



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

“Aislamiento selección de cepas bacterianas degradadoras de hidrocarburos”

Tesis presentada en Opción al Título Académico de

Master en Biotecnología

Mención Biotecnología Ambiental

Autor: Lic. Rosa María Pérez Silva

**Tutores: Dra. Arelis Abalos Rodríguez
Dra. Alina Marañón Reyes**

Consultante: MSc. Ana Mará Pardo Terga

Santiago de Cuba, 2003

INDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Hidrocarburos	1
1.2	Política ambiental cubana	2
2.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1	Contaminación por hidrocarburos	4
2.2	Petróleo	4
2.2.1	Características generales del petróleo	5
2.3	Hidrocarburos poliaromáticos	6
2.4	Metabolismo bacteriano de los hidrocarburos	6
2.4.1	Hidrocarburos alifáticos	6
2.4.2	Isoprenoides	7
2.4.3	Hidrocarburos aromáticos	7
2.4.3.1	Degradación microbiana de Naftaleno	8
2.5	Utilización de tensoactivos en la degradación de hidrocarburos	9
2.6	Aplicaciones potenciales de los ramnolípidos	9
3.	MATERIALES Y METODOS	12
3.1	Reactivos y Equipos	12
3.1.1	Reactivos químicos fundamentales	12
3.1.2	Medios de cultivo	12
3.1.3	Materiales y Equipos fundamentales	13
3.2	Origen y Toma de las muestras	13
3.2.1	Enriquecimiento de las muestras y aislamiento de microorganismos degradadores de hidrocarburos	13
3.3	Medios de cultivo. Condiciones de cultivo e inóculo	14
3.4	Selección de cepas degradadoras de hidrocarburos	14
3.5	Ensayos de biodegradabilidad	15
3.5.1	Cuantificación del consumo de las fuentes de carbono estudiadas	15
3.5.1.1	Petróleo	15
3.5.1.2	Naftaleno	15
3.6	Detección y cuantificación de biotensoactivos	15
3.7	Crecimiento bacteriano	16
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
4.1	Identificación de los microorganismos aislados	17
4.2	Selección de la cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> degradadora de petróleo	19
4.3	Biodegradación de petróleo por la cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT18	21
4.4	Biodegradación de Naftaleno por la cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT18	23
4.4.1	Biodegradación de Naftaleno por la cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT18 en medio MN	23
4.4.2	Biodegradación de Naftaleno por la cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT18 en medio MNG	25
5.	CONCLUSIONES	28
6.	BINLIOGRAFÍA	29
7.	Anexos	34

INDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Hidrocarburos	1
1.2	Política ambiental cubana	2
2.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1	Contaminación por hidrocarburos	4
2.2	Petróleo	4
2.2.1	Características generales del petróleo	5
2.3	Hidrocarburos poliaromáticos	6
2.4	Metabolismo bacteriano de los hidrocarburos	6
2.4.1	Hidrocarburos alifáticos	6
2.4.2	Isoprenoides	7
2.4.3	Hidrocarburos aromáticos	7
2.4.3.1	Degradación microbiana de Naftaleno	8
2.5	Utilización de tensoactivos en la degradación de hidrocarburos	9
2.6	Aplicaciones potenciales de los ramnolípidos	9
3.	MATERIALES Y METODOS	12
3.1	Reactivos y Equipos	12
3.1.1	Reactivos químicos fundamentales	12
3.1.2	Medios de cultivo	12
3.1.3	Materiales y Equipos fundamentales	13
3.2	Origen y Toma de las muestras	13
3.2.1	Enriquecimiento de las muestras y aislamiento de microorganismos degradadores de hidrocarburos	13
3.3	Medios de cultivo. Condiciones de cultivo e inóculo	14
3.4	Selección de cepas degradadoras de hidrocarburos	14
3.5	Ensayos de biodegradabilidad	15
3.5.1	Cuantificación del consumo de las fuentes de carbono estudiadas	15
3.5.1.1	Petróleo	15
3.5.1.2	Naftaleno	15
3.6	Detección y cuantificación de biotensoactivos	15
3.7	Crecimiento bacteriano	16
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
4.1	Identificación de los microorganismos aislados	17
4.2	Selección de la cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> degradadora de petróleo	19
4.3	Biodegradación de petróleo por la cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT18	21
4.4	Biodegradación de Naftaleno por la cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT18	23
4.4.1	Biodegradación de Naftaleno por la cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT18 en medio MN	23
4.4.2	Biodegradación de Naftaleno por la cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT18 en medio MNG	25
5.	CONCLUSIONES	28
6.	BINLIOGRAFÍA	29
7.	Anexos	34

RESUMEN.

La contaminación ambiental por hidrocarburos, es uno de los problemas más significativos en la actualidad. Una gran variedad de microorganismos son capaces de utilizar los hidrocarburos como fuente de carbono y energía. En la presente investigación se realizó el aislamiento, caracterización y selección de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* AT18 a partir de suelos contaminados con petróleo. Los ensayos de biodegradabilidad, en petróleo y naftaleno demostraron que *Pseudomonas aeruginosa* AT18 degrada los dos sustratos; alcanzándose un 68 y 10% de biodegradación respectivamente. La adición de glucosa (2% v/v, relación 1:1) incrementa la actividad biodegradativa de la cepa en un 22%. *Pseudomonas aeruginosa* AT18 produce 1.35 g/L de ramnolípidos en presencia de naftaleno y hasta 6.15 g/L en naftaleno más glucosa.

ABSTRACTS

The hydrocarbons contamination is at the present time one of the one of the main environmental problems. A great variety of microorganisms are able to use the hydrocarbons as energy and carbon source. In the present research it was carried out the isolation, characterization and selection of the *Pseudomonas aeruginosa* AT18 strain from polluted soil with petroleum. The biodegradability assays in petroleum and naphthalene probed that *Pseudomonas aeruginosa* AT18 degrades both substrates, reaching 68 and 10% of biodegradation respectively. The addition of glucose (2% v/v, relationship 1:1) increases the biodegradative activity of the strain in 22%. *Pseudomonas aeruginosa* AT18 produces 1.35 rhamnolipids g/L in presence of naphthalene and up to 6.15 g/L in naphthalene witch glucose.

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental se define como la condición del medio ambiente, en la cual determinadas sustancias están presentes en concentraciones tales que afectan su calidad y composición; provocando efectos perjudiciales en los diferentes ecosistemas. Todo proceso que expulse o libere un contaminante al medio, constituye una fuente de contaminación ambiental (López y cols, 2002). Entre los principales contaminantes liberados al medio, los cuales alteran y deterioran los nichos ecológicos, se encuentran las aguas residuales, los metales pesados, los compuestos xenobióticos y los hidrocarburos.

1.1 Hidrocarburos

Los hidrocarburos son compuestos orgánicos cuya estructura contiene mayoritariamente átomos de carbono (C) e hidrógeno (H). En menor cantidad pueden presentar nitrógeno (N), azufre (S), fósforo (P), oxígeno (O) y trazas de metales. Por su estructura química se dividen en tres grupos: hidrocarburos alifáticos o parafinas, alicíclicos o naftenos y aromáticos. Los hidrocarburos alifáticos son aquellos en los que los átomos de carbono forman la base de la estructura química y está organizada en forma de cadenas lineales o ramificadas (isopronoides). Los hidrocarburos alicíclicos o ciclados son aquellos hidrocarburos en los que los átomos de carbono forman un anillo o ciclo que puede variar en el número de átomos presentes. Los enlaces y su disposición determinan las propiedades del ciclo. Finalmente los hidrocarburos aromáticos son anillos de seis átomos de carbono en los cuales los dobles enlaces alternan con los sencillos. (Cerniglia, 1992)

Los hidrocarburos aromáticos se consideran los contaminantes naturales de origen antropogénico de mayor interés; ya que por su estructura molecular estable son muy difíciles de degradar, permaneciendo durante largos períodos de tiempo sin sufrir modificaciones estructurales, causa directa de su recalcitrancia y resistencia a la biodegradación microbiana. Dentro de los hidrocarburos aromáticos se incluyen los arenos o aromáticos sustituidos, heterociclos y poliaromáticos (HPAs) (Albert, 1994; Harayama, 1999)

La presencia de hidrocarburos en suelos, aguas y zonas costeras constituye una fuente muy frecuente de contaminación ambiental; y su degradación por poblaciones

microbianas naturales es uno de los principales mecanismos para eliminarlos. (Atlas, 1991)

1.2 Política Ambiental Cubana

En 1992, durante la Conferencia Mundial sobre Medio Ambiente y Desarrollo, conocida como Cumbre de la Tierra o Cumbre de Río, se aprobó la Agenda 21, en la cual se proponen las acciones para encarar las metas del medio ambiente y el desarrollo del siglo XXI. Cuba participó activamente en esta Cumbre expresando su apoyo a las acciones recogidas en la Agenda 21.

En 1997, se aprobó en nuestro país la Estrategia Ambiental Nacional y la Ley 81 del Medio Ambiente, documentos que rigen y regulan respectivamente la política ambiental del estado en la conservación y protección del medio ambiente (López y cols, 2002).

Entre los principales problemas ambientales identificados en nuestro país a raíz de la Estrategia Ambiental Nacional pueden citarse:

Degradación de los suelos,

Deterioro de las condiciones ambientales en asentamientos humanos,

Contaminación de las aguas terrestres y marinas,

Deforestación y

Pérdida de la biodiversidad

A consecuencia de estos problemas ambientales, en Cuba se desarrollan programas medio ambientales relacionados con:

- Reducción de la contaminación
- Conservación de la biodiversidad
- Cuencas hidrográficas
- Bahías
- Rehabilitación de suelos

La contaminación de suelos y acuíferos por petróleo e hidrocarburos en general, es uno de los problemas ambientales de mayor impacto en la actualidad, no solo por el deterioro que provoca en los ecosistemas terrestres y marinos, sino también por el prolongado tiempo que perdura la contaminación.

En el presente trabajo se trata el:

Problema

La contaminación de ecosistemas acuosos y terrestres por hidrocarburos influye negativamente en los mismos, provocando desequilibrios ecológicos en perjuicio de la flora y la fauna que lo constituyen.

Es por ello que las zonas dañadas deben recibir un tratamiento adecuado que permita subsanar esta situación.

Hipótesis

Las bacterias *Pseudomonas*, *Flavobacterium* entre otras, pueden metabolizar hidrocarburos del petróleo transformándolos hasta sus formas inorgánicas inocuas. Actualmente, la aplicación de microorganismos aprovechando esta actividad degradativa, es una forma de tratamiento muy utilizada. Es posible aislar cepas bacterianas degradadoras de petróleo y sus derivados, al cultivarlos sobre estos sustratos como fuentes de carbono.

Objetivo General

Estudiar la degradación de hidrocarburos del petróleo por cepas bacterianas.

Objetivos específicos

- Aislar y seleccionar cepas bacterianas degradadoras de hidrocarburos
- Estudiar la degradación de petróleo por la cepa bacteriana seleccionada
- Estudiar la degradación de naftaleno por la cepa bacteriana seleccionada

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Contaminación por hidrocarburos

La contaminación del medio por hidrocarburos es uno de los problemas ambientales más significativos que se conocen en la actualidad.

