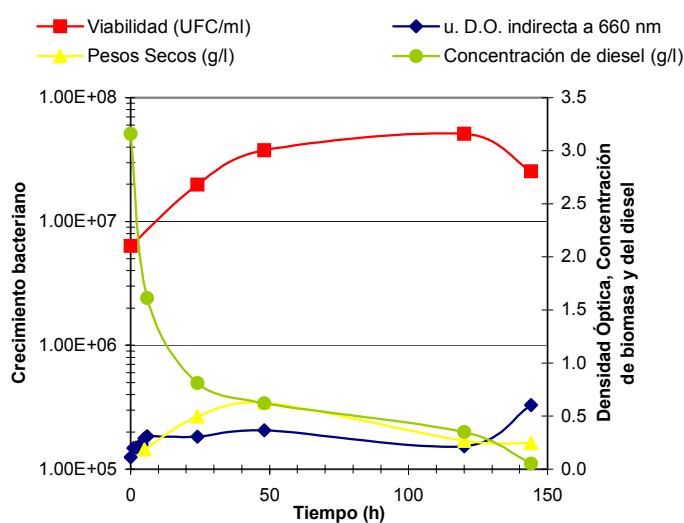


Fig. 14 : Evaluación del crecimiento de *Acinetobacter sp.* LMG 1056 en un medio que contiene DIESEL como única fuente de carbono y de energía (concentración inicial = 4,13 g/l).

Las evoluciones crecientes de las curvas de densidad óptica, de viabilidad expresada en UFC/ml (1 Log) y de peso secos indican que ocurre un ligero crecimiento. Efectivamente, durante las primeras horas de cultivo aparece un aumento de la D.O. y de las UFC/ml correspondientes a una disminución de la concentración de diesel en el medio. Puede considerarse que el crecimiento se asocia con este consumo de diesel (figura 16).

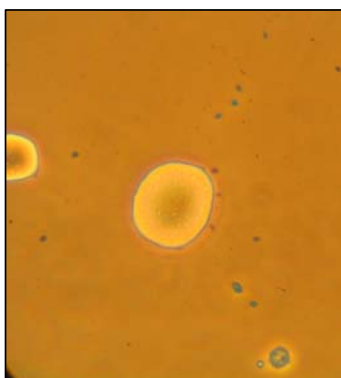


Fig. 15 : Crecimiento de *Acinetobacter sp.* LMG 1056 sobre las emulsiones de diesel (1000X).

La figura 15 presenta las emulsiones de diesel en el medio. Las bacterias se encuentran próximas de las emulsiones o en su superficie para degradar el diesel.

La disminución de la concentración de diesel en el transcurso de las primeras horas de cultivo puede explicarse con una eliminación parcial de las fracciones volátiles del diesel por el aire inyectado continuamente al reactor. El consumo de base como parámetro indicador de la actividad metabólica sobre el diesel se presenta en la figura 16.

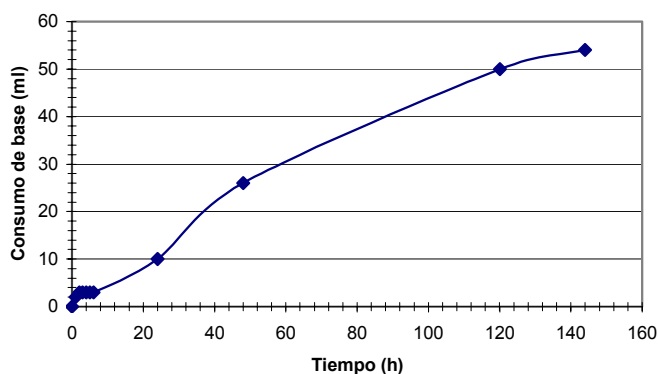


Fig. 16 : Consumo de base (NaOH 2 M) como indicador del metabolismo del DIESEL por *Acinetobacter sp.* LMG 1056.

Debido a que la sonda de  $pO_2$  presentó problemas de detección durante el cultivo de *Acinetobacter sp.* LMG 1056 sobre el diesel, sólo el consumo de base pudo tomarse

en consideración como indicador del metabolismo de esta mezcla de hidrocarburos. El consumo creciente de base para neutralizar los ácidos orgánicos liberados en el medio confirma que la cepa *Acinetobacter sp.* LMG 1056 metaboliza una fracción de los hidrocarburos presentes en el diesel.

V.III.a.iii. Degradación del decano ( $C_{10}H_{22}$ ) por *Acinetobacter sp.* LMG 1056

**La figura 18 presenta el crecimiento de *Acinetobacter sp.* LMG 1056 sobre el decano. Decenas de células aparecen sobre la emulsión de decano hasta que esta desaparece del medio.**

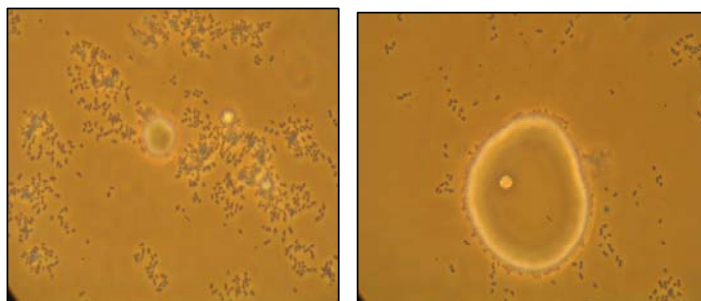
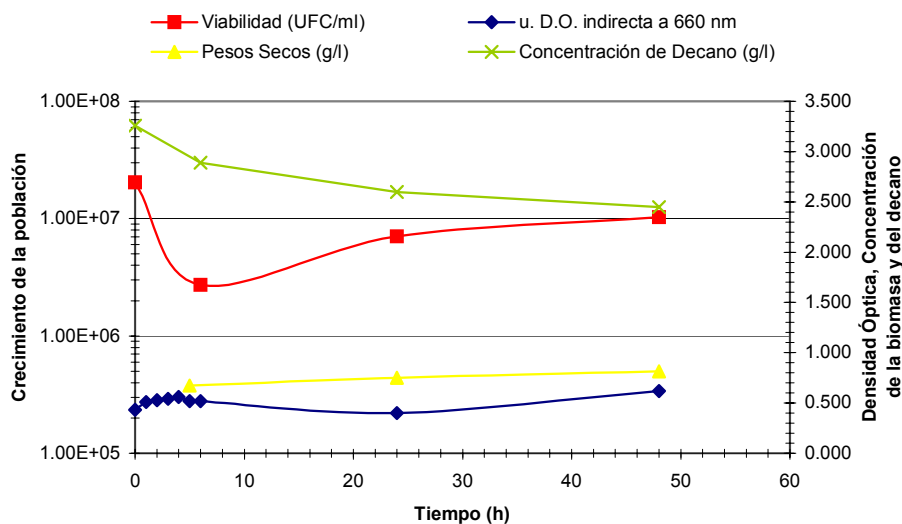


Fig. 17 : Crecimiento de las células bacterianas de la cepa *Acinetobacter sp.* LMG 1056 sobre emulsiones de decano (1000X).

Los cocobacilos que aparecen sobre el decano parecen reconocer este hidrocarburo como sustrato de crecimiento. Sin embargo, los parámetros que deberían indicar este crecimiento, como la evolución de la densidad óptica y de la concentración de biomasa (UFC/ml o gramos de materia seca/l), muestran que no hay ninguna variación significativa (figura 18).



**Fig. 18 :** Evaluación del crecimiento de *Acinetobacter sp.* LMG 1056 en un medio que contiene DECANO como única fuente de carbono y de energía (concentración inicial = 3,65 g/l).

Puede apreciarse una débil disminución de la concentración del decano (medido por el método gravimétrico) en el medio a lo largo del tiempo. Es probable que esta disminución no se encuentre ligado con una degradación debido a que ningún consumo de base fue medido en este cultivo en reactor. Además, el método cualitativo (TPH Immunoassay method 10050 de HACH) confirma que la presencia del decano se mantiene constante a lo largo de todo el seguimiento. La baja disminución de decano determinada por gravimetría podría deberse a la imprecisión del método. La  $pO_2$  no pudo medirse.

Incluso si la degradación no pudo ser probada, *Acinetobacter sp.* LMG 1056 puede considerarse como una cepa tolerante a la presencia del decano ya que la viabilidad se mantuvo a lo largo del tiempo.

#### V.III.a.iv. Degradación del tolueno ( $C_7H_8$ ) por *Acinetobacter sp.* LMG 1056

La figura 19 presenta el crecimiento de *Acinetobacter sp.* LMG 1056 sobre el tolueno así como la concentración de este en el medio MM2 a lo largo del tiempo.

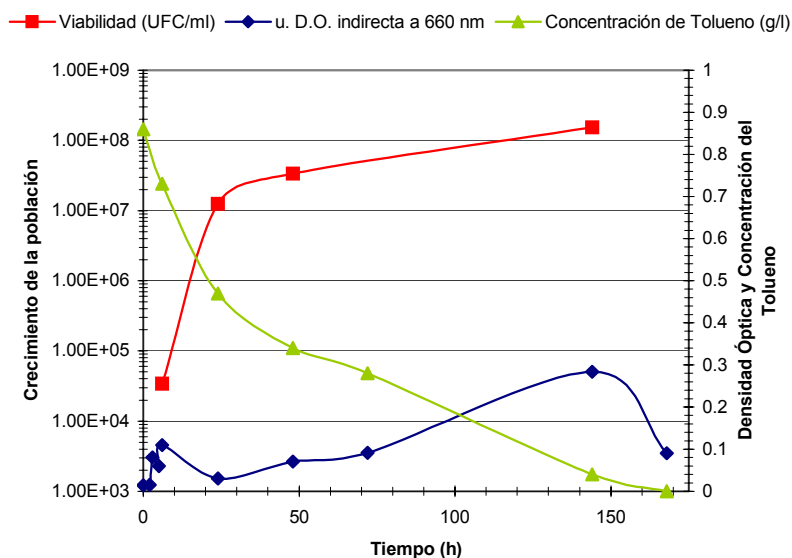


Fig. 19 : Evaluación del crecimiento de *Acinetobacter sp.* LMG 1056 en un medio que contiene TOLUENO como única fuente de carbono y de energía (concentración inicial = 4,33 g/l).

**Con respecto a la biomasa inicial ( $10^5$  a  $10^6$  UFC/ml) en el momento de la inoculación, una baja concentración en células viables se obtiene durante las primeras horas de fermentación ( $3 \times 10^4$  UFC/ml), lo cual indicaría una mortalidad. Las células sobrevivientes parecen haberse adaptado al tolueno y lo habrían parcialmente utilizado como fuente de energía y de carbono, como lo muestra el aumento de la concentración en células viables durante las primeras 24 horas (de  $10^4$  a  $10^7$  UFC/ml). Esta concentración celular es demasiado débil como para tener una incidencia sobre la densidad óptica y la concentración en materia seca.**

La concentración en tolueno a lo largo del tiempo no pudo determinarse por el método de extracción con hexano seguido por una evaporación al vacío hasta sequedad. El tolueno presenta una volatilidad demasiado importante y se evaporó con el hexano. Pareciera aún así que menos de 1500 ppm de tolueno siempre se encuentran en el medio después de cinco días de incubación de acuerdo con los resultados del análisis cualitativo (TPH Immunoassay method 10050 de HACH). La volatilización del tolueno en el reactor se ve limitada por la presencia de la columna refrigerante en el circuito de salida de aire sobre la cual el tolueno evaporado puede condensarse y reintegrarse al medio.

La figura 20 presenta el consumo de base y la evolución de la  $pO_2$  del medio de cultivo que contiene a la cepa LMG 1056 en presencia de tolueno.

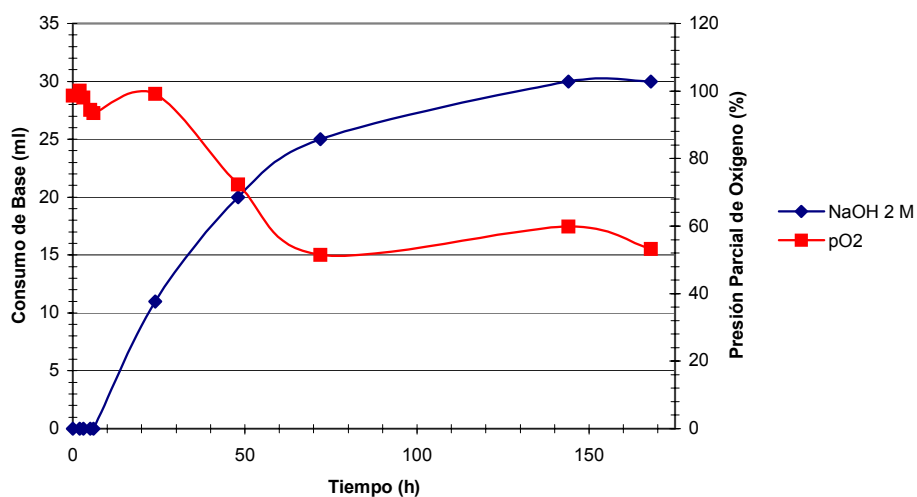


Fig. 20: Evolución de los parámetros indicadores de la metabolización del TOLUENO por *Acinetobacter sp.* LMG 1056.

Un importante consumo de base así como de demanda en oxígeno indican una actividad metabólica de la cepa *Acinetobacter sp.* LMG 1056 en presencia de tolueno.