Debe diferenciarse la contaminación dispersa o global y la contaminación discreta o local. La contaminación global se debe a procesos naturales (fuegos forestales, producción por seres vivos, filtraciones naturales de petróleo) y procesos antropogénicos, mientras que la discreta se debe fundamentalmente a procesos antropogénicos; entre los que destacan: procesos industriales, combustión de fósiles y madera, industria del petróleo en toda su cadena de producción, incineración de residuos y aguas residuales urbanas e industriales (Cerniglia, 1992).

La contaminación discreta o local es la única que puede tratarse eficazmente por biorremediación y sus principales ejemplos son las aguas residuales e industriales y los suelos contaminados. El origen de la contaminación de los suelos se debe principalmente a vertidos y fugas subterráneas o superficiales de tanques de almacenamiento en la industria petroquímica, gasolineras u oleoductos o en el transporte. Las aguas contaminadas por hidrocarburos básicamente son de tipo industrial conteniendo contaminación por: fuels, gasolinas, gasoils, otros aceites minerales y crudo de petróleo. Su aparición se debe básicamente a vertidos, fugas en tanques subterráneos u oleoductos y por aguas de deslastres en instalaciones petroquímicas (Viñas, 1999)

2.2 Petróleo

Se denomina petróleo bruto al conjunto formado por los gases (alcanos de C₁-C₆); líquidos (crudo) y sólidos en suspensión que existen en estado natural en la bolsa petrolífera. También existen H₂O, H₂, N₂, CO₂ y H₂ variando según su procedencia (Viñas 1999).

2.2.1 Características generales del petróleo

El petróleo es un líquido oscuro, viscoso, más denso que el agua; de composición muy compleja. Contiene básicamente hidrocarburos (50 – 98 % de la composición), compuestos que contienen oxígeno, nitrógeno, azufre (compuestos NOS) y metales como el níquel y el vanadio (Howe-Grant, 1996). Otras descripciones más detalladas determinan la existencia de millares de componentes distintos (Figura 1), los cuales pueden separarse en 4 clases ó grupos dependiendo de solubilidad en solventes orgánicos : *saturados* (n-alcanos, isoprenoides, cicloalcanos o naftenos y hopanos), *aromáticos* (monoaromáticos, diaromáticos, aromáticos policíclicos (HPA_s), *resinas* (agregados de piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos) y *amidas* (asfaltenos, agregados de HAP_s, ácidos nafténicos sulfuros, ácidos grasos metaloporfirinas, fenoles polihidratados).(Sugiura y col., 1997). En base a su composición el petróleo se clasifica en petróleo ligero (predomina la fracción alifática), intermedio (predomina la fracción nafténica) y pesado (predomina la fracción aromática).

Las cadenas alifáticas consisten en sucesiones de átomos de carbono unidos entre sí por enlaces sencillos (alcanos), dobles (alquenos) o triples (alquinos); mientras que el resto de las valencias son ocupadas por hidrógenos. Los alcanos son la familia más numerosa en el petróleo crudo y se conocen como parafinas, pueden ser lineales o ramificados y su longitud varía de 1 a 40 carbonos, aunque se ha logrado detectar cadenas de 60 carbonos. Los ciclos pueden ser saturados o aromáticos. Los ciclos saturados se conocen como cicloalcanos, cicloparafinas o naftenos. Los compuestos aromáticos son derivados del benceno. Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA_s) o poliaromáticos comprenden del 10 al 25 % del petróleo crudo y es la fracción más pesada. Los HPA_s son un grupo de compuestos aromáticos con dos o más anillos bencénicos fusionados en arreglos angulares, lineales o agrupados.

2.3 Hidrocarburos poliaromáticos

Los hidrocarburos poliaromáticos son moléculas que contienen dos o más anillos bencénicos en su estructura química, siendo esta característica un obstáculo para su degradación microbiana. El ataque microbiano es mayor cuanto mayor es el número de anillos y sustituyentes en la molécula y por tanto con el incremento del peso

molecular (Alexander, 1981). Aún así la capacidad de degradación de compuestos poliaromáticos está ampliamente distribuida, extendiéndose incluso a sustancias de nueva síntesis, por lo que han sido aisladas numerosas especies microbianas degradadoras de compuestos aromáticos (Cerniglia, 1992).

Entre los HPAs pueden citarse el naftaleno (dos anillos fusionados), fenantreno (tres anillos fusionados), antraceno (isómero estructural del fenantreno), pireno (cuatro anillos fusionados), fluoranteno (dos anillos bencénicos unidos a través de un ciclo) y dibenzotiofeno (dos anillos bencénicos unidos a través de un átomo de azufre).

2.4 Metabolismo bacteriano de los hidrocarburos.

2.4.1 Hidrocarburos alifáticos

Los hidrocarburos alifáticos son los hidrocarburos que se degradan con más rapidez. Existen tres vías metabólicas principales: la oxidación terminal, la oxidación subterminal y la w – oxidación (que deriva en parte la oxidación terminal). (Figura 2). El paso clave radica en oxidar la molécula para incrementar la solubilidad. La mayoría de los microorganismos convierten el n-alcano al correspondiente alcohol terminal, por medio de la monooxigenasa, la cual hidroliza el carbono terminal mayoritariamente (ruta de la oxidación terminal) mediante el átomo de una molécula de oxígeno. La formación de alcoholes subterminales (secundarios) es un proceso poco frecuente y está descrito en hongos del género *Aspergillus* y *Fusarium* y en géneros bacterianos como *Bacillus sp.* (Viñas, 1999). Los pasos posteriores, en la oxidación terminal, convierten el n-alcohol en aldehído (alcohol-deshidrogenasa), y finalmente se forma un ácido graso (aldehído-deshidrogenasa). El ácido graso entonces puede entrar en la ruta de la β -oxidación. También como se describe en la figura 2 puede producirse una oxidación terminal del ácido graso produciéndose un diácido (w -oxidación) que también entraría en la β -oxidación, mediante una descarboxilación previa.

2.4.2 Isoprenoides.

Su estructura química ramificada condiciona su resistencia a los ataques microbianos. La degradación ocurre principalmente por la vía de la oxidación terminal (Figura 2) Los más estudiados son el pristano (C₁₇) y el fitano (C₁₈) (Smith,

1990). Fue en el accidente del Exxon Valdez, mayor desastre ecológico en la era de los 90 donde se demostró que la microbiota autóctona existente era capaz de degradar isoprenoides, considerados marcadores internos hasta entonces, (Swannenell y col., 1996). También se ha observado que en presencia de n-alcános la degradación de isoprenoides está reprimida por los hidrocarburos lineales (Olivera, 2000)

2.4.3 Hidrocarburos aromáticos.

La metabolización oxidativa completa de los hidrocarburos aromáticos y sus derivados conducen a compuestos que pertenecen o se incorporan fácilmente al ciclo Krebs. A excepción del naftaleno, fenantreno y antraceno, se sabe muy poco del metabolismo de degradación microbiana de los HPAs.

La mayor información sobre la respiración bacteriana de compuestos aromáticos se ha derivado del estudio de especies del género *Pseudomonas*, pero también puede ser llevada a cabo por microorganismos corineformes, actinomicetos y, posiblemente, por miembros del género *Spirillum* y bacilos esporógenos facultativos. De forma general, la degradación aerobia de un compuesto aromático implica la acción de mono y dioxigenasas que oxidan al anillo a un fenol dihidrídico. El número de este tipo de moléculas es relativamente pequeño en comparación con la amplia variedad de sustratos susceptibles de ser degradados. Se trata, por tanto, de vías catabólicas convergentes. Entre los intermediarios a los que convergen tales vías, hay que considerar tres como los más frecuentes: el catecol (o-hidroxifenol), el protocatecuato (ácido 3,4 dihidroxibenzoico) y el gentisato (ácido 2,5 dihidroxibenzoico) (Parés y Juárez, 1997).

A diferencia de la degradación aerobia, en ambientes anaerobios la degradación de compuestos aromáticos implica la reducción de los dobles enlaces del núcleo aromático. Anaeróbicamente los compuestos aromáticos pueden ser oxidados a CO₂ por cultivos puros de bacterias que realicen respiración anaerobia (p.ej. del nitrato o del sulfato) o por bacterias fototróficas. En cambio, las bacterias metanogénicas degradan los compuestos aromáticos en cultivos mixtos (Parés y Juárez, 1997).

2.4.3.1. Degradación microbiana del Naftaleno

La ruta de degradación del naftaleno es de las más estudiadas. Se ha descrito la degradación del naftaleno por bacterias fundamentalmente; siendo muy limitada en algas y hongos. En condiciones anaeróbicas se conocen varias posibilidades de degradación por bacterias fotosintéticas, reductoras de sulfatos o metanogénicas, no obstante, los procesos aeróbicos de degradación son los más eficaces y completos (García y Lalucat, 1990)

En la ruta de degradación del naftaleno usualmente un mismo microorganismo puede emplear diferentes vías catabólicas para los anillos fenólicos dihidroxidados según el sustrato de crecimiento. La ruptura puede ser en las posiciones orto o meta del anillo. La ruptura en meta es la más frecuente. Si la ruptura ocurre en posición orto la ruta de degradación es catecol \rightarrow cis, cis muconato, \rightarrow β -Cetoadipato \rightarrow Acetil-CoA + Succinil-CoA \rightarrow ciclo de Krebs. Si por el contrario la ruptura ocurre en posición meta a partir del catecol se forman semialdehído del ácido 2-hidroximucónico \rightarrow 2-Cetopentano-4-enoato \rightarrow Acetaldehído + piruvato \rightarrow ciclo de Krebs (Parés y Juárez, 1997).

En la Figura 3 se presenta la ruta metabólica de degradación del naftaleno

Ambas rutas de fisión del núcleo aromático pueden coexistir en un mismo microorganismo lo cual se explica en función de una regulación de cada vía según el tipo de sustrato aromático primario de crecimiento que inducirán unas enzimas u otras. Sustratos como naftaleno, tolueno, xileno, cresoles, etc., actúan generalmente como inductores de la vía meta; mientras que los de la vía orto son inducidos por el cis, cis-mucónico y servirá para degradar benzoato.

Entre los microorganismos degradadores de naftaleno se describen especies de géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter* y *Rhodococcus* siendo las más estudiadas las primeras (Whyte y col., 1986). El género *Pseudomonas* se caracteriza por su versatilidad metabólica y se ha comprobado que en algunas situaciones la degradación va asociada a plásmidos. Típicamente se conocen plásmidos degradativos para el alcanfor, octano, xileno, tolueno, naftaleno y salisato. Su función es la de convertir sustratos habitualmente no degradables en

metabolitos fácilmente asimilables, o que puedan ser atacados por enzimas codificadas cromosómicamente (García y Lalucat 1988).

2.5. Utilización de tensoactivos en la biodegradación de hidrocarburos

Una gran variedad de microorganismos entre bacterias, levaduras y hongos sintetizan moléculas con actividad superficial, conocidas como tensoactivos microbianos o biotensoactivos, las cuales se adsorben en la interfase de dos fases con diferente polaridad debido a su naturaleza anfifílica y alteran las condiciones que prevalecen en la misma (Rosenberg y Ron, 1999). Los tensoactivos microbianos, al igual que los tensoactivos sintéticos, reducen la tensión superficial e interfacial, se agrupan en micelas y estabilizan emulsiones de sistemas agua/aceite.

Los tensoactivos microbianos mejor estudiados son moléculas los glicolípidos, moléculas que en su estructura contienen una o dos unidades de un azúcar unidas a través de enlaces glicosídico a cadenas de ácidos grasos o β -hidroxiácidos (Rosenberg y Ron, 1999). Los glicolípidos se subdividen a su vez en trealosalípidos de *Rhodococcus* sp (Espuny *et al.*, 1995; Vollbrecht *et al.*, 1999); soforolípidos producidos por *Torulopsis bombicola* (Cooper y Paddock, 1984; Daniel *et al.*, 1999) y ramnolípidos que son producidos por *Pseudomonas aeruginosa* (Syldatk *et al.*, 1985 b; Lang y Wullbrandt, 1999).

Los ramnolípidos son los tensoactivos microbianos producidos por el género *Pseudomonas aeruginosa*, bacilo Gram-negativo característico de aguas y suelos. La estructura general de los ramnolípidos contiene un anillo de ramnopiranosil unido a una cadena de β -hidroxiácido (Figura 4). El anillo de ramnopiranosil tanto en los monoramnolípidos como en los dirramnolípidos es la parte invariable en la molécula.

2.6. Aplicaciones potenciales de los ramnolípidos

El campo de aplicación más amplio de los ramnolípidos es la biorremediación y biodegradación de hidrocarburos. El accidente provocado por el petrolero Exxon Valdéz en 1989 frente a las costas de Alaska marcó el inicio de los tratamientos de biorremediación en la restauración de costas, playas y hábitats marinos afectados por la contaminación de hidrocarburos (Atlas, 1991, Maier y Soberón-Chávez, 2000).

La biorremediación es una tecnología emergente que utiliza la capacidad metabólica de los microorganismos para producir una mineralización o transformación de contaminantes orgánicos, se ha convertido en el método más utilizado para la combatir la contaminación ambiental por hidrocarburos, compuestos químicos tóxicos y las conocidas "mareas negras" o derrames de petróleo en suelos, aguas y zonas costeras. Es un proceso lento que no genera residuos (Atlas, 1991; Maier *et al.*, 2000). Si la biorremediación es realizada en el sitio de contaminación se llama *in situ*, por el contrario si se lleva a cabo fuera del sitio contaminado se llama *ex situ* (Alexander, 1994). La biorremediación *in situ* se efectúa por adición de nutrientes (nitrato y fosfato fundamentalmente) o inoculando microorganismos con actividad biodegradativa. La aplicación de cualesquiera de estos procedimientos se conoce como biorremediación por bioaumento o dirigida (Viñas *et al.*, 2001). La biorremediación *in situ* suele emplearse fundamentalmente en la restauración de sistemas acuíferos, costas y playas después de un derrame de petróleo y aunque es poco costoso tiene la desventaja de que el control del proceso es muy difícil (Alexander, 1994). La biorremediación *ex situ* puede realizarse en reactores de fase líquida (slurry-phase) o reactores de fase sólida (biopiles) (Jørgensen *et al.*, 2000). El tratamiento *ex situ* permite controlar mejor el proceso, sin embargo los costes son más elevados. (Alexander, 1994)

Una estrategia muy frecuente para incrementar la biodisponibilidad de los hidrocarburos por solubilización de los mismos es la utilización de tensoactivos químicos a concentraciones superiores al valor de su concentración micelar crítica (cmc) (Singer *et al.*, 2000; Zheng y Obbard, 2000) y microbianos a concentraciones por encima (Morán *et al.*, 2000; Mata-Sandoval *et al.*, 2000) y al valor de la cmc del tensoactivo (Zhang y Miller, 1992; Olivera *et al.*, 2000). Los biotensoactivos tienen la ventaja que no provocan daños ambientales adicionales y al ser biodegradables pueden ser eliminados sin dificultad. Por otra parte se ha observado que los tensoactivos sintéticos pueden inhibir la actividad degradativa de los microorganismos (Thiem, 1994). Los tensoactivos microbianos más utilizados han sido los emulsanos de *Acinetobacter calcoaceticus* (Rosenberg y Ron, 1997), la surfactina de *Bacillus subtilis* (Morán *et al.*, 2000) y los ramnolípidos de *Pseudomonas aeruginosa*. (Zhang y Miller, 1992; Noordman *et al.*, 1998; Mata-Sandoval *et al.*, 2000)

Los ramnolípidos facilitan la solubilización de pesticidas nitrogenados en suelos. La solubilización de los pesticidas a razón de 485 mmol de pesticida/mol de

ramnolípidos (Mata-Sandoval *et al.*, 2000). La remoción de n-hexadecano (C_{16}) (Beal, 2000) y n-octadecano (C_{18}) (Zhang y Miller, 1992) en suelos se incrementó de 1.84 a 22.8 $\mu\text{g/L}$ y 9×10^{-3} a 250 mg/L respectivamente con la adición de ramnolípidos. Los porcentajes de biodegradación del naftaleno, fenantreno y antraceno por poblaciones microbianas se incrementaron del 50 al 90% con la presencia de 500 mg/L de ramnolípidos durante el tratamiento de biorremediación de suelos contaminados (Arino *et al.*, 1998; Noordman *et al.*, 1998). Se observó que la adición de 0.5 % v/v de ramnolípidos de *Pseudomonas aeruginosa* AT10 incrementó la biodegradación del crudo de petróleo Casablanca de 13 a 63 % en días de incubación (Abalos, 2001). La presencia de ramnolípidos redujo diez veces la toxicidad del cadmio (Cd^{2+}), durante la biodegradación del naftaleno en suelos por *Burkholderia sp.* (Sandrin *et al.*, 2000). La capacidad emulsionante de los ramnolípidos ha sido utilizada en la recuperación terciaria de petróleo (MEOR), limpieza de tanques de almacenamiento de crudo y lavados de suelos contaminados con petróleo (Banat, 1995).

3. MATERIALES Y METODOS.

3.1. Reactivos y Equipos.

Para el estudio experimental se utilizaron los materiales y equipamientos disponibles en los laboratorios del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI) de la Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Oriente, los cuales a continuación relacionamos:

3.1.1 Reactivos químicos fundamentales

Sulfato de manganeso tetrahidratado ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$) GR	Merck
Dihidrogenofosfato de potasio anhidro KH_2PO_4 GR	BDH
Sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) PA	Merck
Sulfato de zinc heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) PA	Merck
Sulfato de Hierro heptahidratado. ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	Reagent Peking's
D(+) Glucosa anhidra PA	BDH
n-Hexano (C_6H_{14}) PA	Merck
Cloruro de calcio ($CaCl_2$) GR	BDH
Naftaleno ($C_{10}H_8$) GR	Merck
Cloruro de amonio. (NH_4Cl) PA	BDH
Hidrogenofosfato de potasio (K_2HPO_4) GR	BDH
Cloruro de potasio (KCl) PA	BDH
Extracto de levadura	Oxoid
Xileno (C_8H_{10}) GR	Merck
Acido bórico. (H_3BO_3) GR	BDH
Sulfato de cobre ($CuSO_4$) PA	Merck
Molibdato de sodio. (Na_2MoO_4) GR	Merck
Hidróxido de sodio. (NaOH) PA	Merck
Acido clorhídrico. (HCl) PA	Merck

3.1.2. Medios de cultivos

Se utilizaron medios de cultivos y reactivos microbiológicos comerciales

Agar King A	BIOCEN
-------------------	--------

Agar King B	BIOCEN
Agar Hierro/Lisina	BIOCEN
Agar Triptona Soja (TSA)	BIOCEN
Agar Mc Conkey	BIOCEN
Medio Hugh-Leifson (O/F)	BIOCEN

3.1.3 Materiales y Equipamientos fundamentales.

Micropipetas Eppendorf.

Estufa L bergertis (Alemania)

pH-metro MV-88 PRACITRONIC (Alemania)

Balanza analítica LB1050 (MIM, Hungría)

Centrífuga. Safenard (Alemana)

Autoclave vertical DK-75 (Rusa)

Baño Termostatado. MLW (Alemania)

Espectrofotómetro. Uv-Vis. 53-WB (Chino)

Plancha de calentamiento.Veb Beban (Alemania)

Tensiómetro Kr ss (Alemania)

Zaranda Rotacional MIZARD. 2001 (Cuba)

3.2. Origen y toma de las muestras

Suelos contaminados con hidrocarburos del proceso de refinado del petróleo, tomadas en los alrededores del primer reservorio del sistema de tratamiento de los residuales en la Refinería Hermanos Díaz. Las muestras se toman en frasco ámbar estériles y se procesan dentro de las 24 h de su colecta.

3.2.1. Enriquecimientos de las muestras y aislamiento de microorganismos degradadores de hidrocarburos

Las muestras se someten a un enriquecimiento secuencial (Figura 5) en un medio mineral basal, modificado del medio diseñado por Gerson y Zajic (1976) cuya composición es la descrita en el apartado 3.3.

El aislamiento de los microorganismos se realiza por siembra en estrías, a partir de un banco de diluciones, sobre Trypticase Soy Agar (TSA). A las colonias aisladas, sembradas en cuñas de TSA, se le realizan tinciones de Gram, siembra en agar Mc Conkey y pruebas bioquímicas presuntivas y confirmativas para determinar el género y especie.

3.3. Medio de Cultivo. Condiciones de cultivo e inóculo.

El medio mineral está compuesto (g/L): NH_4Cl , 0.1; K_2HPO_4 , 0.1; KH_2PO_4 , 0.05; KCl , 0.01; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05; CaCl_2 , 0.001; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001. El mismo se suplementa con 0.05 ml/L de una solución de oligoelementos cuya composición es (g/L): B (0.026), Cu (0.05), Mn (0.05), Mo(0.006) y Zn (0.07).

Como fuente de carbono se utilizaron: Petróleo intermedio, 0.2% v/v; naftaleno, 2 % v/v y naftaleno más glucosa 2 % v/v en relación 1:1.

En 50 mL de este medio se prepara el pre-inóculo de 24 h de incubación. 1 mL de $\text{DO}_{560 \text{ nm}} \approx 2$ se utiliza como inóculo del cultivo.

Los experimentos se realizaron por triplicado en matraces erlenmeyers de 250 mL de capacidad, conteniendo 100 ml de medio de cultivo, el cual es esterilizado a partir de soluciones concentradas de cada uno de los componentes durante 20 min a 120°C y 1 atmósfera. Los cultivos se incubaron durante 360 y 120 horas para petróleo y naftaleno respectivamente, en un agitador rotacional a 150 rpm y 30°C . Todas las tomas de muestras para medir la cinética de producción fueron realizadas cada 8 h durante el tiempo de incubación.