#### V.III.a.v. Degradación del tolueno ( $C_7H_8$ ) por *Acinetobacter sp.* LMG 1056 en presencia de glucosa

La degradación del tolueno fue probada en presencia de glucosa, con la esperanza de que *Acinetobacter sp.* LMG 1056 podría degradar este hidrocarburo en presencia de una fuente de carbono más asimilable. Los resultados D.O., viabilidad expresada en UFC/ml, pesos secos, consumo del tolueno y de la glucosa se presentan en la figura 21.



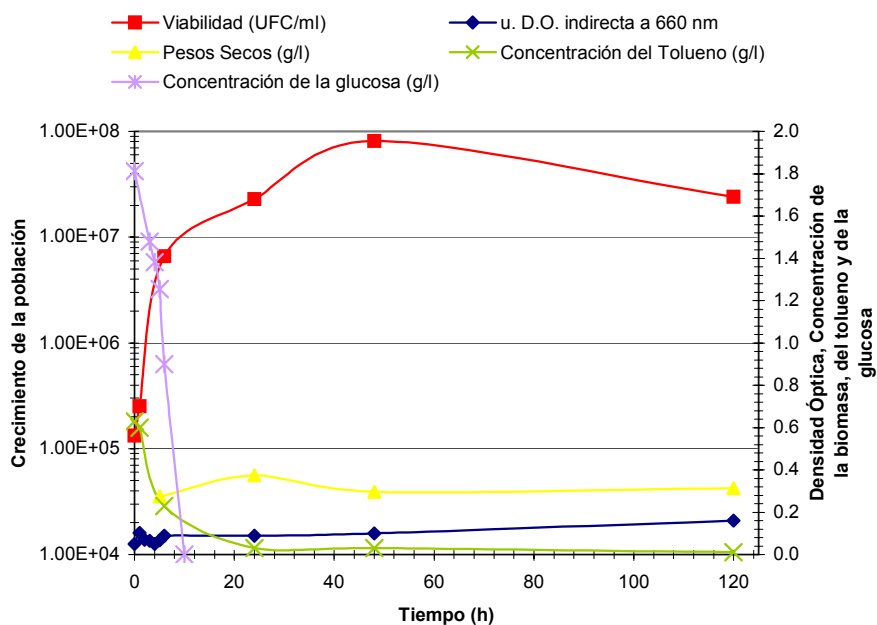


Fig. 21 : Evaluación del crecimiento de *Acinetobacter sp.* LMG 1056 en un medio que contiene TOLUENO (concentración inicial = 4,33 g/l) y 2 g/l de GLUCOSA.

Los resultados presentados en la figura 21 son muy diferentes de los de la figura 19 cuando se trata de la misma cepa en presencia del mismo hidrocarburo. En presencia de glucosa, la población bacteriana aumenta directamente de  $10^5$  a  $10^7$  UFC/ml. La densidad óptica inicialmente elevada no permite observar una variación muy significativa. Este crecimiento persiste más allá de la desaparición de la glucosa y aumenta de un factor logarítmico ( $10^7$  a  $10^8$ ) cuando sólo el tolueno queda disponible como fuente de carbono.

De acuerdo con los resultados presentados en la figura 22, puede confirmarse la presencia de una actividad metabólica sobre la glucosa, el tolueno o ambos.

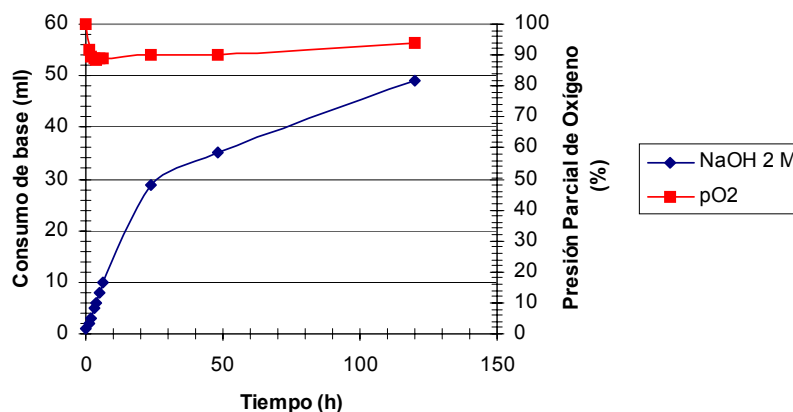


Fig. 22 : Evolución de los parámetros indicadores de la actividad metabólica de *Acinetobacter sp.* LMG 1056 en un medio que contiene TOLUENO en presencia de GLUCOSA.

La acidificación del medio durante las seis primeras horas de cultivo se asocia con el consumo de la glucosa presente en el medio. A partir del momento en el que sólo queda tolueno, el consumo de base surge como necesidad de neutralizar los ácidos orgánicos producidos durante la metabolización de este último con el fin de mantener el pH neutro en el medio. Como este consumo persiste a lo largo del tiempo y que el tolueno constituye la única fuente de energía y carbono restante en el medio, es probable que el tolueno del medio sea degradado por *Acinetobacter sp.* LMG 1056.

Comparativamente con los resultados obtenidos del cultivo de *Acinetobacter sp.* sobre el tolueno como única fuente de carbono y de energía, la presencia de glucosa permite obtener una mayor concentración bacteriana pero la dificultad para cuantificar el tolueno con precisión, incita prudencia en cuanto a su utilización simultánea como fuente de carbono y de energía.

#### V.III.a.vi. Degradación del octano ( $C_8H_{18}$ ) por *Acinetobacter sp.* LMG 1056

Mientras que las observaciones al microscopio muestran que las bacterias se encuentran en la interfase octano/fase acuosa, de acuerdo con los resultados presentados en la figura 23, ninguna evolución significativa de los parámetros de estimación de la biomasa permite considerar cualquier crecimiento.

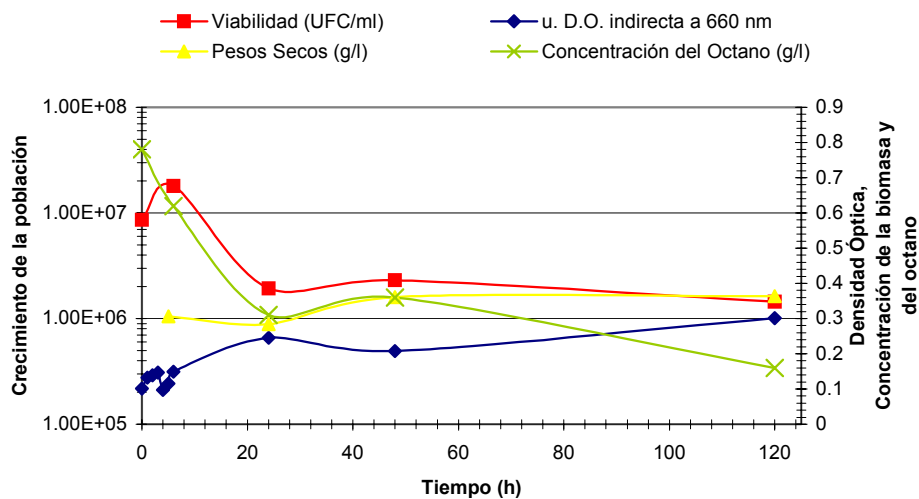


Fig. 23 : Viabilidad de *Acinetobacter sp.* LMG 1056 en un medio que contiene OCTANO como única fuente de carbono y de energía (concentración inicial = 3,51 g/l).

**La viabilidad de la cepa en presencia de octano parece disminuir a lo largo del tiempo. Mientras que los valores de D.O. y de materia seca se mantienen, el número de células vivas que pueden formar colonias disminuye de manera importante durante las primeras horas y se mantiene constante a lo largo del resto del estudio. Esto puede indicar que el octano presenta un efecto tóxico sobre la población bacteriana.**

El octano no pudo cuantificarse con precisión debido a su volatilidad. Únicamente un dosaje cualitativo (TPH Immunoassay method 10050 de HACH) ha permitido evidenciar que la concentración de octano se mantuvo en menos de 500 ppm durante todo el cultivo en reactor.

De acuerdo con los resultados de la figura 23, el octano parece tener un efecto tóxico sobre *Acinetobacter sp.* LMG 1056.

V.III.a.vii. Degradación del octano ( $C_8H_{18}$ ) por *Acinetobacter sp.* LMG 1056 en presencia de glucosa

De igual manera que para el tolueno, la degradación simultánea del octano y de la glucosa fue evaluada (figura 24).

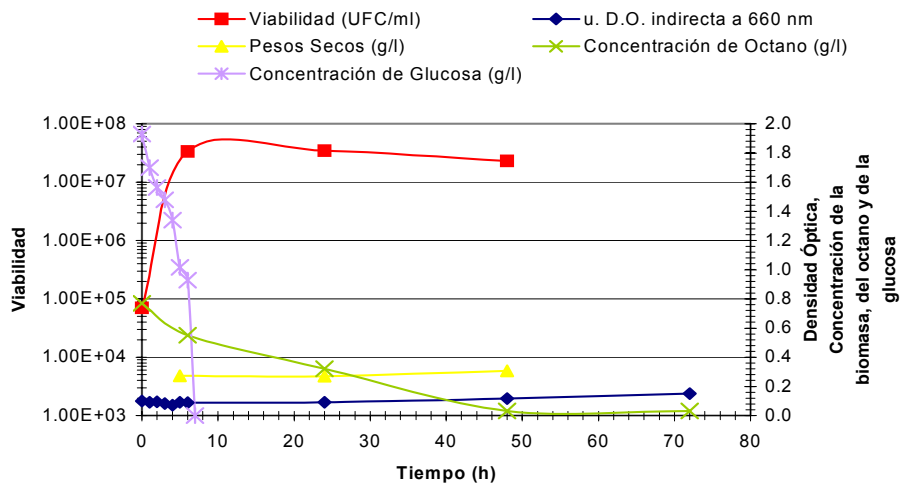


Fig. 24 : Evaluación del crecimiento de *Acinetobacter sp.* LMG 1056 en un medio que contiene OCTANO (concentración inicial = 3,51 g/l) y 2 g/l de GLUCOSA.

El método de dosaje cualitativo (TPH Immunoassay method 10050 de HACH) confirma la presencia de octano tras el consumo completo de glucosa. Ninguna variación de la concentración celular, después del agotamiento de la glucosa, fue observada. La desaparición del octano a lo largo del tiempo se explica por su volatilidad y no por su metabolización.

La figura 25 presenta el consumo de base así como la evolución de la pO<sub>2</sub> del medio.

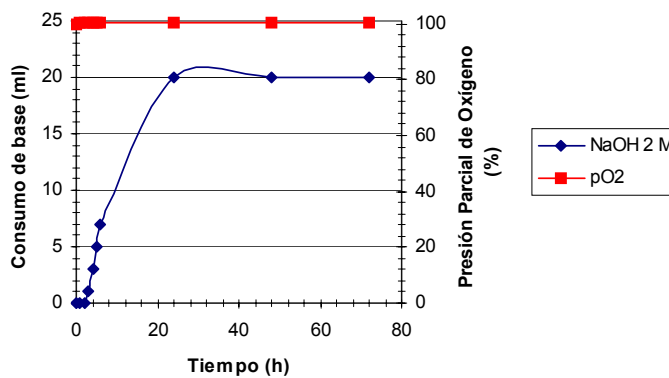


Fig. 25 : Evolución de los parámetros indicadores de la actividad metabólica de *Acinetobacter sp.* LMG 1056 en un medio que contiene OCTANO en presencia de GLUCOSA.

Un consumo de base es necesario para neutralizar los ácidos orgánicos producidos por el metabolismo de la glucosa pero no continúa una vez que esta se ha agotado. Ningún cambio significativo no aparece para la  $pO_2$ . Al parecer, la degradación del octano no es funcional.

### V.III.b. Degradaciones realizadas por *Pseudomonas putida* LMG 2257

#### V.III.b.i. Degradación del tolueno por *Pseudomonas putida* LMG 2257

Una mortalidad de la población se observa desde el primer contacto entre la cepa *Pseudomonas putida* LMG 2257 y el tolueno y se acompaña de una lisis celular.

#### V.III.b.ii. Degradación del diesel por *Pseudomonas putida* LMG 2257

La figura 26 presenta los diferentes parámetros que indican el crecimiento de *Pseudomonas putida* LMG 2257 en presencia de diesel como única fuente de carbono y de energía.

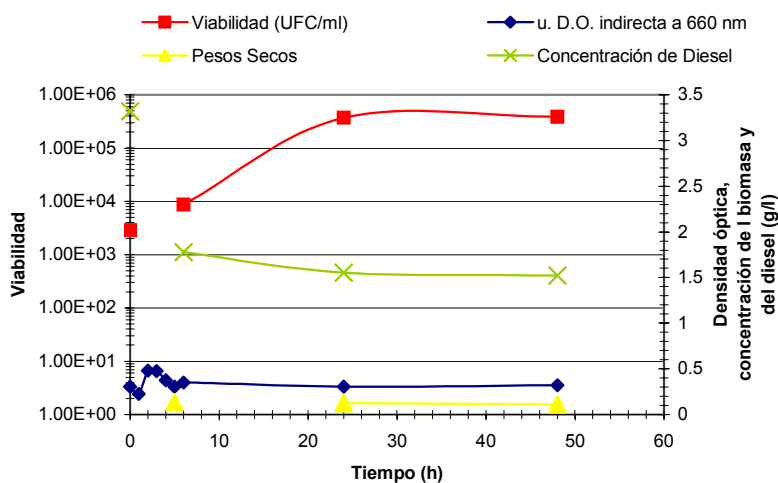


Fig. 26 : Evaluación del crecimiento de *Pseudomonas putida* LMG 2257 en un medio que contiene DIESEL como única fuente de carbono y de energía (concentración inicial = 4,13 g/l).