En todos los casos el pH se ajusta a 7.0 unidades.

3.4. Selección de cepas degradadoras de hidrocarburos

Este experimento se lleva a cabo para determinar la capacidad que poseen las bacterias aisladas, de degradar hidrocarburos y utilizarlos como fuente de carbono y energía, donde se emplea como hidrocarburo petróleo crudo al 0.2 %; siguiendo el crecimiento microbiano por recuento directo en placas.

3.5. Ensayos de biodegradabilidad.

3.5.1. Cuantificación del consumo de las fuentes de carbono estudiadas.

La cuantificación del consumo de las fuentes de carbono estudiadas se realizó como sigue:

3.5.1.1. Petróleo

La cantidad de petróleo consumida por la bacteria seleccionada se cuantifica mediante la determinación de los TPH (Total Hydrocarbon Petroleum) por gravimetría, previa extracción líquido-líquido con n-hexano. En todos los casos se corrigen las muestras respecto a un control. El cálculo en base a los TPH se realiza como porcentaje %

3.5.1.2. Naftaleno

Se determina la degradación de naftaleno por la aparición de su derivado hidroxilado ácido salicílico, intermediario de la degradación (Figura 3). Para ello se emplea el método espectrofotométrico para la determinación de estructuras fenólicas con curva de calibración $y = 0.4176x + 0.0014$ ($r = 0.9954$) (Harbone, JK., 1964) y salicilato de sodio como patrón.

3.6. Detección y cuantificación de biotensoactivos.

La producción de biotensoactivos durante la degradación de naftaleno se detecta mediante las pruebas de la gota colapsada y emulsión con xileno (Shephard, 1995).

Conociendo que los biotensoactivos excretados por *Pseudomonas aeruginosa* son del tipo ramnolípidos, la concentración extracelular de estos glicolípidos fue evaluada por el método de las ramnosas (Chandrasekaran, E. y Bemille, J.N., 1980) con una curva de calibración $y = 0.02x + 0.0128$ ($r = 0.9980$) como procedimiento de cálculo.

3.7. Crecimiento bacteriano.

Para determinar el crecimiento de la cepa estudiada, se mide la $D.O_{620nm}$ en espectrofotómetro UV-visible cada 12 horas. Determinando luego su concentración

por interpolación en la curva de calibración ($y = 0.2586x + 0.0231$) $r = 0.9927$ obtenida a partir del inóculo utilizado en los experimentos, mediante la determinación de peso seco.

4. Resultados y Discusión

La degradación de hidrocarburos por bacterias es un hecho demostrado (Bertha y Atlas, 1981; Atlas 1977). En mezclas complejas de hidrocarburos, petróleo por ejemplo, es difícil alcanzar una degradación completa; siendo esta más eficaz cuando se utilizan cultivos mixtos, porque se amplían las capacidades metabólicas de degradación al establecerse diversas interrelaciones cometabólicas entre los diferentes microorganismos para la asimilación de un sustrato (Cerniglia, 1992).

4.1 Identificación de los microorganismos aislados.

El aislamiento se centró en bacterias ya que en este grupo se encuentra el mayor número de microorganismos degradadores de hidrocarburos. Ridgway y col (1990) identificaron en aguas contaminadas con derivados del petróleo, más de un 86 % de *Pseudomonas* en 244 aislamientos obtenidos.

Del enriquecimiento realizado (Materiales y Métodos, apartado 3.2.1, Figura 5) se aislaron 9 cepas bacterianas, de las cuales 5 fueron Gram negativas y 4 Gram positivas. Las cepas Gram negativas, presentaron morfología bacilar, con olor dulzón característico. A partir de estos resultados, se procedió a la identificación de las mismas utilizando una batería de ensayos presuntivos y confirmativos (Tabla 1).

La aparición de coloración roja (básico) en medio Kligler, indicó la no fermentación de glucosa ni lactosa; la ausencia de gas (H_2S) se detectó por la no aparición de coloración negra en la superficie del medio. La prueba de oxidación/fermentación (O/F) se leyó como +/-, es decir la bacteria posee metabolismo oxidativo lo que presume el aislamiento de cepas de *Pseudomonas* sp.

Tabla 1. Ensayos presuntivos y confirmativos en la identificación de *P. aeruginosa*

Pruebas	AT14	AT15	AT16	AT17	AT18
Colonias (TSA)	Lisas, opacas	Rugosas, opacas	Grisáceas	Lisas, opacas	Lisas, opacas
Tinción Gram	Bacilo G-	Bacilo G-	Bacilo G-	Bacilo G-	Bacilo G-
Mc Conkey	+	+	+	+	+
Kliger	básico	básico	básico	básico	básico
Motilidad	+	+	+	+	+
Citocromoxidasa	+	+	+	+	+
O/F	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Catalasa	+	+	+	+	+
Hidrólisis gelatina	+	+	+	+	+
King A King B	azul	azul	azul	azul	azul
Crecimiento 42 °C	+	+	+	++	+++

Por su parte la pigmentación azul turquesa en las placas de medio King A y King B, indicó la producción del pigmento sideróforo piocianina, pigmento fluorescente típico de *Pseudomonas aeruginosa*. El ensayo de la citocromo oxidasa resultó positivo. Finalmente se observó el crecimiento a 42°C, temperatura específica para *Pseudomonas aeruginosa*. Estos ensayos positivos confirmaron que las cepas AT14, AT15, AT16, AT17 y AT18 aisladas pertenecen a *Pseudomonas aeruginosa* (Tabla 1).

Otros ensayos realizados fueron la catalasa, hidrólisis de la gelatina (corroboró producción de proteasas) y motilidad (Tabla 1).

El género *Pseudomonas aeruginosa* conocido como bacilo piocianico o del pus azul pertenece a la familia de las Pseudomonadaceae, subgrupo de las fluorescentes ya que produce pigmentos verde-amarillentos solubles en agua. Es un bacilo recto o ligeramente curvado, Gram negativo, característico de aguas y suelos con olor dulce y aromático debido a la producción de trimetilamina. Esta bacteria es móvil por flagelación polar, aerobia con metabolismo respiratorio estricto aunque en ocasiones pueden utilizar nitrato como aceptor final de electrones. No crecen en condiciones ácidas. Es además un patógeno humano oportunista, causante de serias infecciones

nosocomiales (Campos-García y col., 1998). La patogenicidad de *Pseudomonas aeruginosa* está relacionada con la secreción de moléculas tóxicas (exotoxina A, piocianina, alginato y ramnolípidos) y enzimas hidrolíticos (proteasas y fosfolipasas C). (Olvera y col., 1999).

4.2 Selección de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* degradadora de hidrocarburos.

Para la selección de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* se procedió a determinar el crecimiento de las mismas sobre petróleo como única fuente de carbono y energía.

Todas las cepas son capaces de crecer sobre petróleo (Tabla 2), siendo *Pseudomonas aeruginosa* AT18 la que mayor crecimiento mostró; al obtenerse 1.83 g/L de biomasa celular. En base a este resultado se seleccionó la cepa AT18 para continuar los ensayos de biodegradación. *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria característica de diferentes hábitats y resalta en este género su capacidad de crecimiento en los más diversos sustratos, tanto hidrosolubles y sencillos como glucosa (Guerra-Santos et al, 1984) y etanol (Matsufuji y col., 1997) como lipofílicos; a señalar aceites (Mercadé col., 1993), petróleo (Morán et al, 2000), naftaleno y poliaromáticos (Noordman et al, 1998).

Tabla 2. Crecimiento microbiano a 120 h de incubación de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* identificadas

Cepas	Biomasa (g/L)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT14	0.39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT15	0.66
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT16	0.78
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT17	1.09
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT18	1.83

Los ensayos de la gota colapsada y emulsificación del xileno (Tabla 3) permitieron detectar cualitativamente la producción de tensoactivos.

Tabla 3. Resultados de las pruebas gota colapsada y emulsión con xileno

Cepa	Gota Colapsada	E24
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT14	+	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT15	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT16	+	15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT17	+	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT18	-	-

E24: Emulsión con Xileno a las 24 horas.

De las 5 cepas, solo la AT14, AT16 y AT17 acumulan extracelularmente tensoactivos. Las emulsiones formadas poseen bajos porcentajes de emulsificación 25, 15 y 10 % respectivamente; sin embargo se mantienen estables hasta 168 h. Las cepas AT15 y AT18 no producen tensoactivos al ser cultivadas sobre petróleo.

Paralelo a los ensayos de emulsificación y gota colapsada se realizó un ensayo de crecimiento en placas con medio salino y naftaleno como fuente de carbono (Tabla 4). Este ensayo permitió detectar la capacidad degradadora de naftaleno de las cepas aisladas. La selección de este hidrocarburo considerando que en la fracción aromática del petróleo es el más abundante. Además las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* degradadoras de naftaleno, generalmente poseen actividad degradativa frente a otros poliaromáticos más complejos.

Tabla 4. Resultados del crecimiento en medio salino con naftaleno como fuente de carbono

Cepa	Halo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT14	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT15	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT16	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT17	++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT18	+++

Por los resultados obtenidos (Tabla 4) las cepas AT14 y AT15 no crecen sobre naftaleno ya que no se observó el halo de inhibición correspondiente. Las cepas AT16, AT17 y AT18 sí mostraron crecimiento positivo sobre naftaleno. El halo de inhibición en la cepa *P. aeruginosa* AT18 fue el de mayor diámetro ($\phi = 1$ cm). Este halo claro de inhibición se debe a la ruptura del anillo y formación de los intermediarios de oxidación.

A partir de los resultados obtenidos en las Tablas 2, 3, 4 se seleccionó la cepa *Pseudomonas aeruginosa* AT18 para el estudio de biodegradación de hidrocarburos.

4.3 Biodegradación de petróleo por la cepa *Pseudomonas aeruginosa* AT18.

En el presente trabajo se utilizó un crudo de petróleo intermedio o nafténico, es decir tiene un alto contenido de cicloalcanos o naftenos y *Pseudomonas aeruginosa* AT18.

La degradación del crudo de petróleo, se estudió durante 360 horas de incubación (15días) con experimentos triplicados e independientes en el tiempo y como respuesta la biodegradación de petróleo en porcentaje de TPHs, el crecimiento microbiano como biomasa en g/L.

A las 120 horas de incubación se obtiene un 66 % de biodegradación de petróleo, para finalmente alcanzar una actividad biodegradativa del 71 % a los 360 horas de incubación (Figura 6). *Pseudomonas aeruginosa* AT10 degradó en 20 días de

incubación el 50 % de la fracción alifática del crudo ligero Casablanca (Abalos, 2001).

El coeficiente de variación calculado para los tres tiempos de incubación es muy pequeño, 3.6% y si se analiza el intervalo de confianza para la actividad biodegradativa de *Pseudomonas aeruginosa* AT18 sobre petróleo (68.3 +/- 7.5 %), se observa que los valores alcanzados a los diferentes tiempos de incubación (Figura 6) están dentro de este intervalo. Sobre esta base es posible escoger cinco días de incubación para evaluar la actividad biodegradativa de *Pseudomonas aeruginosa* AT18 en la remoción de petróleo en suelos y/o aguas contaminadas.

El crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* AT18 sobre petróleo como única fuente de carbono y energía fue muy bajo; de 0.2 a 1.24 g/L entre 0 y 360 horas de incubación (Figura 6). La fase exponencial de crecimiento (datos no mostrados) se detectó en las primeras 120 h de incubación, alcanzándose la fase estacionaria entre 120 y 240 h de cultivo. El rendimiento de la fuente de carbono ($y_{x/c}$) fue 0.072, lo cual significa que solo el 7.2% del petróleo en el medio es convertido en biomasa celular. Este bajo crecimiento puede deberse a inhibición por toxicidad de la fuente de carbono máxime si se considera que el petróleo no es un sustrato puro sino una mezcla compleja de hidrocarburos, en el que están presentes compuestos ciclados y aromáticos de difícil oxidación. Otro factor tener en cuenta es la poca disponibilidad del petróleo como fuente de carbono por las células bacterianas debido a su baja solubilidad en agua.

La tensión superficial del cultivo no experimentó variación respecto al medio control (55mN/m). Esta situación corrobora la no acumulación de tensoactivos por *Pseudomonas aeruginosa* AT18 al crecer sobre petróleo a diferencia de observado sobre naftaleno (Tabla 3).

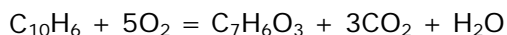
La degradación de petróleo frecuentemente es resultado de la actividad de consorcios microbianos (Viñas,1999) y/o cultivos mixtos (Fonseca,1998) que presentan una mayor posibilidad de degradar complejos debido a los diferentes microorganismos que los componen. Sin embargo, en la literatura consultada también se describe la degradación de derivados del petróleo por cepas bacterianas puras. *Pseudomonas sp* crece sobre octadecano y produce hasta un 4.5 g/L de

ramnolípidos. La biodegradación del octadecano alcanza el 92% (Zhang y Miller, 1992). Morán y colaboradores, observaron que la surfactina de *Bacillus subtilis* 09, estimulaba la biodegradación de hidrocarburos en un 35% (Morán y col., 2000). Otra cepa de *Pseudomonas aeruginosa* es capaz de degradar entre 10-20% de n-hexadecano en condiciones de desnitrificación (Chayabruta y Lu, 2000). La cepa AT 18, logra como se ha planteado un 71 % de biodegradación, lo que demuestra su efectividad en este proceso.

4.4 Biodegradación de naftaleno por la *Pseudomonas aeruginosa* AT18

Teniendo en cuenta que el petróleo utilizado en el presente trabajo es un petróleo intermedio y que la fracción alifática del crudo es la más fácil de degradar, se consideró oportuno estudiar el comportamiento de *Pseudomonas aeruginosa* AT18 en presencia de un Hidrocarburo Policíclico Aromático puro. Los HPAs constituyen la fracción pesada del crudo y el naftaleno y sus metilderivados son los compuestos mayoritarios de esta fracción.

De trabajos anteriores se conoce la capacidad de *Pseudomonas sp* para metabolizar oxidativamente hidrocarburos aromáticos (Noordman et al 1998; Ahn et al, 1999). La ruptura del anillo aromático se efectúa por la acción de enzimas del tipo oxigenasas, las cuales introducen átomos de oxígeno en el anillo. Durante la degradación del naftaleno se produce el ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzóico). Este intermediario de meta- ruptura produce un complejo de color azul con el reactivo de Folin Ciocalteu, lo cual permite su determinación espectrofotométrica. Por la estequiometría de la reacción ácido salicílico - salicilato (1:1) el contenido de salicilato es equivalente al contenido de salicílico producido en la oxidación del naftaleno. El naftaleno consumido se determina utilizando el factor 1.08, el cual indica la conversión naftaleno/salicílico en base a la reacción de oxidación:



El estudio cinético de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* AT18 se realizó con dos variantes:

1. Medio más naftaleno (MN)
2. Medio más naftaleno más glucosa (MNG)

4.4.1 Biodegradación de naftaleno por *Pseudomonas aeruginosa* AT18 en medio MN

La biodegradación del naftaleno por la cepa *Pseudomonas aeruginosa* AT18 fue muy baja, alcanzándose únicamente un 10% de actividad biodegradativa (Figura 7). Se observó que la degradación se estabiliza a las 64 h aproximadamente, tiempo en el que ya se ha alcanzado la fase estacionaria de crecimiento. La degradación de compuestos aromáticos por cultivos puros es muy difícil ya que la estructura química de estos compuestos condiciona tanto su toxicidad como su baja solubilidad en agua (Cerniglia, 1992). El naftaleno posee dos anillos bencénicos fusionados (Figura 3) y una solubilidad de 31mg/l. Su degradación microbiana involucra la ruptura de uno de los anillos y posterior oxidación hasta la mineralización.

La actividad biodegradativa sobre compuestos aromáticos es mayor cuando se emplean cultivos mixtos y consorcios microbianos, en los cuales se establece una interacción entre las diferentes especies, que si bien es compleja, favorece la biodegradación. No obstante algunos cultivos puros de bacterias, hongos y microalgas presentan actividad biodegradativa por encima del 10%.

Se ha descrito que el consorcio microbiano AM degrada en 10 días al 13% de la fracción aromática de un crudo de petróleo. El 100% de naftaleno presente en la misma fue consumido a los 20 días de incubación (Viñas, 1999). Bouchez y cols, observaron que la degradación de mezclas de hidrocarburos poliaromáticos es 3 veces mayor en un consorcio de suelos que en cepas definidas (Bouchez, 1999). *Pseudomonas aeruginosa* GL1 no crece sobre hidrocarburos poliaromáticos, sin embargo es capaz de degradar los metabolitos de oxidación del fenantreno (ácido o-ftálico) y naftaleno (ácido salicílico). En un cultivo mixto de bacterias degradadoras de hidrocarburos poliaromáticos (*Rhodococcus erythropolis*, *Bacillus cereus* y *Pseudomonas fluorescens*), se observó que la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* GL1 acelera la degradación de los poliaromáticos presentes a partir de una relación de comensalismo entre la bacteria y el cultivo mixto. Esta relación de comensalismo se fundamenta en que el cultivo mixto crece a expensas de los poliaromáticos mientras que *Pseudomonas* degrada los metabolitos de meta ruptura estabilizando la población microbiana en el cultivo (Arino, 1998).

La microalga *Chlamydomonas reinhardtii* degrada en 30 días el 30% de fenantreno (Bouchez (1999) describe el consorcio CGe que degrada entre el 95-100% de una mezcla de 5 HPAs (fenantreno, fluoranteno, antraceno, pireno y fluoreno) a los 20 días de incubación, sin embargo tres cepas definidas en un cultivo mixto (5 Ant Mu5, S Flu Au1 y S Phe Na1) solo degradan entre 11 y 80% de estos hidrocarburos poliaromáticos (Bouchez, 1999). El hongo de pudrición blanca, *Phanerochaete chrysosporium*, a los 11 días remueve el 56 % de poliaromáticos presentes en suelos contaminados al adicionarse al cultivo entre 0.5 y 2.5 % m/v de Tween 80 (Zheng y Obbrad, 2000).

El pH del medio desciende de 7 a 5 unidades aproximadamente a las 32 h , descenso que se detecta cuando se observa un incremento en la oxidación de la fuente de carbono, de 2 a 4 g/L aproximadamente (Figura 7). La disminución del pH se debe a la presencia de ácido salicílico en el medio.

En el medio de cultivo se detectó la presencia de tensoactivos por *Pseudomonas aeruginosa* AT18 sobre naftaleno como única fuente de carbono. La acumulación de estas moléculas fue muy baja, 1.35 g/L de glicolípidos lo que significa un 13 % de conversión del naftaleno a glicolípidos. Rendimientos de hasta 50 % se han alcanzado con otras especies utilizando aceites vegetales como fuente de carbono (Benincasa, 2001; Haba, 2000) y a expensas de períodos muy largos de incubación 240 h (Sen et al, 1997; Linhart, 1989). El diseño del medio de cultivo favorece el aumento de los rendimientos de producción (Abalos, 2001).

El crecimiento microbiano fue muy bajo obteniéndose 0.77 g/L de biomasa que representa un rendimiento de la fuente de carbono ($y_{x/c}$) del 4%. Este bajo crecimiento puede deberse a una inhibición por toxicidad de la fuente de carbono y la poca disponibilidad de la misma por la bacteria. Es válido señalar que al finalizar el crecimiento se estabiliza la actividad biodegradativa (Figura 7).

4.4.2 Degradación de naftaleno por *Pseudomonas aeruginosa* AT18 en medio MNG.

La actividad biodegradativa y el crecimiento de la cepa en el medio MNG (Figura 8) fueron dos veces mayor, 22% y 1.73 g/L respectivamente que lo obtenido en el medio MN (Figura 7).

El aumento de la actividad biodegradativa se observó a las 40 horas aproximadamente 4.2%, tiempo a partir del cual el crecimiento de *P.aeruginosa* AT18 es a expensas del naftaleno como se refleja en la curva diáuxica obtenida (Figura 8). La glucosa actúa como cosustrato, estimulando el crecimiento de la bacteria, que en paralelo es capaz de oxidar el anillo aromático. Esta especie de cometabolismo es muy utilizada en la remoción de contaminantes (Solanas, 2002).

La acumulación de tensoactivos también fue mayor en este medio, alcanzándose 6.5 g/L y se comprobó que el incremento en la biodegradación del naftaleno en el medio MNG era proporcional a la producción de tensoactivos por *P. aeruginosa* AT18 (Figura 8). La acumulación de ramnolípidos en el medio favorece que el naftaleno esté más accesible a las células y pueda ser metabolizado. *Burkholderia sp* en presencia de ramnolípidos aumenta su actividad biodegradativa frente a naftaleno en un 50% (Sandrin y col, 2000).

Acinetobacter sp degrada el 10% de los aromáticos presentes en los crudos ligeros Arabian Ligh, Dubai, Shengli y el crudo pesado Maya, pero si están presentes alquilnaftaleno, alquilfenantreno, alquilfluorenos y alquilbenzotiofenos no degrada el crudo de petróleo. (Sigiura, 1997).

El consorcio SM8 degrada la fracción aromática presente en los crudos ligeros. La actividad biodegradativa de este consorcio sobre estos crudos alcanzó entre el 40 y el 50 %. (Sigiura, 1997).

La acumulación de los productos de biodegradación del naftaleno guarda una estrecha relación con el descenso del pH. Similar a lo observado en el medio MN, el pH desciende alrededor de las 32 h, al detectarse en el medio un incremento de la biodegradación del naftaleno; lo que significa una mayor acumulación en el medio del ácido salicílico, intermediario de la oxidación de la fuente de carbono (Figura 8).

En la Figura 9 se representan los porcentajes de biodegradación del naftaleno en medio MN y MNG por *Pseudomonas aeruginosa* AT18. Se observa que en el medio MN se detectó el inicio de la biodegradación a las 16h, estabilizándose a partir de las 64 h en un 10%. En el medio MNG el comportamiento de la cepa es diferente; se detectó el inicio de la actividad biodegradativa a las 32h la cual continúa aumentando hasta alcanzar el 22% a las 120h de incubación. Es de señalar que a pesar de que la actividad biodegradativa de *Pseudomonas aeruginosa* AT18 en el medio MN se detectó en las primeras 24h, en el medio MNG se alcanza finalmente duplicando la biodegradación del Naftaleno. (Figura 9).

5. CONCLUSIONES

1. Se aislaron cinco cepas de *Pseudomonas aeruginosa* capaces de crecer sobre petróleo, de ellas *P. aeruginosa* AT18 fue la que mostró mayor actividad biodegradativa.
2. *Pseudomonas aeruginosa* AT18 degradó un 68.3% de petróleo y un 10% de naftaleno. La degradación del naftaleno se incrementó hasta un 22% en presencia de glucosa (1:1).

6. BIBLIOGRAFÍA

- **Abalos, A., Deroncelé, V., Espuny, J., Bermúdez, R., y Manresa, A.**, 2000. Surface active rhamnolipids accumulation by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from a vegetal oil refinery wastes. *Revista Cubana de Química*. **XII**, 24-29.
- **Abalos, A.**. 2001. Producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 aplicando la metodología de superficies de respuesta. Caracterización y Aplicación del producto. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona.
- **Alexander, M.** 1981. Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science*. 211:132-138.
- **Alexander, M.** 1994. Bioremediation technologies. En *Biodegradation and Bioremediation*. Academic Press, (California, EUA)
- **Arino, S., Marchal, R., y Vandecasteele, J.P.**, 1998. Involvement of a rhamnolipid-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa* in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial community. *J. Appl. Microbiol.* **84**, 769-776.
- **Atlas, RM.** 1991. Microbial hydrocarbon degradation-bioremediation of oil spills. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **52**, 149-156.
- **Atlas, RM.** 1977. Simulation petroleum biodegradation. *Critical reviews in Microbiology*. 5:371-386
- **Banat, I. M.**, 1995. Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal-state of the art (review). *Acta Biotechnol.* **15**, 251-267.
- **Banat, IM.; Makkar, RS.; Cameotra, SS.** 1999. Potencial Comercial Applications of Microbial Surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol*, 53:495-508.
- **Baron, EJ. y Finegold.** 1990. Métodos de laboratorio en microbiología. Pruebas bioquímicas para bacterias. P62-82.
- **Beal, R. y Betts, W.** 2000. Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Appl. Microbiol.* **89**, 158-168
- **Benincasa, M.** 2001. Obtenção de biotensoactivos a partir de resíduos da indústria de oleos vegetais Tesis Doctoral. Universidad Estadual Paulista. Instituto de Química. Brasil.
- **Brown, EJ. y Braddock, IF.** 1990. Sheen Screen, a Miniaturized mat Probable Number Method for Enumeration of Oil Degrading microorganisms. *Appl Environ Microbiol*, 56:3895-3896.

-
- **Campos-García, J., Caro, A.D., Nájera, R., Maier, R., Al-Tahhannan y Soberón-Chávez, G.** 1998. The *Pseudomonas aeruginosa* rhIG gene encodes and NADPH-dependent β -ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis. *J. of Bacteriol.* **180**, 4442-4451.
 - **Cerniglia, C.E.** 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3:351-368.
 - **Chandrasekaran, E.V. y Bemiller, J.N.** 1980. Constituent analysis of glucosamoglucons. En *Methods in Carbohydrate Chemistry*. L. Whistly M.L. Wolfrom Edit. Academic Press: N.Y. Pp89-97.
 - **Chayabruta, C., Wu, J., y Ju, L.** 2001. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under denitrification: Effects of limiting nutrients and carbon substrates. *Biotechnol. & Bioeng.* **72**, 25-33.
 - **Cooper, D.G., y Paddock, D.A.** 1984. Production of a Biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 173-176.
 - **Daniel, H.J., Otto, R.T., Binder, M., Reuss, M., y Syltatk, C.**, 1999. Production of sophorolipids from whey: development of a two stage process with *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 and *Candida bombicola* ATCC 22214 using deproteinized concentrates as substrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 40-45.
 - **Espuny, M. J., Ejido, S., Mercadé, M. E., y Manresa, A.**, 1995. Characterization of trehalose tetraester produced by a waste lube oil degrader *Rhodococcus sp.* 51T7. *Toxicol. Environ. Chem.* **48**, 83-89.
 - **Fonseca, E.** 1998. Bioproducto para combatir derrames de petróleo en el mar. Tesis de Maestría. Universidad de la Habana.
 - **García, E. y Lalucat, J.** 1990. Biodegradación bacteriana del naftaleno. *Microbiología*. XX:173-179.
 - **Haba, E., Espuny, M. J., Busquets, M., y Manresa, A.**, 2000. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *J. Appl. Microbiol.* **88**, 379-387.
 - **Harayama, S., Kishira, H., Kasai, Y. y Kazuaki, S.** 1999. Petroleum biodegradation in marine environments. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**, 63-70.
 - **Harbone, J.K.** 1964. *Biochemistry of phenolic compound*. Academic Press. London. P.42.
 - **Hernández Haba, J. Y Dubón Pérez, F.** 1992. *Sistemática bacteriana*. Tercera Edición. P4.2 – 4.3.

-
- **Howe-Grant, M.** 1996. Petroleum. En encyclopedia of chemical technology. 4th. Vol 18. p.342-480. Wiley-Interscience Publication. New York.
 - **Jørgensen, K., Puustinen, J. y Sourtti, A.** 2000. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environ. Pol.* **107**, 245-254.
 - **Lang, S., y Wullbrandt, D.,** 1999. Rhamnose lipids- biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 22-32.
 - **Linhardt, R.J.,** 1989. Microbially produced rhamnolipid as a source of Rhamnose. *Biotechnol. & Bioeng.* **33**, 365-368.
 - **Maier, R., Pepper, I., y Gerba, C.** 2000. Microorganisms and organic pollutants. En *Environmental Microbiology*. Academic Press, ed. (Canada), pp.363-400.
 - **Maier, R., y Soberón-Chávez, G.,** 2000. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 625-633.
 - **Manresa, A. Bastida, J.; Mercadé, M.E.; Robert, M.; Espuny, M.J. and Guinea.** 1990. Kinetic studies on surfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *J. Indust Microb* 8:133-136.
 - **Mata-Sandoval, J., Karns, J., y Torrents, A.,** 2000. Effect of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on the solubilization of pesticides. *Environ. Sci. Technol.* **34**, 4923-4930.
 - **Matsufuji, M., Nakata, K., y Yoshimoto, A.,** 1997. High production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* growing on ethanol. *Biotechnol. Lett.* **19**, 1213-1215.
 - **Mercadé, M. E., Manresa, A., Robert, M., Espuny, M. J., de Andrés, C., y Guinea, J.,** 1993. Olive Oil Mill Effluent (OOME). New substrate for biosurfactant production. *Biores. Technol.* **43**, 1-6.
 - **Morán, A., Olivera, N., Commendatore, M., Esteves, J., y Siñeriz, F.,** 2000. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9. *Biodegradation.* **11**, 65-71.
 - **Noordman, W, Ji, W., Brusseau, M. y Janssen, D.** 1998. Effects of rhamnolipids biosurfactants on removal of phenantrene from soil. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 1806-1812.
 - **Ochsner, U., Hembach, T., y Fiechter, A.,** 1995. Production of rhamnolipid biosurfactant. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **53**, 89-118.

-
- **Olivera, N., Commendatore, M., Morán, A., y Esteves, J.**, 2000. Biosurfactant-enhanced degradation of residual hydrocarbons from ship bilge wastes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 70-73.
 - **Olvera, C., Goldberg, J., Sánchez, R., y Soberón-Chávez, G.**, 1999. The *Pseudomonas aeruginosa algC* gene product participates in rhamnolipid biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **179**, 85-90.
 - **Parés, R. Y Juárez, A.**. 1997. Bioquímica de los microorganismos. Compuestos aromáticos. Edición en Español. Editorial Reverté, S.A.. Cap. 17:229-231.
 - **Razafindralambo, H., Paquot, M., Baniel, A., Popineau, Y., Hbid, C., Jacques, P., y Thonart, P.**, 1996. Foaming Properties of Surfactin, a Lipopeptide Biosurfactants from *Bacillus subtilis*. *JAOCS.* **73**, 149-151.
 - **Rosenberg, E., y Ron, E. Z.**, 1997. Bioemulsions: microbial polymeric emulsifiers. *Curr. Opinion in Biotechnol.* **8**, 313-316.
 - **Rosenberg, E., y Ron, E.**, 1999. High- and low- molecular- mass microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 154-162
 - **Sandrin, T., Chech, A., y Maier, R.**, 2000. A rhamnolipid biosurfactant reduces cadmium toxicity during naphthalene biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4585-4588.
 - **Sen, R.**, 1997. Response Surface Optimization of the Critical Media Components for the Production of Surfactin. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **68**, 263-270.
 - **Shafeeq, M.; Kokub, D.; Khalid, Z.M.; Khan, A.M. and Malik, K.A.**. 1989: Degradation of different hydrocarbon and production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from coastal waters. *J. Appl Microbiol Biotechnol* 5:505-510.
 - **Singer, A., Gilbert, E., Luepromchai, E. y Crowley, D.** 2000. Bioremediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soil using carvone and surfactant-grown bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 838-843.
 - **Smith, M.** 1990: The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. *Biodegradation* 1:191-206.
 - **Solanas, AM.** 2002. Biodegradación y biorremediación: Aspectos básicos y aplicados de la transformación microbiana de contaminantes orgánicos. Apuntes de Curso de Pos-grado. Universidad de Barcelona. España.
 - **Sugiura, KM.; Ishihara, T. Y Harayama, S.** 1997. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. *Environ. Sci Technol.* 31:45-51.

-
- **Syldatk, C., Lang, S., y Wagner, F.**, 1985 b. Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas* sp DSM 2874. *Z. Naturforsch.* **40c**, 51-60.
 - **Tiehm, A.** 1994. Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 258-263.
 - **Viñas, M., Sabaté, J., Grifoll, M., Solanas, A.M., Vázquez, V., Gandarillas, C. y Vázquez, A.** 2001. Ensayos de tratabilidad de suelos contaminados por la tecnología de biorremediación. *Residuos. Revista Técnica.* **Año XI (59)**, 78-82.
 - **Vollbrecht, E., Rau, U., y Lang, S.**, 1999. Microbial conversion of vegetable oils into surface-active di-, tri-, and tetrasaccharide lipids (biosurfactants) by the bacterial strain *Tsukamurella* spec. *Fett Lipid.* **101**, 389-394.
 - **White, K.L.** 1986. An overview of inmuno-toxicology and carcinogenic PAHs. *Environ. Calocinogen Rev.* C4:163-2002.
 - **Yakimov, M., Fredrickson, H., y Timmis, K.** 1996. Effect of heterogeneity of hydrophobic moieties on surface activity of lichenysin A, a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus licheniformis* BAS50. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **23**, 13-18.
 - **Viñas, M.** 1999 Biorremediación de aguas contaminadas por hidrocarburos. Máster en Biología Experimental. Departamento de Biología. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona.
 - **Zhang, Y., y Miller, R.**, 1992. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Appl Environ Microbiol.* **60**, 2101-2106
 - **Zheng, Z. y Obbard, P.** 2000. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil using surfactant and the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **75**, 1183-1189.