Inicialmente la población bacteriana viable es menor que la población normalmente inoculada ( $10^6$  a  $10^7$  UFC/ml), lo cual indica una mortalidad parcial de la biomasa

seguida por una adaptación de esta al diesel. Incluso si la densidad óptica parece permanecer constante a lo largo del seguimiento, la curva de viabilidad (expresada en UFC/ml) presenta una evolución positiva. Este crecimiento de la viabilidad (aumento de 2 Log) no permite indicar un aumento significativo de la concentración en biomasa en el medio y está probablemente ligado con el consumo de una fracción de diesel. Después de 24 horas, la concentración de UFC/ml así como de diesel en el medio se mantiene. Puede ser que en este momento, la fracción metabolizable por *Pseudomonas putida* LMG 2257 se haya agotado y que la parte restante no sea susceptible de metabolizarse. La figura 27 presenta las indicaciones del metabolismo de la cepa LMG 2257 sobre el diesel.

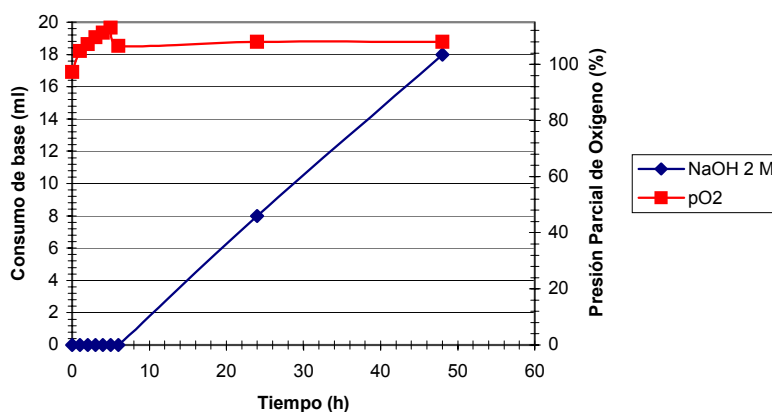


Fig. 27 : Evolución de los parámetros indicadores de la metabolización del DIESEL por *Pseudomonas putida* LMG 2257.

Mientras que un aumento de las UFC/ml y una ligera disminución de la concentración de diesel tienen lugar en el medio, la  $pO_2$  no varía significativamente. El consumo de base aparece hasta al final del seguimiento lo cual sugiere una secreción tardía de ácidos orgánicos por la cepa. La velocidad de metabolización del diesel por *Pseudomonas putida* LMG 2257 es demasiado lenta como para provocar cambios de  $pO_2$  considerando que un aporte continuo de oxígeno se realiza por inyección de aire. Sin embargo, es posible decir que la cepa LMG 2257 crece sobre una fracción del diesel.

### V.III. DEGRADACIÓN DEL DIESEL SOBRE UN SUELO CONTAMINADO ARTIFICIALMENTE

#### V.III.a. Características del suelo

El cuadro 8 presenta las características del suelo utilizado para los ensayos de degradación del diesel por *Acinetobacter sp.* LMG 1056.

Cuadro 8 : Propiedades físicas del suelo utilizada para los ensayos de biodegradación en medio sólido, después del tamizado.

Color y textura	Materia seca (%)	Humedad (%)	Densidad (g/ml)	Volumen de 100 g de suelo ( $\pm 2,0$ ml)	pH (u. pH)	Conductividad eléctrica ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )
Café claro, suelo limosa/arenosa	78	22	0,82	122,0	6,80	145

El suelo presenta una tasa de humedad y un pH compatibles con una actividad microbiológica ; casi un cuarto del peso del suelo constituye agua y el pH es próximo a la neutralidad con el fin de evitar todo estrés sobre las poblaciones presentes.

Este suelo fue artificialmente contaminada como se describió en el capítulo VI.3.b. de la parte Materiales y Métodos. No sufrió tratamiento térmico alguno de modo que se mantuvo la población microbiana original.

#### V.III.b. Evaluación de la actividad de degradación de *Acinetobacter sp.* LMG 1056 en una suelo artificialmente contaminada con diesel

La actividad de *Acinetobacter sp.* LMG 1056 sobre el diesel en reactor se ve favorecida por el control de varios parámetros necesarios para su crecimiento. Sin embargo, en el caso de una verdadera contaminación en el suelo, donde las condiciones son mucho más variables, es fundamental poder prever la actividad de degradación *in situ* de la cepa LMG 1056 sobre el diesel. Los ensayos sobre el suelo fueron realizados con el fin de conocer la actividad potencial de *Acinetobacter sp.* en un sitio contaminado con diesel.

##### V.III.b.i. Evolución de la Demanda Bioquímica de Oxígeno medida en los ensayos en suelo

Los recipientes VELD Scientifica et OxiTop® OC110 representan un sistema aislado que contiene suelo, agua, aire y diesel como fuente de carbono y de energía. En este sistema el consumo de oxígeno puede utilizarse como testigo de la actividad de

degradación de la cepa LMG 1056 al seguir la evolución de la presión a lo largo del tiempo, automáticamente convertida a demanda bioquímica de oxígeno.

Diez gramos de suelo contaminado fueron inoculados con una suspensión que contenía  $10^7$  UFC/ml de *Acinetobacter sp.* LMG 1056. La DBO de este suelo fue medida a lo largo del tiempo y fue comparada con la DBO del suelo contaminada sin inocular (testigo positivo suelo) con el fin de determinar la contribución de la cepa a las fluctuaciones de DBO. Un testigo negativo, constituido por diez gramos de suelo sin contaminar y sin inocular, permitió conocer la contribución de la flora microbiana y la carga orgánica naturales del suelo a la evolución de la DBO.

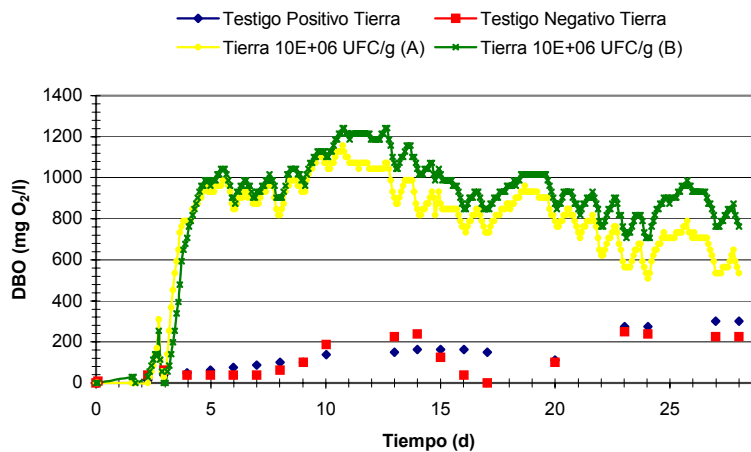


Fig. 28 : Evolución de la Demanda Bioquímica de Oxígeno de los sistemas de degradación del diesel por *Acinetobacter sp.* LMG 1056 sobre un suelo artificialmente contaminado.

La baja evolución de la DBO de los cultivos testigos muestra que existe originalmente una población activa en el suelo. Esta población no parece verse significativamente alterada por la presencia de la contaminación debido a que las curvas de los cultivos del testigo positivo y negativo siguen un comportamiento similar. Debido a que el cultivo testigo negativo no contiene diesel pero que una oxidación de materia orgánica tiene lugar, es probable que otras fuentes de carbono y de energía estén disponibles en el suelo.

Para los cultivos que contienen la cepa LMG 1056, la figura 28 muestra que un consumo creciente de oxígeno tiene lugar durante los primeros cinco días. Parecería que la actividad metabólica se ha detenido después de estos primeros días debido a :

- El agotamiento de la fuente biodegradable.
- La inhibición progresiva de la cepa por los productos de la degradación.
- El consumo completo del oxígeno disponible en los sistemas herméticos.



El consumo de oxígeno de los dos testigos permanece inferior al que registran los suelos inoculados e indica que *Acinetobacter sp.* es aparentemente responsable por una gran parte del consumo del oxígeno del sistema debido a la degradación del diesel, previamente confirmado durante los ensayos en reactor.

#### V.III.b.ii. Evolución de la viabilidad de las poblaciones presentes en los suelos

La figura 29 presenta la viabilidad de *Acinetobacter sp.* LMG 1056 y de las poblaciones inicialmente presentes en el suelo durante los 28 días del seguimiento. La concentración inicial de microorganismos totales en los suelos ( $10^8$  a  $10^9$  UFC/g) es considerablemente superior a la cantidad aportada por la inoculación con *Acinetobacter* ( $10^6$  UFC/g). Desde un punto de vista cuantitativo, el agregar el inóculo no tendría tener una incidencia significativa sobre las poblaciones totales. Además, estas varían de aproximadamente un factor logarítmico a lo largo de los 28 días de seguimiento, lo cual no permite observar una diferencia significativa entre las tres muestras.

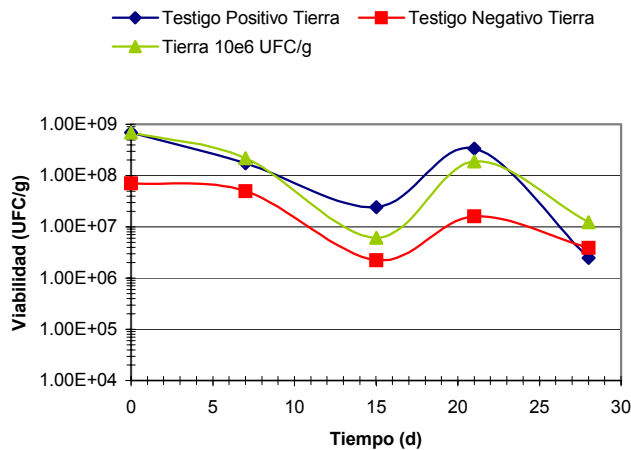


Fig. 29 : Evolución de la población microbiana total en las muestras de suelo a lo largo de los 28 días de seguimiento.

La contaminación del suelo utilizado para preparar el testigo positivo y la muestra inoculada con la cepa LMG 1056 se realizó al homogeneizar tres mililitros de diesel en 500 g de suelo durante tres días a 30 °C. Durante este tiempo, contrariamente a las poblaciones presentes en la suelo sin contaminar, el crecimiento de las poblaciones del suelo contaminado fue favorecido por la temperatura y la disponibilidad de una fuente potencial de carbono y de energía. Esto podría explicar la diferencia de un

factor logarítmico que existe entre la población inicial del testigo negativo y la de las otras dos muestras.

Sin embargo, en el tiempo inicial y con base en la observación de las colonias cultivadas cada semana, una población de naturaleza más variada fue observada en el suelo sin contaminar con respecto a la población encontrada en el suelo contaminada (nueve contra cinco morfologías diferentes, respectivamente). Es posible que la toxicidad del diesel haya eliminado algunos tipos de microorganismos sin por ello haber tenido efectos significativos sobre la concentración total de la microflora.

En el caso de la muestra de suelo que contenía la cepa LMG 1056, la proporción de las colonias características de esta población bacteriana parece aumentar a lo largo del tiempo, indicando que los hidrocarburos contenidos en el diesel están siendo consumidos. El aumento de *Acinetobacter sp.* parece verse acompañado por una disminución de otros microorganismos, probablemente ligado a la toxicidad del contaminante o de los derivados de su metabolismo. El mantenimiento de los microorganismos inicialmente presentes en el suelo que contiene diesel no significa necesariamente que este último es metabolizado por los microorganismos pero que algunos de estos toleran su presencia en su ambiente.

#### V.III.b.iii. Cuantificación de la concentración de diesel presente en los suelos por el método 10050 TPH Immunoassay method de HACH

La cuantificación del diesel en el suelo contaminada en el momento de la inoculación y 28 días después de esta fue realizada con el método enzimático 10050 para detección de los TPH, precedida por una separación física y química de los hidrocarburos de la matriz del suelo. La figura 30 presenta la concentración de diesel presente en las muestras en el momento de la inoculación y después de cuatro semanas de seguimiento.

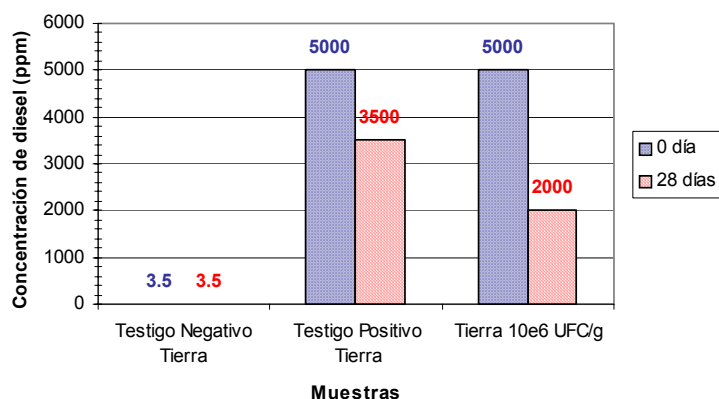


Fig. 30 : Concentración de diesel en el momento inicial y después de 28 días de seguimiento de la actividad de *Acinetobacter sp.* LMG 1056 en suelo.