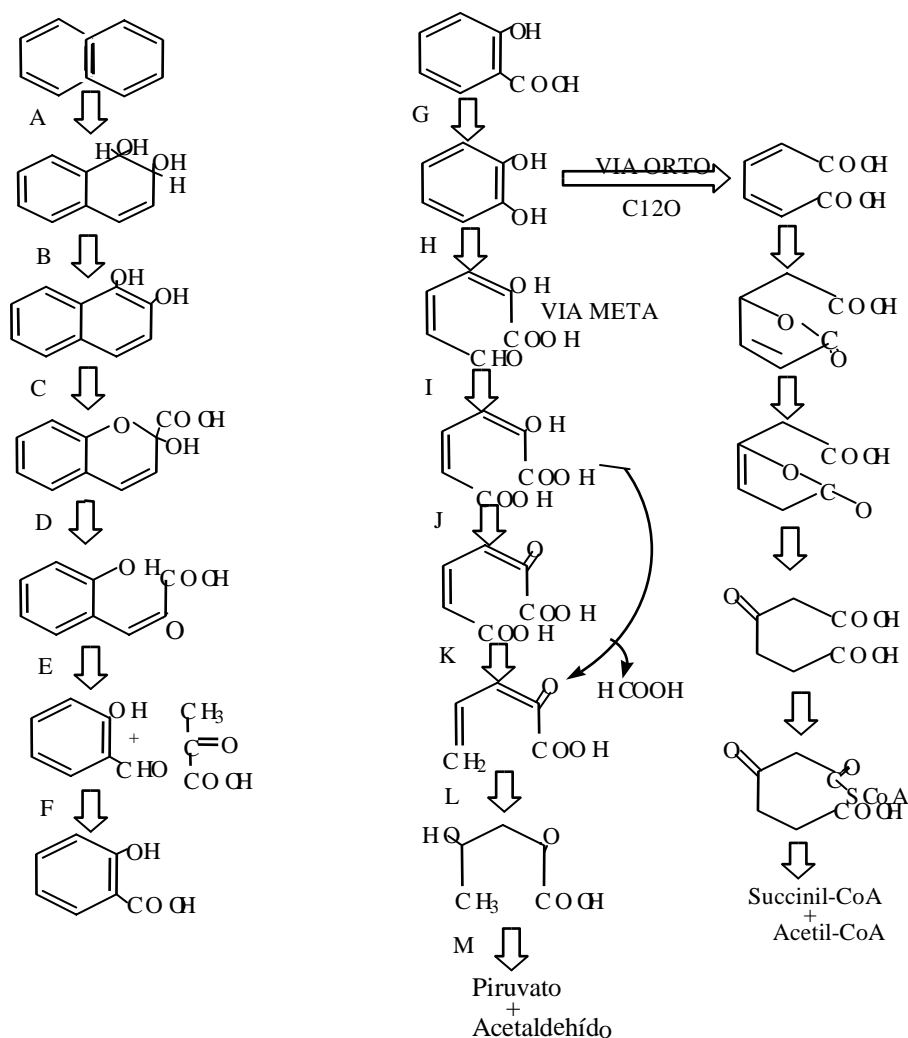


Figura 3. Ruta metabólica de degradación de naftaleno y salicilato con indicación de los enzimas responsables implicados: nahA - naftaleno dioxigenasa; nahB - cis -dihidrodiol naftalenodeshidrogenasa; nahC - 1,2 - dihidroxi naftaleno dioxigenasa; nahD - 2 -hidroxicromeno -2- carboxilato isomerasa; nahE -2- hidroxibenzal piruvato adolasa; nahF - salicilaldehído deshidrogenasa; nahG - salicilato hidroxilasa; nahH - catecol -2,2- dioxigenasa; nahI-2- hidroximuconato semialdehído deshidrogenasa; nahJ -2- hidroximuconato tautomerasa; nahK-4- oxalocrotonato descarboxilasa; nahL-2- ox -4- pentanoato hidratasa; nahM-2- -4- hidroxipentanoato aldolasa. (Tomado de García y Lalucat, 1990)

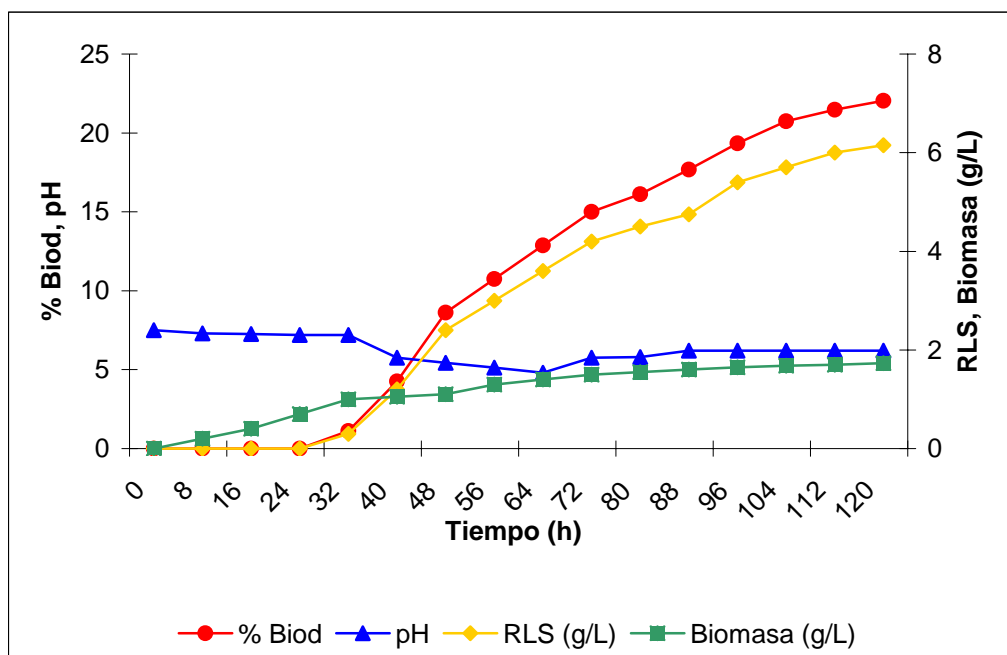


Figura 8. Cinética de fermentación de *Pseudomonas aeruginosa* AT18 sobre Naftaleno más glucosa como fuentes de carbono.

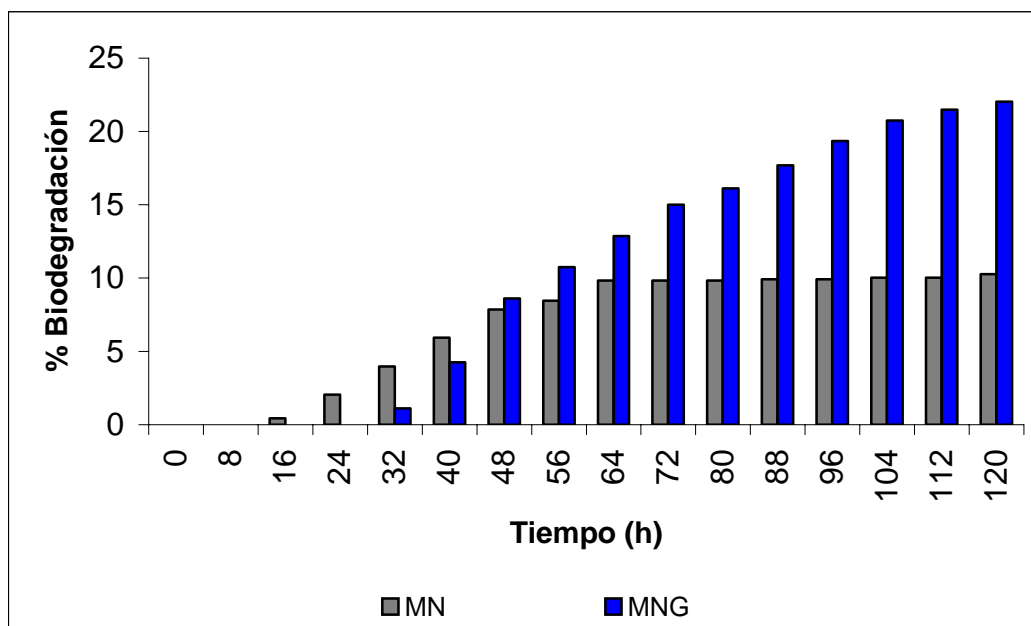


Figura 9. Degradación de Naftaleno y Naftaleno más glucosa por *Pseudomonas aeruginosa* AT18.

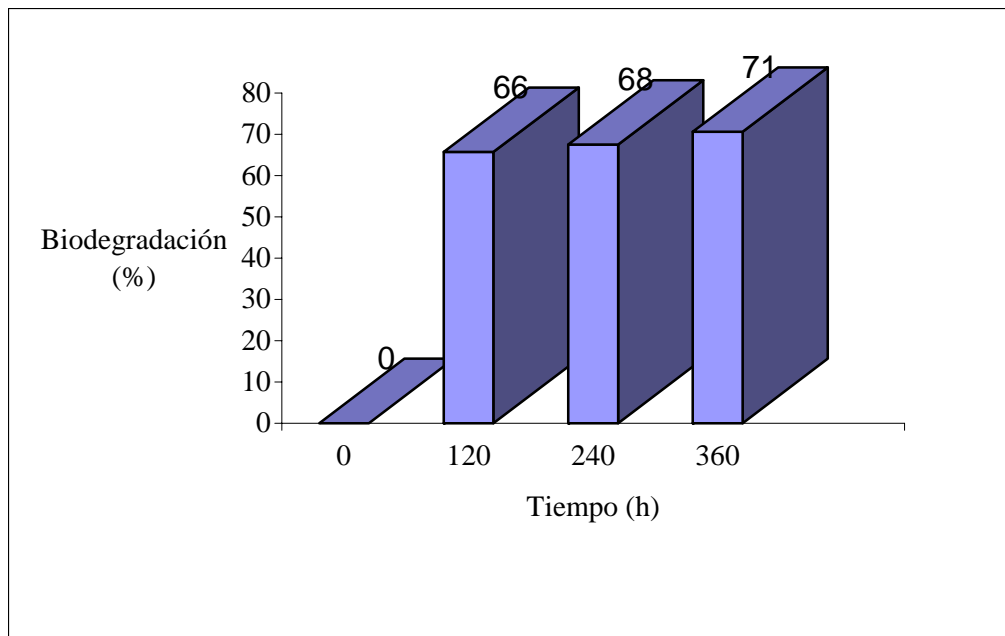


Figura 6. Biodegradación de petróleo por *Pseudomonas aeruginosa* AT18.