La especificidad del dosaje por el kit enzimático TPH Immunoassay method (HACH) fue demostrada por la ausencia de detección de diesel en el testigo negativo. Las muestras que contienen el suelo contaminado presentaron ambas una disminución de la concentración del diesel. Esto sugiere que la población natural presenta una capacidad para degradar el diesel inferior a la capacidad desarrollada por *Acinetobacter sp.*, con cuya presencia aparece una desaparición más importante del diesel inicialmente mezclado con el suelo.

Debido a que la DBO no presentaba más variaciones importantes después de los cinco primeros días del seguimiento, es probable que la concentración de diesel restante esté constituida por hidrocarburos recalcitrantes ante una metabolización por *Acinetobacter sp.* o que una carencia en nitrógeno o en fósforo impiden el desarrollo de la actividad metabólica.

#### V.III.c. Evaluación de la actividad de degradación de *Acinetobacter sp.* LMG 1056 en un lodo que contiene suelo artificialmente contaminado con diesel

Puesto que el suelo es un medio poco homogéneo y que posee una importante capacidad de adsorción de los hidrocarburos, constituye un ambiente en el los microorganismos no logran necesariamente llevar a cabo su tarea de degradación. Tratamientos *ex situ* en lodo son entonces propuestos con el fin de aumentar la disponibilidad de los sustratos con la desventaja de aumentar también el volumen a tratar, en el que el agente contaminante se encuentra diluido.

V.III.c.i. Evolución de la Demanda Bioquímica de Oxígeno medida en los ensayos en lodo

Dos tasas de inoculación del lodo por *Acinetobacter sp.* LMG 1056 fueron aplicados ( $10^4$  y  $10^5$  UFC/ml). El lodo fue preparado con diez gramos de suelo suspendidos en 90 ml de agua estéril. De la misma manera que para el suelo, la actividad de degradación fue evaluada por el seguimiento de la DBO con el fin de comparar la evolución de esta en los ensayos que contienen la cepa LMG 1056 con los testigos positivo (que contiene suelo contaminado sin inocular) y negativo (que contiene suelo sin contaminar y sin inocular) (figura 31).

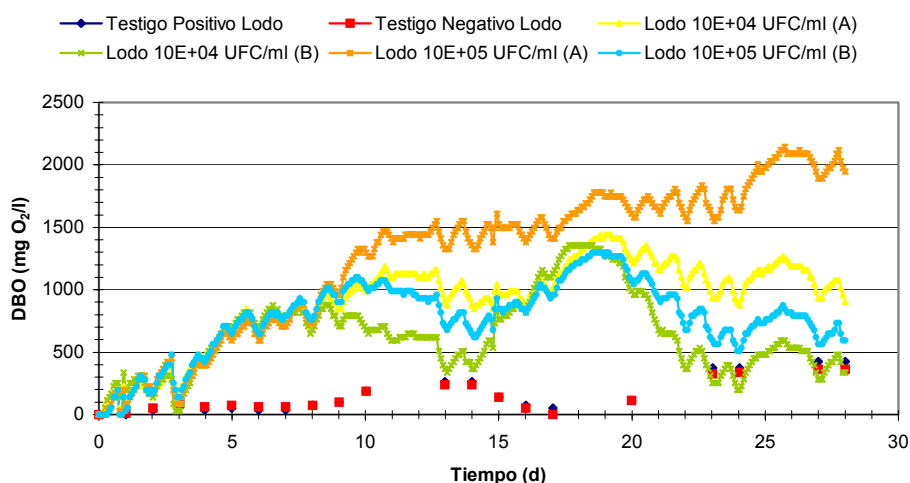


Fig. 31 : Demanda Bioquímica de Oxígeno de los sistemas de degradación del diesel por *Acinetobacter sp.* LMG 1056 en lodo.

Como en el caso de los ensayos en suelo, los cultivos testigos presentan una evolución de DBO inferior a aquellos cultivos que contienen *Acinetobacter sp.* LMG 1056. Sin embargo, la actividad respiratoria de la población natural presente en el suelo sin contaminar parece ser similar a la de la población en presencia del diesel. Es probable que en lodo, la toxicidad del diesel sea superior que en el suelo seco debido a una mayor biodisponibilidad. Los microorganismos son probablemente más sensibles a su presencia en medio acuoso. Al no poder utilizar el diesel, la población se comporta como una población presente en el testigo negativo.

Una demanda en oxígeno para los dos lodos inoculados es detectada durante diez días. Seguidamente parece detenerse la actividad metabólica. No existe diferencia significativa entre la evolución de la DBO para los lodos inoculados con  $10^4$  y  $10^5$  UFC/ml. Debido a que los lodos pueden considerarse como sistemas mucho más

homogéneos que el suelo, las variaciones de las curvas de DBO de los cultivos en lodo pueden atribuirse a la precisión de la medida.

### V.III.c.ii. Evolución de la viabilidad de las poblaciones presentes en los lodos

La figura 32 presenta la evolución de la viabilidad de las poblaciones naturales y *Acinetobacter sp.* LMG 1056 en los lodos.

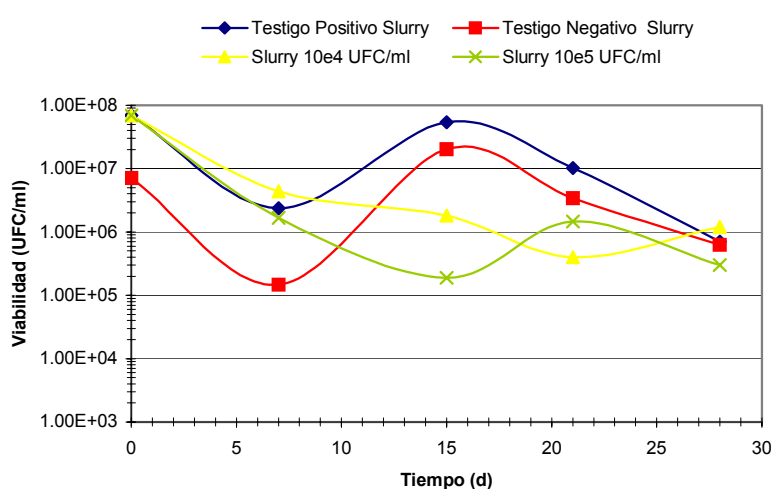


Fig. 32 : Evolución de la población microbiana total de las muestras de lodo a lo largo de los 28 días del seguimiento.

Igual que para los suelos, las poblaciones iniciales medidas para los diferentes lodos ( $10^7$  y  $10^8$  UFC/ml) son superiores a las cantidades aportadas por la inoculación con *Acinetobacter sp.* LMG 1056 ( $10^4$  y  $10^5$  UFC/ml). El comportamiento general después de 28 días indica una disminución de dos Log de la población total para todas las muestras de lodos. La evolución de las viabilidades entre las preparaciones no permite observar una diferencia significativa entre estas.

### V.III.c.iii. Cuantificación de la concentración de diesel presente en los lodos por el método 10050 TPH Immunoassay method de HACH

La figura 33 presenta la concentración de diesel presente en las muestras de lodo en el momento de la inoculación y después de cuatro semanas de seguimiento.

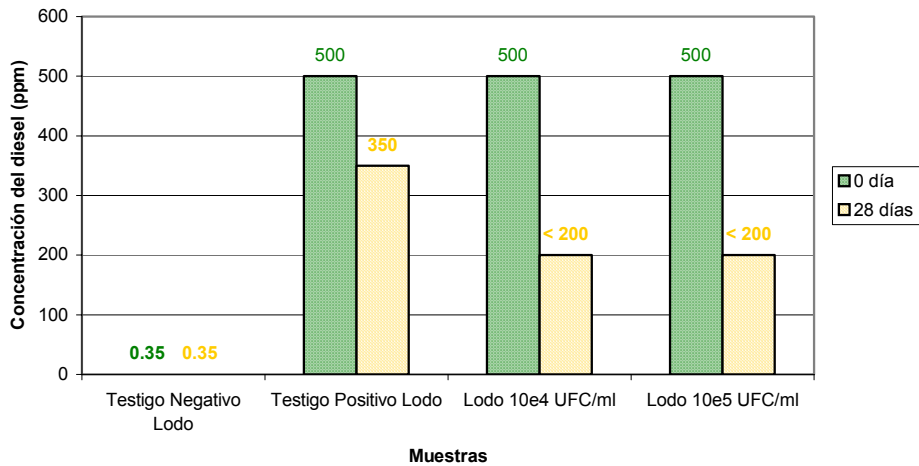


Fig. 33 : Concentración del diesel en el tiempo inicial y después de 28 días del seguimiento de la actividad de *Acinetobacter sp.* LMG 1056 en lodo.

Como para el caso de las muestras de suelo, el inóculo de *Acinetobacter sp.* LMG 1056 realiza la mayor parte de la actividad de degradación del diesel.

Comparativamente a la degradación obtenida en suelo, la concentración del diesel en los lodos disminuyó de manera más importante (hasta poco más de 300 ppm). Mientras que su biodisponibilidad puede constituir una causa de toxicidad, esta última puede verse atenuada por la tasa de dilución del diesel en el lodo y las poblaciones tolerarían más fácilmente la presencia del sustrato, accediendo al mismo tiempo al mismo para degradarlo de una manera más eficaz.

## **VI. DISCUSIÓN**

## VI.1. CONDICIONES DE CRECIMIENTO Y PARÁMETROS CONTROLADOS

El crecimiento de las poblaciones bacterianas depende en gran medida de los parámetros físico-químicos. Por esta razón, fueron controlados diferentes parámetros durante los ensayos en medio acuoso o semisólido. Dan una idea de los eventos dominantes del cultivo así como de las condiciones a las que se ven expuestas las bacterias (Prescott ; Harley ; Klein, 1995).

Dado que el objetivo de este trabajo era estudiar el potencial de cuatro cepas de *Pseudomonas putida* y de *Acinetobacter sp.* LMG 1056 en la mira de aplicarlas en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, es necesario considerar los elementos que condicionan el éxito de un sistema de biorremediación (figura 35).

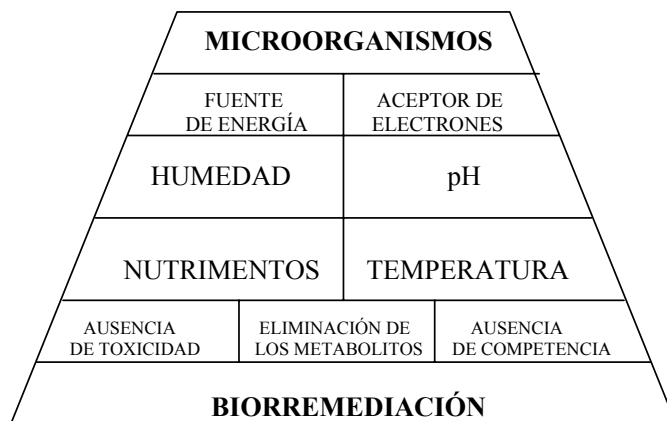


Fig. 34 : Elementos constitutivos de la biorremediación (Cookson, 1995).

### VI.1.a. La importancia del pH como parámetros indicador de la actividad metabólica

El pH de los medios se ajusta a 7 debido a que las bacterias de los géneros *Acinetobacter* y *Pseudomonas* son neutrófilas y que su pH óptimo de crecimiento es 7. La mayoría de las bacterias crecen a este pH debido a que es equivalente al pH interno de las células, que se mantiene por medio de un intercambio de iones entre el medio y la célula con el fin de mantener un equilibrio osmótico (Madigan ; Martinko ; Parker, 1999).

El pH del medio es por lo general modificado por los microorganismos contenidos en este. Según las fuentes de energía disponibles y su metabolismo, el medio puede acidificarse o alcalinizarse. El pH puede disminuir si existe un metabolismo que genere ácidos orgánicos como en el caso de la metabolización de los hidrocarburos ;



puede aumentar si se produce amoníaco tras el consumo de aminoácidos (Prescott ; Harley ; Klein, 1995).

Como se describió, la actividad metabólica de los microorganismos puede ser responsable del cambio de pH y este cambio puede desde entonces utilizarse como indicador de un cambio metabólico en el cultivo. Para los ensayos en erlenmeyers, sólo los consumos de glucosa por *Pseudomonas putida* y los de hexadecano y glucosa por *Acinetobacter* fueron confirmados mediante un cambio de pH.

Contrariamente a los ensayos en erlenmeyers, los ensayos en reactor permitieron regular varios parámetros. La modificación del pH en los medios se corrige al agregar base, la cual se convierte en el parámetro que permite cuantificar la actividad metabólica. Incluso si la viabilidad no aumenta significativamente, los mililitros de base agregados confirman que un metabolismo tiene lugar.

#### **VI.1.b. La importancia de la temperatura para el crecimiento bacteriano**

La temperatura juega un papel importante para el crecimiento de las bacterias. Constituyen microorganismos unicelulares poiquilotérmicos muy sensibles a los cambios de temperatura debido a que la estabilidad de sus proteínas de membrana y de la actividad enzimática interna depende de la temperatura del medio (Prescott ; Harley ; Klein, 1995). Durante los cultivos en erlenmeyers o en reactor la temperatura se mantienen a 30 °C. En un ambiente natural como el suelo, pueden observarse grandes fluctuaciones de temperatura.