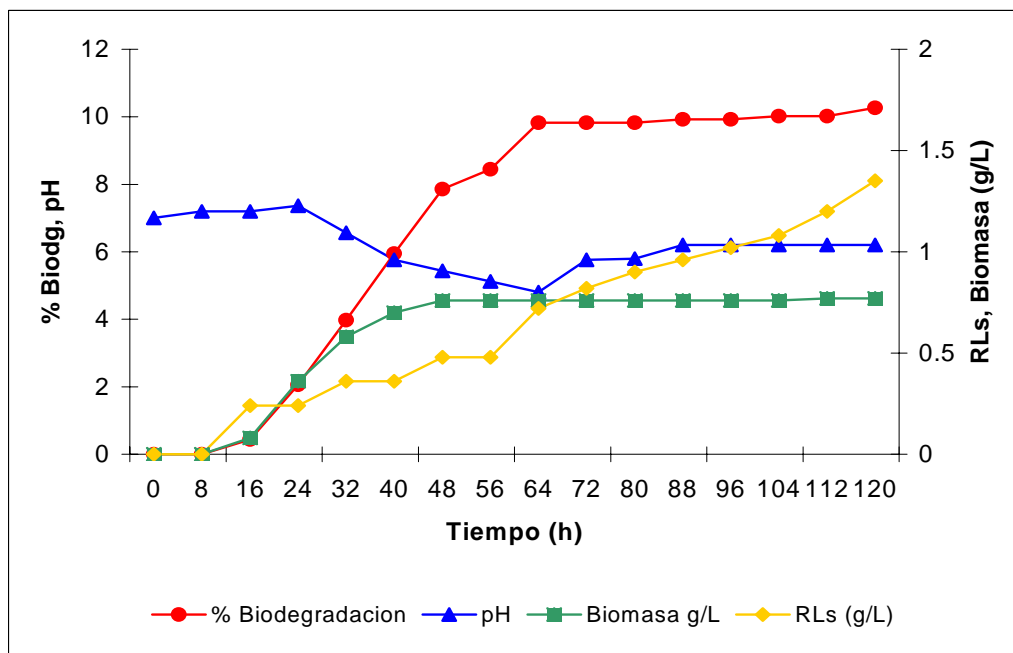
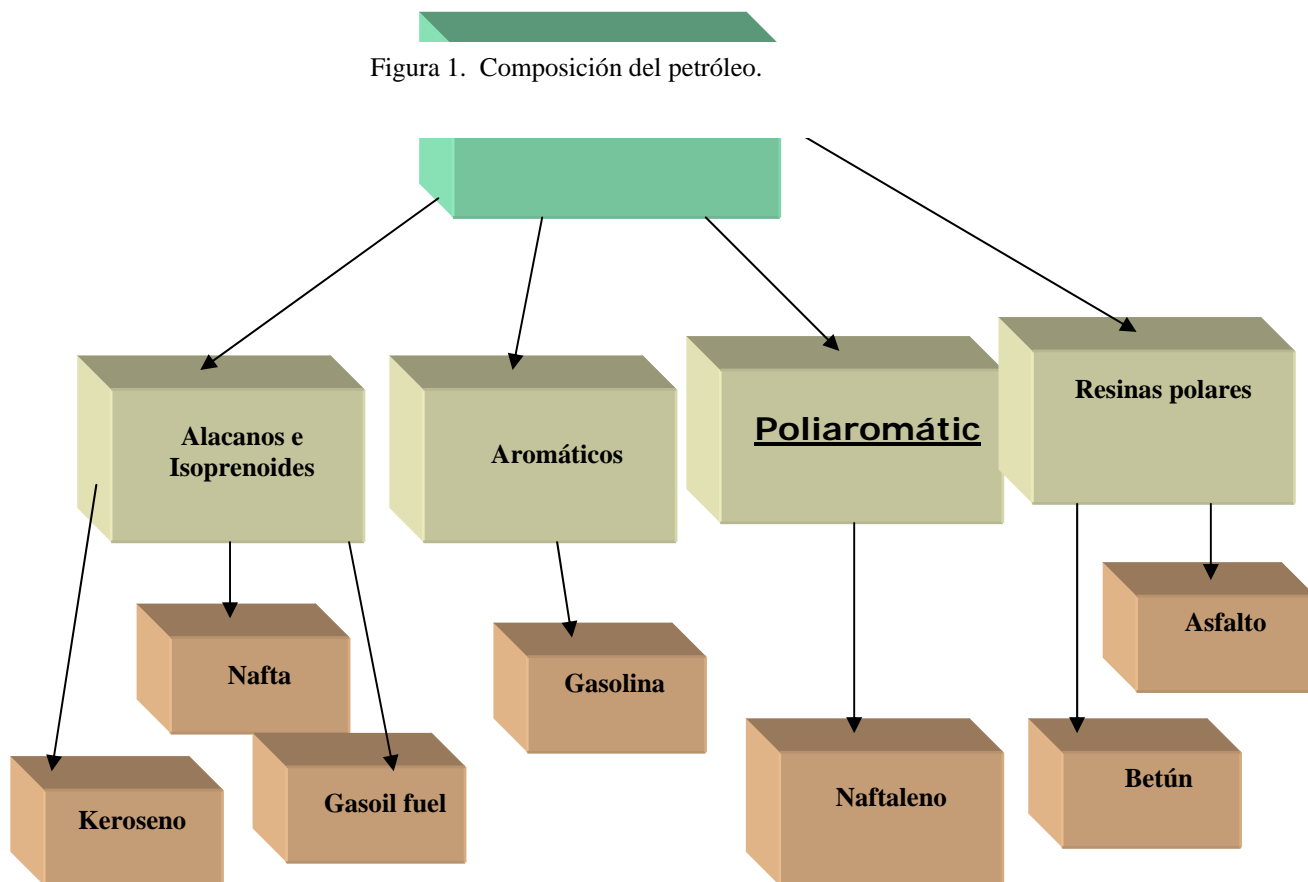


Figura 7. Cinética de fermentación de *Pseudomonas aeruginosa* AT18 sobre Naftaleno como única fuente de carbono.

Figura 1. Composición del petróleo.



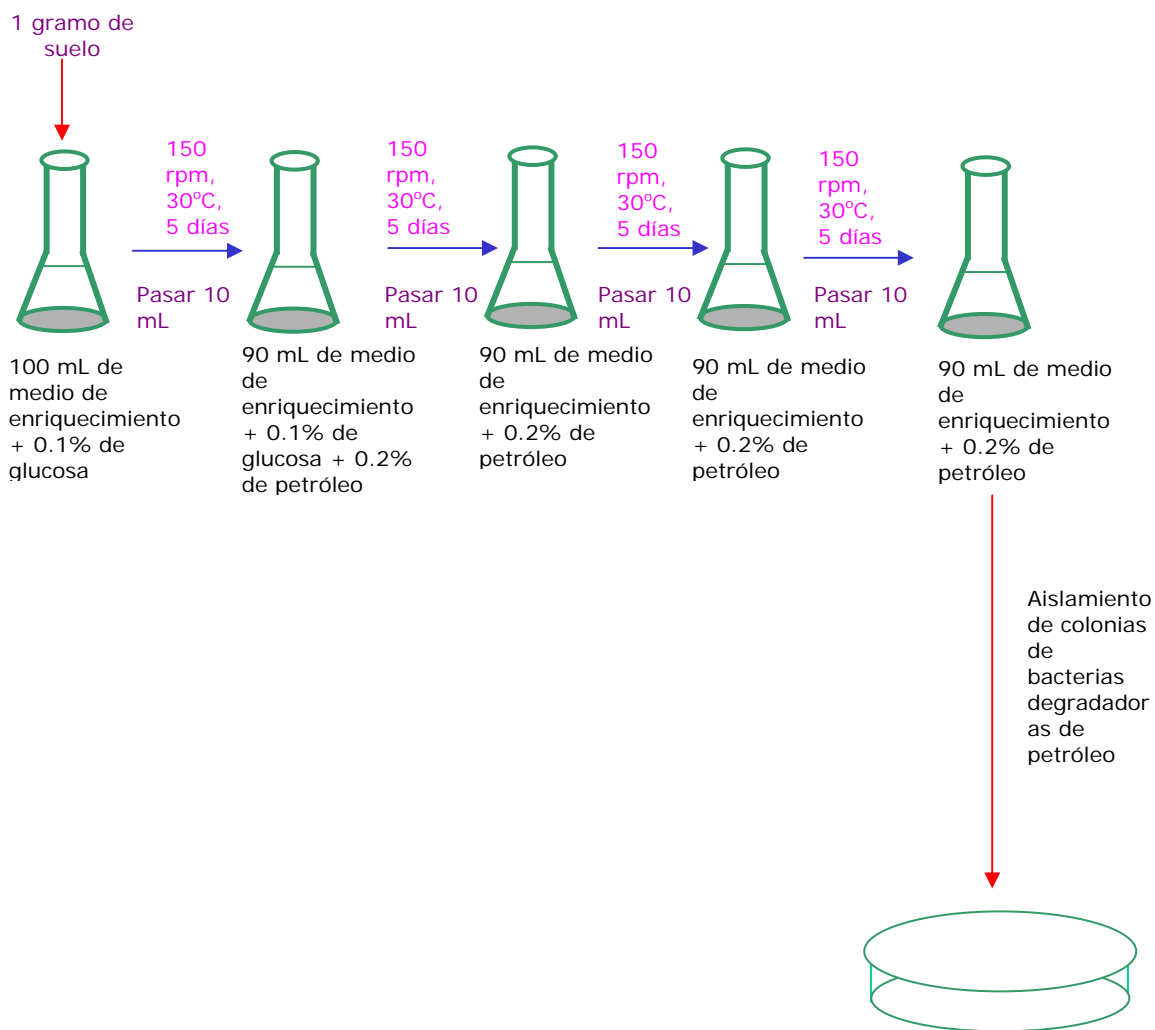


Figura 5. Proceso de enriquecimiento y aislamiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos.

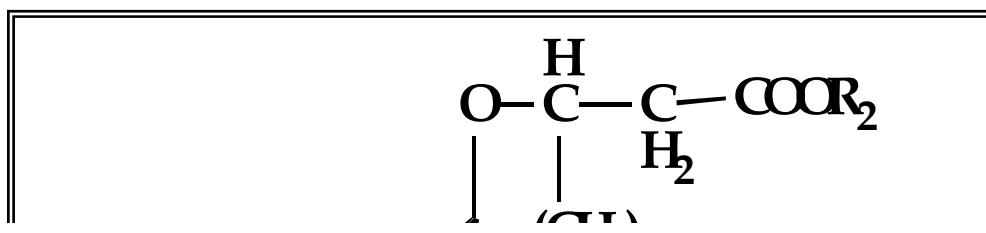


Figura 2. Vías catabólicas de los n-alcános.

omado de