Con el fin de simular las condiciones de cultivo a las que se encontrarían presentes en un sitio contaminado sujeto a las fluctuaciones de temperatura, los ensayos en suelo fueron realizados a 20 °C ( $\pm 5$  °C). La temperatura influencia las velocidades de las reacciones fisiológicas así como las características físico-químicas que conllevan consecuencias sobre la actividad metabólica de los microorganismos y, de este modo, sobre las actividades de biotransformación de los sustratos (su velocidad se duplica por cada aumento de 10 °C entre 5 y 30 °C) (Ballerini ; Gatellier ; Vogel, 1998). Las fluctuaciones de las curvas de DBO y de viabilidad pueden, como consecuencia, asociarse con las fluctuaciones de temperatura en el laboratorio, entre otros,.

#### **VI.1.c. Importancia de la disponibilidad de oxígeno para la actividad metabólica y el crecimiento**

La oxigenación constituye también un factor importante en lo que concierne el metabolismo de degradación de los hidrocarburos por las cepas aerobias como *Acinetobacter sp.* y *Pseudomonas putida*. El oxígeno constituye un aceptor de electrones que debe inyectarse al medio líquido de manera que la población contenida en este último pueda activar su metabolismo y sobrevivir (Ballerini ; Gatellier ;

Vogel, 1998). La transferencia de oxígeno de la fase gaseosa a las fase líquida se ve favorecida por una agitación (presente a 200 rpm para los erlenmeyers y a 500 rpm para los reactores). Una velocidad de agitación demasiado elevada puede dificultar la estabilización de las bacterias sobre los sustratos por degradar (Hori, *et al.*, 2002).

En erlenmeyer, la disponibilidad de aire puede maximizarse mediante una agitación constante pero sobre todo, utilizando una proporción suficientes entre el volumen de medio y el de aire. Mientras que una proporción de 1:4 se utiliza en la mayoría de los artículos, una proporción de 1:1 fue utilizada en este estudio. La ausencia de crecimiento en los erlenmeyers podría explicarse por una limitación de la cantidad de oxígeno presente en estos (Moriya ; Horikoshi, 1993 ; Marín *et al.*, 1995 ; Leahy ; Tracy ; Eley, 2003).

En los reactores, el aire estéril se inyecta con un débito de un litro por minuto. Si la velocidad de metabolización de la fuente de energía es superior a la velocidad de transferencia del oxígeno al medio, una disminución de la concentración en oxígeno disuelto puede observarse. Esta se detecta mediante una sonda para pO<sub>2</sub> (Bréand, 1998). La medida de la pO<sub>2</sub> puede por lo tanto considerarse como un parámetro indicador de una actividad metabólica de las bacterias sobre los hidrocarburos probados.

La demanda bioquímica de oxígeno (DBO) consiste en una medida indirecta de la cantidad de materia orgánica oxidable por los microorganismos presentes en un medio (Madigan ; Martinko ; Parker, 1999). Constituye un parámetro que indica si está ocurriendo una actividad metabólica o no en un sistema herméticamente cerrado.

Para los ensayos en el suelo, la aireación no es indispensable debido a que los poros que existen entre las partículas de suelo y entre los agregados formados por las primeras, contienen normalmente, humedad y aire en suficiencia. Un problema de disponibilidad de oxígeno o de aire puede sin embargo existir según la textura del suelo debido a que algunos tipos de partículas (suelo arcilloso) tiene tienden a formar agregados más compactos que otros (suelo arenoso). Si un suelo se compone de varios tipos de partículas, la actividad de los microorganismos puede ser diferente según si el inóculo se localiza en una zona más o menos compacta del suelo (Ballerini ; Gatellier ; Vogel, 1998).

#### **VI.1.d. La importancia de la disponibilidad de la fuente de carbono y de energía para el metabolismo y el crecimiento bacterianos**

Una última condición esencial para el crecimiento de los microorganismos es la disponibilidad de la fuente de energía. Incluso si todas las condiciones anteriores son óptimas, si el hidrocarburo no se encuentra disponible para los microorganismos, no se observará ningún crecimiento. El carácter hidrófobo de los hidrocarburos dificultan su degradación (Hori, *et al.*, 2002). En el caso de los hidrocarburos

volátiles, los ensayos fueron realizados en erlenmeyers herméticamente cerrados con el fin de mantener la fuente de carbono en el medio. Sin embargo, su baja solubilidad en el agua provoca que una gran parte del hidrocarburo no se disuelve en el medio de cultivo sino que se presenta más bien bajo una forma de emulsión (Schwartz ; Bar, 1995). Los compuestos volátiles pasan a la fase gaseosa y dejan de estar disponibles para los microorganismos.

Un emulsificante puede ser sintetizado y actuar sobre el sustrato con el fin de aumentar la superficie de intercambio con la fase acuosa. Este emulsificante se produce por lo general al final de la fase exponencial de crecimiento, después de que las bacterias sean estimuladas por el contacto con un sustrato hidrófobo (Ron ; Rosenberg, 2002). Las figuras 12, 15 y 17 presentan las bacterias *Acinetobacter sp.* LMG 1056 sobre las emulsiones de hidrocarburo. Este contacto constituye la primera etapa para la degradación y le sigue a este una producción de biosurfactante que modificará el comportamiento de los hidrocarburos y de las bacterias con :

- La formación de micelas que aumentan la solubilidad acuosa aparente de los hidrocarburos y los vuelven de esta manera también, más accesibles para las células de superficie esencialmente hidrófila.
- El aumento de la hidrofobia de la superficie celular (por la liberación de los lipopolisacáridos de la membrana exterior) que aumenta la adhesión de las células a los sustratos hidrófobos. Las células hidrófobas tienden a formar agregados para evitar el contacto con el medio acuoso (Al-Tahhan, *et al.*, 2000).

En el caso de los ensayos sobre suelo, los hidrocarburos se encuentran sólidamente adsorbidos a las partículas del suelo y su movilidad así como su accesibilidad disminuyen fuertemente (Márquez ; Hernández ; Lamela, 2001 ; Cassidy ; Irvine, 1998). Además, la estabilización de las bacterias sobre la superficie de las partículas del suelo que presentan una adsorción de hidrocarburos se vuelve más difícil (Ballerini ; Gatellier ; Vogel, 1998).

En lo que concierne la interacción entre el agente contaminante y el microorganismo, deben de tomarse en cuenta varias posibilidades : si las moléculas se encuentran demasiado expuestas, pueden ser tóxicas para los microorganismos ; por otro lado, si la contaminación está fuertemente adsorbida a las partículas del suelo, las células podrían degradarla con menos eficacia. Este particularidad podría explicar en parte, la diferencia que aparece entre los cultivos en suelo y aquellos en lodo (Schwartz ; Bar, 1995).

Sobre el suelo, no hay una agitación que garantice la homogeneidad del sistema, y la contaminación se encuentra probablemente adsorbida a las partículas de suelo. El agente contaminante se encuentra por lo tanto menos expuesto al metabolismo de *Acinetobacter sp.* pero este se encuentra sobre todo menos expuesto a la toxicidad del contaminante (Stelmack ; Gray ; Pickard, 1999). Es probable que una fracción

residual de la contaminación persista en el suelo después de la intervención de la bacteria debido a la adsorción del contaminante sobre las partículas del suelo (Nocentini ; Pinelli ; Fava, 2000).

En el caso de los lodos, la agitación y la dilución del suelo contaminado favorecen la resuspensión del contaminante. La población presenta en el lodo dos opciones de degradación : un consumo del contaminante accesible bajo forma acuosa y un consumo del contaminante adsorbido a las partículas del suelo. Presentan sin embargo, un acceso gradual al contaminante y logran degradarlo más eficazmente (Schwartz ; Bar, 1995).

## **VI.2. MEDIDA DE LA VIABILIDAD DE LAS POBLACIONES**

La viabilidad constituye un parámetro determinante para el estudio de la biorremediación. Descubrir cepas de bacterias que toleren la presencia de los contaminantes es casi igual de importante que encontrar microorganismos que degradan los hidrocarburos. Si existe una población tolerante a la contaminación, esta contaminación puede participar en la recuperación del equilibrio del sitio contaminado (Davids ; Flemming ; Wilderer, 1998). Sin embargo, el objetivo de este trabajo fue utilizar cepas que toleraran y degradaran la contaminación así como cuantificar esta degradación. Lo ideal sería obtener una degradación sin necesidad de agregar fuentes de carbono suplementarias o inductores de degradación y solamente los nutrientes inorgánicos necesarios para el metabolismo (Leahy ; Tracy ; Eley, 2003).

### **VI.2.a. La densidad óptica**

La densidad óptica constituye la capacidad de una sustancia material para disminuir la intensidad de un haz luminoso con determinada longitud de onda que la atraviese (ULP, 2003). El crecimiento de una población arrastra la opacificación del medio de cultivo de manera tal que sólo una parte de la intensidad del rayo de luz incidente sea transmitida por el medio. Esta medida permite conocer la cinética de crecimiento de una población pero presenta el inconveniente de que el espectrofotómetro presenta un punto mínimo de detección que no detecta el crecimiento antes de que la concentración supere los  $10^6$  UFC/ml (Bréand, 1998).

### **VI.2.b. Los plaques**

Los plaques permiten conocer la evolución de la concentración en células viables de los medios de cultivo. La variación de la viabilidad permite evidenciar el crecimiento y de este modo la metabolización de los hidrocarburos. Permite también evaluar la toxicidad de los agentes contaminantes (Madigan ; Martinko ; Parker, 1999).

El metabolismo de los hidrocarburos implica la producción de un emulsificante que tiende a cambiar la hidrofobia de las superficies celulares de manera que las células se ensamblen formando agregados (Al-Tahhan, *et al.*, 2000). Resulta imposible prever cómo serán distribuidos los agregados del cultivo en las diluciones sucesivas realizadas para medir la viabilidad.

En lo que respecta los plaques efectuados a partir de las muestras tomadas de los suelos y los lodos, otro error puede aparecer y se atribuye a la adsorción de la biomasa sobre las partículas del suelo.

### **VI.2.c. El peso seco**

El aumento de la densidad óptica y del número de UFC/ml disponibles en el medio a lo largo del tiempo muestra que existe una población en crecimiento en el medio. Sin embargo, este crecimiento que tiene lugar debido al consumo del hidrocarburo presente como única fuente de carbono y de energía, debe acompañarse de un aumento de la concentración de biomasa expresada en gramos por litro de materia seca. La determinación de los pesos secos permite verificar que la energía aportada por el hidrocarburo es suficiente para la producción de biomasa.

## **VI.3. MEDIDA DE LA DEGRADACIÓN DE LOS HIDROCARBUROS PUROS Y DEL DIESEL**

El pH, el consumo de base y la  $pO_2$  ya fueron presentados como parámetros indicadores del metabolismo de las bacterias sobre los hidrocarburos presentes en los diferentes medios. Sin embargo, es la disminución de la concentración de este hidrocarburo a lo largo del tiempo lo que permitirá confirmar que los cambios de los parámetros mencionados se encuentren ligados a una actividad metabólica específica. Esta disminución fue cuantificada por dos métodos: el método gravimétrico y el método enzimático 10050 de HACH.

### **VI.3.a. Método gravimétrico**

Este método aprovecha la miscibilidad entre los hidrocarburos probados y el hexano. Cuando este último se agrega a la muestra del medio de cultivo, separa y acapara el hidrocarburo del medio. La concentración inicial de los hidrocarburos podría recuperarse si tres extracciones fueran realizadas en vez de dos. Sin embargo, el problema reside esencialmente en la toma de muestra a partir de una fase heterogénea que no permite una extracción cuantitativa. El método enzimático es preferible para

la cuantificación de los hidrocarburos volátiles pero presenta igualmente algunos inconvenientes.

### **VI.3.b. Método enzimático**

El método de immunoassay para TPH permite detectar la presencia de bajas concentraciones de hidrocarburo presentes en las muestras acuosas o de suelo. El hidrocarburo contenido en la muestra reacciona, en presencia de metanol y de un conjugado enzimático, con el anticuerpo que cubre el interior de las celdas. Los productos de esta reacción pueden colorearse con una solución de desarrollo de color seguido por una solución fijadora con el fin de realizar una lectura al espectrofotómetro.

Esta técnica es muy simple y permite tratar varias muestras a la vez y obtener resultados en menos de media hora. Sin embargo, la técnica presente un inconveniente debido a su sensibilidad. Debido a que el kit fue concebido para detectar trazas de TPH de 1,5 a 10 ppm, según el hidrocarburo, las muestras deben diluirse previo a la prueba. Esta dilución arrastra una imprecisión debido a la heterogeneidad de las muestras.

En cuanto a los ensayos en suelo, debido a la ausencia de técnicas tradicionales de cuantificación de los hidrocarburos, el método 10050 de HACH constituye una excelente herramienta de medida semi-cuantitativa debido a que sólo proporciona un rango de concentración con respecto a los resultados de los estándares.

## **VI.4. LA DEGRADACIÓN DE LOS HIDROCARBUROS POR *Pseudomonas putida* EN MEDIO ACUOSO**

Las cepas DSMZ 6414, DSMZ 6899 y ATCC 39213 son presentadas en los catálogos de las colecciones como capaces de utilizar y metabolizar el tolueno. Las dos primeras serían incluso capaces para degradar el benceno y el xileno, respectivamente (DSMZ, 1998 ; ATCC, 1992). La cepa LMG 2257 es seleccionada como capaz de degradar los hidrocarburos aromáticos (sin especificar) (BELSPO, 2003).

Las especies del género *Pseudomonas* son en general utilizadas para la degradación de los hidrocarburos (Al-Tahhan, *et al.*, 2000) y reconocidas más particularmente para sus capacidades para degradar los hidrocarburos aromáticos monocíclicos como el benceno y el tolueno debido a que presentan las oxigenasas que catalizan las etapas iniciales aerobias de degradación de estos hidrocarburos. Como mencionado, la falta de oxígeno es probablemente responsable por la ausencia de resultados significativos en los cultivos de las *Pseudomonas putida* en erlenmeyers (Allen, *et al.*, 1999).

Incluso si varios autores coinciden sobre la capacidad de *Pseudomonas putida* para degradar el tolueno, Schwartz y Bar (1995) mostraron que esta especie puede degradar el tolueno inyectado al reactor en forma de fase gaseosa pero que desaparece en el momento en el que se encuentra en presencia de tolueno en fase líquida. La presencia de tolueno sin disolver en el reactor sería suficiente para eliminar inmediatamente la población de la cepa LMG 2257, lo cual explicaría los resultados obtenidos.

Otra explicación podría ser que la metabolización de estos hidrocarburos necesita fases de adaptación más largas para inducir la síntesis de la maquinaria enzimática. La información que codifica para la degradación del tolueno podría también estar contenida en un plásmido inestable en ausencia de la presión de selección en los precultivos utilizados para preparar los gliceroles.

La actividad metabólica de las bacterias sobre el tolueno implica su degradación así como en parte también, su acumulación en la célula. Cuando la concentración de tolueno es demasiado elevada, este podría resultar tóxico incluso para los microorganismos capaces de degradarlo debido a que los límites de acumulación celular fueron sobrepasados. Es probable que la concentración de tolueno del medio haya sido demasiado elevada con respecto a la capacidad de acumulación de *Pseudomonas putida* LMG 2257 y que la acumulación excesiva haya provocado una lisis casi inmediata (Hubert ; Shen ; Voordouw, 1999).

Visto el carácter altamente volátil del tolueno, su degradación debería probarse en presencia de un microorganismo anaerobio de manera que el tolueno sea enteramente degradado son riesgos de pérdida por la aireación (Beller *et al.*, 1996 ; Burland ; Edwards, 1999 ; Cervantes *et al.*, 2001). También debe ser concebible la puesta en marcha de un tratamiento aerobio utilizando una trampa con carbono activado u otra estructura similar de manera que el tolueno se atrape y libere gradualmente al medio (Li *et al.*, 2002).

En el caso del diesel, *Pseudomonas putida* LMG 2257 probablemente utilizó una fracción de este como fuente de carbono y de energía. Es importante mencionar que el diesel contiene varias formas de hidrocarburos (Olson *et al.*, 1999) y que la cepa posee la maquinaria enzimática para utilizar algunos compuestos del diesel.

#### **VI.5. LA DEGRADACIÓN DE LOS HIDROCARBUROS POR *Acinetobacter sp.* LMG 1056**

Varias cepas de *Acinetobacter sp.* son reconocidas por poseer la maquinaria enzimática para degradar los alcanos líquidos y sólidos que contienen de 13 a 44 átomos de carbono (Sakai *et al.*, 1994) en su estado puro o bajo forma de mezclas (Marín *et al.*, 1995 ; Hanson *et al.*, 1996 ; Hanson *et al.*, 1997).

### VI.5.a. Degradación de los hidrocarburos por *Acinetobacter sp.* LMG 1056 en medio acuoso

La capacidad de utilizar los alcanos lineales de más de 10-12 átomos de carbono gracias a la producción de emulsificante es típica de las cepas de *Acinetobacter* (Marín ; Pedregosa ; Laborda, 1996). Los alcanos son los hidrocarburos más susceptibles a la biodegradación (Olson *et al.*, 1999). Entre ellos, el hexadecano acostumbra utilizarse como sustrato selectivo para aislar cepas que degraden los alcanos (Wrenn ; Venosa, 1996 ; Lepo *et al.*, 2001). Este alcano también se utiliza para estudiar el comportamiento de las cepas productoras de bioemulsificantes (Al-Tahhan *et al.*, 2000). La accesibilidad de las bacterias al hexadecano explica el importante crecimiento de *Acinetobacter sp.* LMG 1056 sobre este alcano.

Siendo la accesibilidad de la cepa a la fuente de carbono una condición indispensable a la degradación de este, es extraño no haber observado una evolución significativa de los parámetros del cultivo de la cepa LMG 1056 en presencia de decano. La figura 17 presenta sin embargo claramente la presencia de *Acinetobacter sp.* sobre las emulsiones de decano. Hori, *et al.* (2002) señalan que *Acinetobacter sp.* se instala sobre las grandes emulsiones de los hidrocarburos para degradarlos. Esta adhesión se ve complementada con la producción de un emulsificante que permite el ensamble de un biofilm estabilizado sobre el hidrocarburo por degradar (Marín ; Pedregosa ; Laborda, 1996). El decano no constituye, al parecer, un sustrato utilizable por *Acinetobacter sp.* bajo las condiciones propuestas. Puede ser que en presencia de un alcano que contiene más átomos de carbono, como el tetradecano (C<sub>14</sub>H<sub>30</sub>), la degradación del decano haya podido favorecerse (Cookson, 1995).

El cometabolismo consiste en un metabolismo concomitante de dos sustratos, uno de ellos permite a la célula obtener energía para el crecimiento mientras que el otro es metabolizado en paralelo sin que aporte ningún elemento indispensable para esta. Si los sustratos son de naturaleza similar, ocurrirá una degradación preferencial y el sustrato principal puede en mismo tiempo preparar a la bacteria para la degradación del co-sustrato (Allen, *et al.*, 1999).

La glucosa y los hidrocarburos constituyen dos fuentes de energía carbonadas de modo que no puede hablarse de un verdadero cometabolismo. La glucosa es un sustrato completamente hidrófilo mientras que el hidrocarburo es de naturaleza hidrófoba y menos accesible para los microorganismos. Sería preferible utilizar un alcano de fácil degradación en vez de la glucosa, ya que esta última no indujo al parecer la bacteria a producir el emulsificante que le permita degradar el tolueno o el octano (Franzmann *et al.*, 2002).

Leahy, Tracy et Eley (2003) aislaron una cepa de *Acinetobacter* sobre un medio enriquecido con tolueno y estireno. Este género puede por lo tanto contener la maquinaria enzimática necesaria para descomponer el tolueno. Con el fin de mantener este hidrocarburo en el medio, ensayos de degradación fueron realizados



sobre mezclas binarias de solventes orgánicos, es decir, agregando al cultivo que contiene tolueno, una fracción despreciable de hexadecano. Este compuesto poco volátil no se presentó en suficiencia en el medio como para garantizar el crecimiento de los microorganismos pero en cantidad suficiente como para mantener el tolueno en el cultivo (Hubert ; Shen ; Voordouw, 1999). Esto podría probarse para *Acinetobacter sp.* LMG 1056.

#### **VI.5.b. Degradación del diesel por *Acinetobacter sp.* LMG 1056 en suelo y lodo**

Como lo mostraron las observaciones durante el seguimiento del crecimiento de *Acinetobacter sp.* LMG 1056 sobre suelo o lodo artificialmente contaminados con diesel, cuando una contaminación tiene lugar sobre un sitio, la diversidad de la población disminuye a lo largo del tiempo (Venosa *et al.*, 1999).

En lo que concierne la degradación del diesel presente en el suelo y en el lodo, el residuo después de 28 días de seguimiento es inferior en este último, lo cual sugiere que se da una degradación más rápida y eficaz del diesel por la población presente en un medio acuoso más homogéneo. Ha de considerarse que cualquier contaminación presenta una residualidad potencial (de Carvalho, 2002). La ventaja de un tratamiento en lodo es que la mezcla en agua implica una dilución de la concentración del diesel y reduce la toxicidad. El lodo constituye un tratamiento *ex situ* que implica un costo y un volumen superior por tratar que en un tratamiento *in situ* (Ballerini ; Gatellier ; Vogel, 1998).

La mayor parte de la contaminación con hidrocarburos se encuentra en la fase líquida no-acuosa (NAPL) del suelo y forma sobre las partículas de suelo, gotas o películas difícilmente accesibles para los microorganismos, contrariamente a la fracción de hidrocarburos disuelta en la fase acuosa del suelo. Sin embargo pueden separarse de la NAPL de manera que pueda establecerse una interacción directa entre los microorganismos y la contaminación. Esta separación se ve favorecida por la presencia de un surfactante que puede ser nociva para la microflora del suelo (Stelmack ; Gray ; Pickard, 1999).

El éxito de la degradación realizada por los microorganismos en el suelo depende de varios factores que favorecen esta actividad. Ante todo, una población inoculada en un suelo es susceptible al ataque de protozoarios contenidos en este (Acea ; Moore ; Alexander, 1988). Además de esta susceptibilidad de los microorganismos antes los predadores del suelo, es probable que no utilicen el contaminante sino una fuente alternativa de energía presente en el medio o que sean incapaces de moverse en el suelo par buscar del contaminante por degradar.

En general, cuando una bioaumentación no presenta resultados satisfactorios, no son las capacidades biorremediantes de la cepa las que son puestas en duda sino sobre todo, la biodisponibilidad del contaminante, la cual en el caso de los hidrocarburos, se

encuentra limitada por la transferencia de masa (Márquez ; Hernández ; Lamela, 2001). La difusión de los hidrocarburos depende de la formación de micelas así como de la interacción entre las células y estas últimas. En el suelo, las bacterias deben tener acceso a los hidrocarburos disueltos en la fase acuosa o presentarse en la interfase NAPL-agua (Stelmack ; Gray ; Pickard, 1999).

Con el fin de probar la degradación del diesel por bioestimulación, sería interesante agregar un emulsificante capaz de liberar las moléculas de hidrocarburo adsorbidos sobre las partículas del suelo (Rahman, *et al.*, 2001) o considerar una fertilización orgánica o inorgánica que satisfaga las necesidades de la población microbiana (Swannell *et al.*, 1999).

## **VIII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

La construcción de un consorcio de bacterias que pueda restaurar el equilibrio de un sitio contaminado con hidrocarburos implica la adaptación de las cepas a las diferentes condiciones ambientales presentes y sobre todo, a la accesibilidad a la fuente de carbono y de energía. Con el fin de evitar la utilización de agentes de superficie sintéticos, se recomienda utilizar cepas que produzcan bioemulsificantes que faciliten el acceso a las moléculas hidrófobas y así su degradación.

Los estudios en erlenmeyers presentan un inconveniente con respecto a la disponibilidad de oxígeno y la posibilidad de medida de diferentes parámetros. Por el contrario, los cultivos en reactor pueden estudiarse al controlar varios parámetros que permiten determinar la presencia de un crecimiento bacteriano así como de una actividad metabólica de degradación de los hidrocarburos. En lo que concierne los estudios en suelo y en lodo, el control de los parámetros sobre estos sistemas resulta menos cómodo pero el seguimiento de la DBO y de la concentración en hidrocarburos permiten determinar el potencial de degradación de las bacterias seleccionadas en el caso de un tratamiento por biorremediación *in situ* y *ex situ*.

La degradación de los hidrocarburos sigue siendo el parámetro más difícil de determinar debido a la volatilidad de algunos hidrocarburos y la adsorción de otros a las partículas del suelo. Resta por conocer qué fracción(es) del diesel es(son) metabolizada(s) y cuáles son los productos de la actividad metabólica sobre los hidrocarburos estudiados. Sin embargo, el método enzimático TPH Immunoassay method (HACH) constituye una herramienta que satisface las necesidades de cuantificación.

Aunque *Pseudomonas putida* aparece en la literatura como una de las responsables de la degradación de varios hidrocarburos aromáticos monocíclicos, ninguna manifestación de esta capacidad pudo ser determinada en este trabajo. Sería recomendado realizar cultivos sucesivos en presencia de hidrocarburos para poder mantener la presión de selección con respecto a la actividad metabólica deseada. La cepa LMG 2257 podría sin embargo participar en la degradación de una fracción del diesel.

Fue posible detectar la actividad metabólica de *Acinetobacter sp.* LMG 1056 sobre el hexadecano y el tolueno en reactor así como sobre el diesel en reactor y sobre un suelo contaminada artificialmente. El octano parece constituir un hidrocarburo tóxico para esta cepa pero la degradación del decano podría lograrse en presencia de un co-substrato hidrófobo con más átomos de carbono.

La capacidad de degradación de los hidrocarburos por *Pseudomonas putida* podría probarse en presencia de *Acinetobacter sp.*. Los diferentes ensayos realizados confirman que esta cepa constituiría un candidato ideal para la composición de consorcios bacterianos capaces de degradar los hidrocarburos en medio acuoso o sólido.

## **VIII. ANEXOS**

## Anexo 1

### Medios de cultivo empleados en la investigación

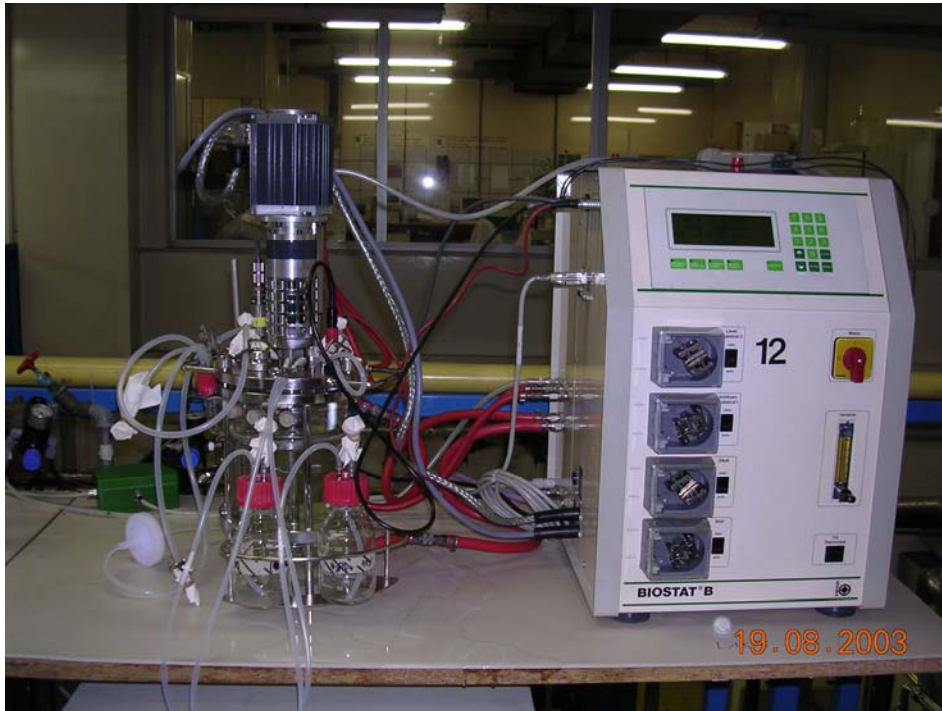


De izquierda a derecha :

- Dos veces 100 ml de medio LB líquido en erlenmeyers de 250 ml
- Medio MM2 para los ensayos con hidrocarburos en los erlenmeyers y biorreactores
- Placas de Petri desechables con 20 ml de medio LB sólido cada una

## Anexo 2

### Biorreactor BIOSTAT®B de dos litros



#### El biorreactor está dividido en dos partes:

##### Recipiente de dos litros (izquierda):

- Rotor (arriba en negro y gris)
- Refrigerante (doble pared del recipiente y columna central del recipiente)
- Sondas de pH, temperatura y pO<sub>2</sub> (cableado negro con etiquetas amarilla y roja)
- Inyección de aire estéril (tubería blanca con filtro)
- Sistema de suministro de ácido-base-antiespumante por goteo (botellitas frente al recipiente y conectadas a este por medio de tuberías delgadas)

##### Sistema de calibrado y lectura (derecha)

- Pantalla que muestra condiciones de cultura (espacio verde oscuro)
- Motores reguladores del suministro de ácido-base-antiespumante (en columna, casillas grises con interruptores negros)
- Regulador del suministro de aire estéril (columna amarilla bajo la manecilla roja de encendido)

### Anexo 3

#### Autoclave y Olla de presión empleadas para la esterilización



#### Autoclave



#### Olla de presión



## Anexo 4

### Espectrofotómetro utilizado para las lecturas de absorbancia



## Anexo 5

### Utensilios utilizados para el sembrado o plaqueo de las bacterias



De izquierda a derecha :

- Vortex azul para homogeneizar las muestras y las diluciones
- Pipetas de 1 ml para preparar las diluciones
- Pipetas de 0,5 ml para sembrar 0,1 ml por placa de Petri
- Tubos de ensayo para preparar las diluciones
- Mechero Bünsen para esterilización a la flama
- Placas de Petri sobre mesa rotatoria
- Beaker con alcohol puro para esterilización del rastrillo

## Anexo 6

### Centrifugadoras empleadas durante el estudio



Para densidad óptica indirecta



Para determinar glucosa



Para lavado y peso seco

## Anexo 7

### Rotavapor utilizado para el método gravimétrico



De izquierda a derecha :

- Botella de hexano
- Agitador magnético
- Balón de fondo redondo tarado
- Rotavapor

## Anexo 8

### Detalles del método enzimático



Reactivos, calibradores y pipetas



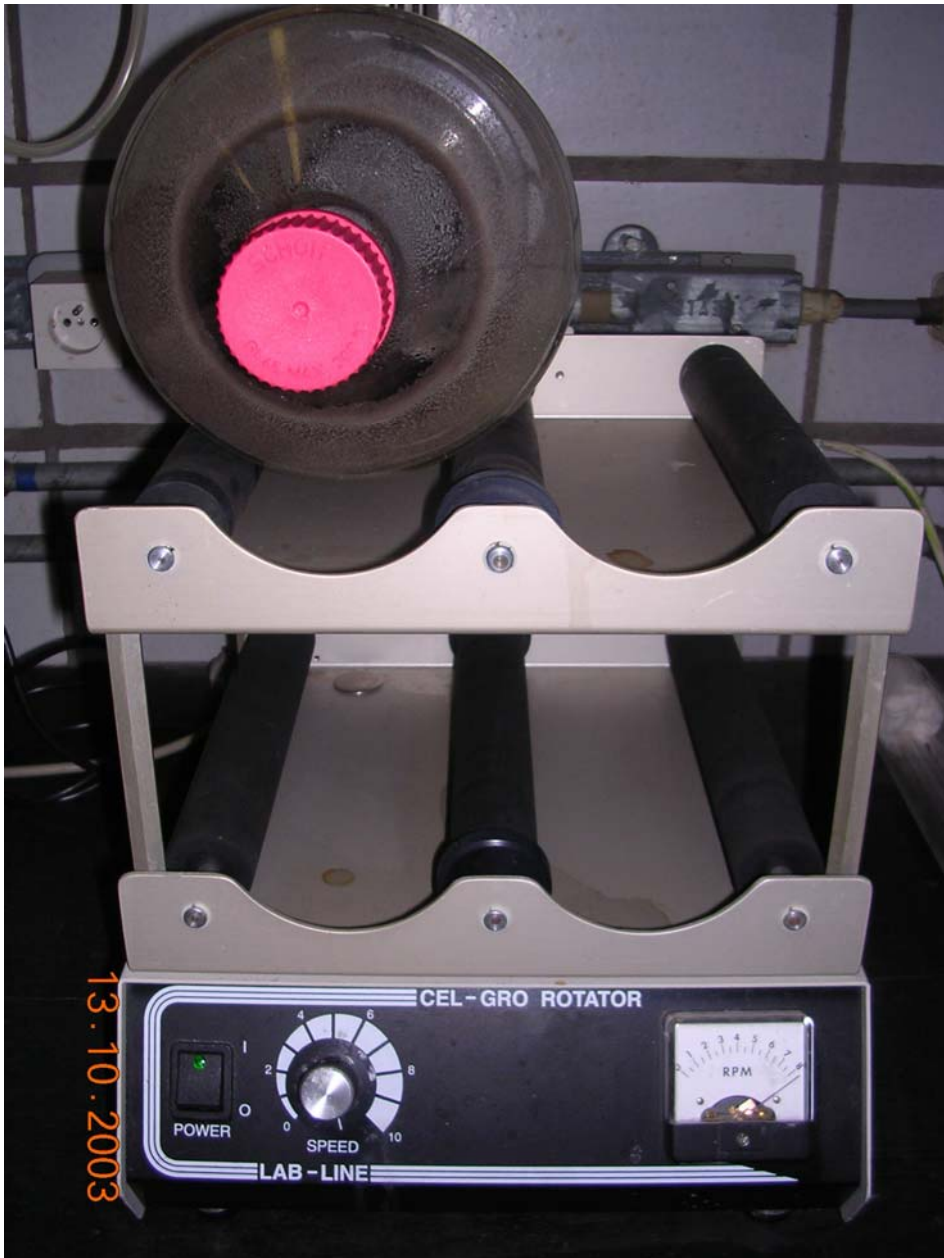
Resultado de la reacción colorimétrica



Espectrofotómetro HACH

## Anexo 9

### Roller Bottle para homogeneizar diesel en el suelo

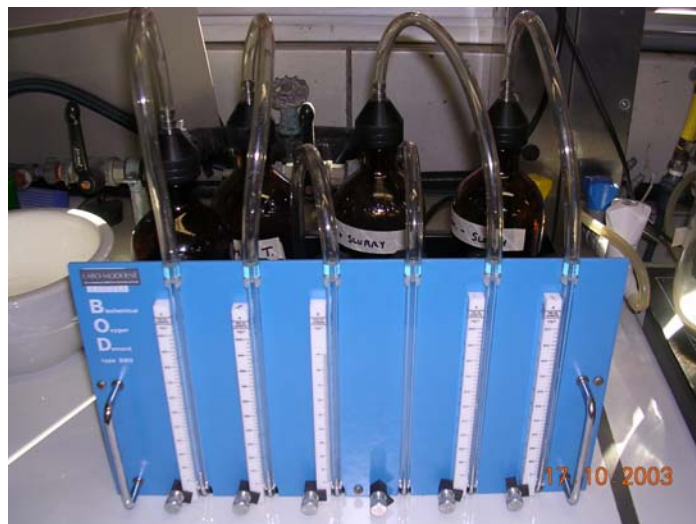


## Anexo 10

### Sistemas de lectura de Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO)



**OxiTop® OC110**



**VELP Scientifica**

## **IX. BIBLIOGRAFÍA**



## A

1. ABDEL-EL-HALEEM, D.. 2003. *Acinetobacter*: environmental and biotechnological applications. African Journal of Biotechnology. 2(4):71-74.
2. ACEA, M. ; MOORE, C. ; ALEXANDER, M.. 1988. Survival and growth of bacteria introduced into soil. Soil Biol. Biochem.. 20(4):509-515.
3. AITKEN, M.. 1998. Mechanisms of organic pollutant transformation and degradation by microorganisms. En : Bioremediation : Principles and Practice. Volumen I : Fundamentals and Applications. Editado por Sikdar, S. e Irvine, R.. Technomic Publication. Pennsylvania, Estados Unidos. p. 333-383.
4. ALLEN, C. ; BOYD, D. ; HEMPENSTALL, F. ; LARKIN, M. ; SHARMA, N.. 1999. Contrasting effects of a nonionic surfactant on the biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons to cis-dihydrodiols by soil bacteria. Applied and Environmental Microbiology. Estados Unidos. 65(3):1335-1339.
5. AL-TAHHAN, R. ; SANDRIN, T. ; BODOUR, A. ; MAIER, R.. 2000. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa* : Effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. Applied and Environmental Microbiology. Estados Unidos. 66(8):3262-3268.
6. ATCC. 1992. Catalogue of bacteria & bacteriophages. 18ème ed. American Type Culture. Maryland, Estados Unidos. p. 260.

## B

7. BALBA, M. ; AL-AWADHI, N. ; AL-DAHER, R.. 1998. Bioremediation of oil-contaminated soil : microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. Journal of Microbiological Methods. 32:155-164.
8. BALLERINI, D. ; GATELLIER, C. ; VOGEL, T.. 1998. Techniques de traitement par voie biologique de sols pollués. Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie. Angers, Francia. p. 18-157.
9. BELLER, H. ; SPORMANN, A. ; SHARMA, P. ; COLE, J. ; REINHARD, M.. 1996. Isolation and characterization of a novel toluene-degrading sulphate-reducing bacterium. Applied and Environmental Microbiology. Estados Unidos. 62(4):1188-1196.
10. BELSPO. 2003. *Pseudomonas putida* (Trevisan 1889) Migula 1895 AL. Strains Details, Belgian Federal Science Policy Office. Bruselas, Bélgica. Consultado el 25 de noviembre del 2003. Disponible en [http://www.belspo.be/bccm/db/bacteria\\_details2.asp?NUM=2257](http://www.belspo.be/bccm/db/bacteria_details2.asp?NUM=2257).

11. BREAND, S.. 1998. Etude biométrique de la réponse d'une population bactérienne à une variation défavorable de température ou de pH : Applications en microbiologie prévisionnelle alimentaire. Laboratoire Biométrie – Génétique et Biologie des Populations, Université Claude Bernard. Lyon, Francia. Consultado el 19 de noviembre del 2003. Disponible en <http://biomserv.univ-lyon1.fr/txt/doc/THESES/BREAND/TheseBRES.pdf>.
12. BURLAND, S.; EDWARDS, E.. 1998. Anaerobic benzene biodegradation linked to nitrate reduction. *Applied and Environmental Microbiology*. Estados Unidos. 65(2):592-533.

## C

13. CAPRETTE, D.. 2000. Substrate oxidation : Krebs reaction. Rice Unix Facility, Rice University. Houston, Estados Unidos. Consultado el 9 de diciembre del 2003. Disponible en <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/mitochondria/mitokrebs.html>.
14. CASSIDY, D. ; IRVINE, R.. 1998. Interactions between organic contaminants and soil affecting bioavailability. En : *Bioremediation : Principles and Practice*. Volumen I : Fundamentals and Applications. Editado por Sikdar, S. e Irvine, R.. Technomic Publication. Pennsylvania, Estados Unidos. p. 259-282.
15. CERVANTES, F. ; DIJKSMA, W. ; DUONG-DAC, T. ; IVANOVA, A. ; LETTINGA, G. ; FIELD, J.. 2001. Anaerobic mineralization of toluene by enriched sediments with quinines and humus as terminal electron acceptors. *Applied and Environmental Microbiology*. Estados Unidos. 67(10):4471-4478.
16. COOKSON, J.. 1995. *Bioremediation engineering : design and application*. McGraw-Hill. Estados Unidos. p. 15, 96-109.

## D

17. DAVIDS, L. ; FLEMMING, H.C. ; WILDERER, P.. 1998. Microorganisms and their role in soil. En : *Bioremediation : Principles and Practice*. Volumen I : Fundamentals and Applications. Editado por Sikdar, S. e Irvine, R.. Technomic Publication. Pennsylvania, Estados Unidos. p. 283-332.
18. DE BROUWER, C.. 2002. *Métabolisme des substances toxiques*. Faculté de Médecine, Université Libre de Bruxelles. Bruselas, Bélgica. Consultado el 23 de octubre del 2003. Disponible en <http://www.ulb.ac.be/esp/lsttm/coursedb/metabolisme.html>.

19. DE CARVALHO, J.. 2002. Atividade microbiana e diversidades metabólica e genética em solo de mangue contaminado com petróleo. Escuela Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidad de Sao Paulo. Piracicaba, Brasil.
20. DSMZ. 1998. Catalogue of strains. 6ème ed. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. Braunschweig, Alemania. p. 134, 295, 302.

## F

21. FRANZMANN, P. ; ROBERTSON, W. ; ZAPPIA, L. ; DAVIS, G.. 2002. The role of microbial populations in the containment of aromatic hydrocarbons in the subsurface. *Biodégradation. Paises Bajos.* 13:65-78.

## G

22. GREENE, A. ; KAY, J. ; JABER, K. ; STEHMEIER, L. ; VOORDOUW, G.. 2000. Composition of soil microbial communities enriched on a mixture of aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology.* Estados Unidos. 66(12):5282-5289.

## H

23. HANSON, K. ; ANURANJINI, N. ; KAPADIA, M. ; DESAI, A.. 1996. Crude oil degradation by *Acinetobacter sp.* A3 as influenced by nitrogen, phosphorus and surfactants. *Indian Journal of Experimental Biology.* 34(12):1276-1278.
24. HANSON, K. ; ANURANJINI, N. ; MADHAVI, K. ; ANJANA, D.. 1997. Bioremediation of crude oil contamination with *Acinetobacter sp.* A3. *Current Microbiology.* Baroda, India. 35:191-193.
25. HARRIS, S.. 1997. Hydrocarbon bioremediation. No se encontró más información. Material proporcionado por Marc Gesnot en el lugar de realización de la práctica.
26. HORI, K. ; MATSUZAKI, Y. ; TANJI, Y. ; UNNO, H.. 2002. Effect of dispersing oil phase on the biodegradability of a solid alkane dissolved in non-biodegradable oil. *App. Microbiol. Biotechnol.* 2002(59)574-579.
27. HUBERT, C. ; SHEN, Y. ; VOORDOUW, G.. 1999. Composition of toluene-degrading microbial communities from soil at different concentrations of toluene. *Applied and Environmental Microbiology.* Estados Unidos. 65(7):3064-3070.

## J

28. JACOBUCCI, D. ; VASCONCELOS, C. ; MATSUURA, A. ; FALCONI, F. ; DURRANT, L.. 2000. Degradation of diesel oil by biosurfactants-producing bacterial strains. Contaminated Soil Sediment and Water. Association of Environmental Health and Sciences.

## K

29. KAMUKAI-NAKAMURA, S. ; SUGIURA, K. ; YAMAUCHI-INOMATA, Y. ; TOKI, H. ; VENKATESWARAN, K. ; YAMAMOTO, S. ; TANAKA, H. ; HARAYAMA, S.. 1996. Construction of bacterial consortes that degrade arabian light crude oil. Journal of fermentation and bioengineering. 82(6):570-574.
30. KARAMANEV, D. ; CHAVARIE, C. ; SAMSON, R.. 1997. Soil immobilization: New concept for biotreatment of soil contaminants. Department of Chemical Engineering, Ecole Polytechnique. Montréal, Canadá.

## L

31. LEAHY, J. ; TRACY, K. ; ELEY, M.. 2003. Degradation of volatile hydrocarbons from steam-classified solid waste by a mixture of aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. Biotechnology Letters. Países Bajos. 25:479-483.
32. LEPO, J. ; HANCOCK, P. ; ZULEGER, C. ; ROUPP-EDWARDS, K.. 2001. Effectiveness and safety of biosurfactants as agents of oil spill response. Center for Environmental Diagnostics and Bioremediation, University of West Florida. Pensacola, Estados Unidos. Consultado el 24 de junio del 2003. Disponible en <http://www.kmprc.or.kr/dataroom/2001iosc/PDF/00609.pdf>.
33. LI, G. ; HU, H. ; HAO, J. ; FUJIE, K.. 2002. Use of biological activated carbon to treat mixed gas of toluene and benzene in biofilter. Environmental Technology. 23:467-477.

## M

34. MADIGAN, M. ; MARTINKO, J. ; PARKER, J.. 1999. Brock : Biología de los Microorganismos. 8 ed. Prentice Hall Iberia. Madrid, España. 986 p.
35. MARCHAND, M.. 2001. Les pollutions accidentelles des eaux au-delà du pétrole brut : maîtriser le risque et gérer la réponse. Les journées d'information du Cèdre. Institut Français de Recherche pour l'exploitation de la Mer. Nantes, Francia. Consultado el 12 de octubre del 2003. Disponible en [http://www.le-cedre.fr/fr/publication/coll/ji01\\_10.pdf](http://www.le-cedre.fr/fr/publication/coll/ji01_10.pdf).
36. MARIN, M. ; PEDREGOSA, A. ; RIOS, S. ; ORTIZ, M. ; LABORDA, F.. 1995. Biodegradation of diesel and heating oil by *Acinetobacter calcoaceticus* MM5 : its possible applications on bioremediation. International Biodeterioration and Biodegradation. 269-285.
37. MARIN, M. ; PEDREGOSA, A. ; LABORDA, F.. 1996. Emulsifier production and microscopial study of emulsions and biofilms formed by the hydrocarbon-utilising bacteria *Acinetobacter calcoaceticus* MM5. Applied Microbiology Biotechnology. 44:660-667.
38. MARQUEZ, F. ; HERNANDEZ, V. ; LAMELA, T.. 2001. Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium. Water, Air and Soil Pollution. Países Bajos. 128:313-320.
39. MORIYA, K. ; HORIKOSHI, K.. 1993. Isolation of a benzene-tolerant bacterium and its hydrocarbon degradation. Journal of Fermentation and Bioengineering. 76(3):168-173.

## N

40. NGABONZIZA, E.. 2003. Sélection et mise en oeuvre de microorganismes dégradant les hydrocarbures dans l'optique d'une application dans le secteur de la bioremédiation. Institut Meurice, Haute Ecole Lucia de Brouckère. Bruselas, Bélgica.
41. NIELSEN, K. ; SMALLA, K. ; VAN ELSAS, J.. 2000. Natural transformation of *Acinetobacter sp.*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Burkholderia cepacia* in soil microcosms. Applied and Environmental Microbiology. 66(1):206-212.
42. NOCENTINI, M. ; PINELLI, D. ; FAVA, F.. 2000. Bioremediation of a soil contaminated by hydrocarbon mixtures : the residual concentration problem. Chemosphere. 41(2000):1115-1123.
43. NSCA. 2003. What are cleaner fuels? National Society for Clean Air. Brighton, Reino Unido. Consultado el 18 de noviembre del 2003. Disponible en <http://www.nasca.org.uk/fs16-1.htm>.

## O

44. O'GARA, F.. 2002. Plantes et microorganismes génétiquement modifiés en agriculture. Bioweb : Biotechnologie information. Consultado el 24 de junio del 2003. Disponible en <http://www.bioweb.ch/fr/focus/bios/12>.
45. OLSON, J. ; MILLS, G. ; HERBERT, B. ; MORRIS, P.. 1999. Biodegradation rates of separated diesel components. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18(11):2448-2453.

## P

46. PENNEL, K. ; ABRIOLO, L.. 1998. Surfactant-enhanced aquifer remediation: Fundamental processes and applications. En : *Bioremediation : Principles and Practice. Volumen I : Fundamentals and Applications*. Editado por Sikdar, S. e Irvine, R.. Technomic Publication. Pennsylvania, Estados Unidos. p. 693-750.
47. PIEPER, D. ; REINEKE, W.. 2000. Engineered bacteria for bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*. 11:262-270.
48. POTHULURI, J. ; CERNIGLIA, C.. 1998. Current aspects on polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation processes. En : *Bioremediation : Principles and Practice. Volumen I : Fundamentals and Applications*. Editado por Sikdar, S. e Irvine, R.. Technomic Publication. Pennsylvania, Estados Unidos. p. 461-520.
49. PRESCOTT, M. ; HARLEY, J. ; KLEIN, D.. 1995. *Microbiologie*. 2<sup>ème</sup> ed. Traducido por Bacq-Calberg, C. ; Coyette, J. ; Hoet, P. ; Nguyen-Distèche, M.. De Boeck-Wesmael, S.A.. Bruselas, Bélgica. p. 122-128.
50. PRINCE, R. ; VARADARAJ, R. ; FIOCCO, R. ; LESSARD, R.. 1999. Bioremediation as an oil spill response tool. *Environmental Technology*. 20:891-896.

## R

51. RAHMAN, K. ; BANAT, I. ; THAHIRA, J. ; THAYUMANAVAN, T. ; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P.. 2001. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. *Bioresource Technology*. 81:25-32.
52. RATAJCZAK, A. ; GEIBDÖRFER, W. ; HILLEN, W.. 1998. Alkane hydroxylase from *Acinetobacter sp.* Strain ADP1 is encoded by *alkM* and belongs to a new family of bacterial integral-membrane hydrocarbon hydroxylases. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(4):1175-1179.

53. RITTMAN, B.. 1994. *In situ* bioremediation. 2 ed. Noyes Publication. New Jersey, Estados Unidos. 255 p.
54. RON, E. ; ROSENBERG, E.. 2002. Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*. 13:249-252.

## S

55. SAKAI, Y. ; MAENG, J. ; TANI, Y. ; KATO, N.. 1994. Use of long-chain n-alkanes (C<sub>13</sub> – C<sub>44</sub>) by an isolate, *Acinetobacter* sp. M-1. *Biosci. Biotech. Biochem.* Kyoto, Japón. 58(11):2128-2130.
56. SAMANTA, S. ; SINGH, O. ; JAIN, R.. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons : environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology*. 20(6):243-248.
57. SCHWARTZ, A. ; BAR, R.. 1995. Cyclodextrin-enhanced degradation of toluene and p-toluic acid by *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology*. Estados Unidos. 61(7):2727-2731.
58. SPEIDEL, H. ; LIGHTNER, R. ; AHMED, I.. 2000. Biodegradability of new engineered fuels compared to conventional petroleum fuels and alternative fuels in current use. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 84-86:879-897.
59. STELMACK, P. ; GRAY, M.; PICKARD, M.. 1999. Bacterial adhesion to soil contaminants in the presence of surfactants. *Applied and Environmental Microbiology*. Estados Unidos. 65(1):163-168.
60. SWANNELL, R. ; MITCHELL, D. ; WATERHOUSE, J. ; MISKIN, I. ; HEAD, I. ; PETCH, S. ; JONES, D. ; WILLIS, A. ; LEE, K. ; LEPO, J.. 1999. Impact of bioremediation treatments on the biodegradation of buried oil and predominant bacterial populations. *Microbial Biosystems: New Frontiers*. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology. Halifax, Canadá.

## T

61. THOMASSIN-LACROIX, E. ; ERIKSSON, M. ; REIMER, K. ; MOHN, W.. 2002. Biostimulation for on-site treatment of weathered diesel fuel in Arctic soil. *Applied Microbiology Biotechnology*. Quebec, Canadá. 59:551-556.
62. TIMMIS, K. ; PIEPER, D.. 1999. Bacteria designed for bioremediation. *Tibtech*. 17:201-204.
63. TROQUET, J. ; TROQUET, M.. 2003. Les méthodes de dépollution des sols contaminés par les hydrocarbures. *Environmental Engineering and Consulting*, Parc Technologique de La Pardieu. Paris, Francia.

## U

64. ULP. 2003. Les Travaux Dirigés de Biochimie : Densité Optique (Beer-Lambert). Faculté des Sciences de la Vie, Université Louis Pasteur. Strasbourg, Francia. Consultado el 19 de noviembre del 2003. Disponible en <http://ulpmultimedia.u-strasbg.fr/biochimie/didac15/dico/densiopt.htm>.

## V

65. VAN BEILEN, J. ; DUETZ, W. ; SMITS, T. ; WITHOLT, B.. 2003. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil & Gas Science and Technology*. 58:427-440.
66. VASUDEVAN, N. ; RAJARAM, P.. 2001. Bioremediation of oil sludge-contaminated soil. *Environment International*. 26:409-411.
67. VENOSA, A. ; STEPHEN, J. ; MACNAUGHTON, S. ; CHANG, Y. ; WHITE, D.. 1999. Microbial populations changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Microbial Biosystems: New Frontiers*. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology. Halifax, Canadá.

## W

68. WEBER, W. ; YOUNG, T. ; HILLERS, A.. 1998. Microscale heterogeneities in soil properties and their effects on contaminant sorption and bioavailability. En : *Bioremediation : Principles and Practice*. Volumen I : Fundamentals and Applications. Editado por Sikdar, S. e Irvine, R.. Technomic Publication. Pennsylvania, Estados Unidos. p. 221-257.
69. WRENN, B. ; VENOSA, A.. 1996. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure. *Can. J. Microbiol.*. Canadá. 42:252-258.