

00524
97

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



FACULTAD DE QUÍMICA

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN INICIAL
BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE BACTERIAS
DEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA
P R E S E N T A:
PERLA MARIA LUNA GARCIA



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D.F.

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado Asignado:

Presidente	Prof. Biserka Sveshtarova Pekarkova
Vocal	Prof. Jesús Fernando Montiel Aguirre
Secretario	Prof. Raquel Ortega Muñoz
1er Suplente	Prof. Norma Angélica Castellanos Chávez
2do Suplente	Prof. Luciano Hernández Gómez

Fac. de Química

Asesor

Biol. Raquel Ortega Muñoz

Supervisor técnico

Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre

Sustentante

Perla María Luna García

Agradecimientos

A mi papá celestial, por darme más de lo que yo jamás hubiera podido imaginar.....

A mis papas, que con su amor, esfuerzo y dedicación han hecho de mí lo que soy. Gracias por el inmenso sacrificio que hicieron para que yo lograra estar donde estoy y que las barreras del conocimiento, prejuicio, envidia y descontento prácticamente no existan en mi vida. Por enseñarme que disfrutar la vida es lo mejor que le puede pasar a un ser humano y que las cosas materiales pasan a un último plano cuando tienes un hogar lleno de amor y comprensión.

A los macus, Rochy y Chucho, por que son parte fundamental de mi vida, por que aprendí a reír desde la panza y llorar desde el corazón a su lado. Por que son mi equipo y siempre puedo contar con ellos. A la macu por mostrarme que la dedicación y el esfuerzo tarde o temprano traen su recompensa, por enseñarme a enseñar y por compartir su espacio y tiempo conmigo, al macu por que me enseñó que la vida esta llena de cosas y personas pequeñas por las que hay que preocuparse y ayudarlas a continuar con el largo camino, por que una sonrisa a tiempo es la mejor arma contra la critica.

A Mino, por que me enseñó lo que es la sencillez, a divertirme con cosas pequeñas, a imaginar palacios de solo palo y de cartón, joyas de roca y enredadera, grandes corceles de perros y todo un mercado completo de solo flores y hojas. Por contarme cuentos e historias, que hicieron conocer lugares y épocas que nadie más conoce. Por que me enseñó a subir árboles, la anatomía del pollo y llorar con la sección amarilla. Por que es la abuela que todos quisieran tener.

Antecedentes

El aumento en la actividad industrial, la falta de control de calidad, el descuido industrial y los accidentes producen que varios compuestos orgánicos e inorgánicos en el ambiente sean considerados actualmente como contaminantes en el suelo, el subsuelo y en los ambientes acuáticos. El decaimiento en la calidad del ambiente y los efectos en la salud han incrementado mucho la atención y los recursos para la investigación, implementación e innovación de tecnología para limpiar los ecosistemas de los contaminantes.

Se estima que a nivel mundial, se derraman en el mar y estuarios alrededor de 1.7 a 8.8 x 10⁶ toneladas de hidrocarburos asociados con el petróleo (Head y Swannell, 1999). Las fuentes potenciales son:

- ✓ Derrames por accidentes navieros y en plataformas de perforación petrolera.
- ✓ Descargas industriales y municipales a ríos y estuarios.
- ✓ Combustión de pozos petroleros.

Casos históricos de derrames.

El Ixtoc 1 en la Bahía de Campeche, México, fue destruido por un incendio el 3 de junio de 1979. Se ha estimado que 140 mil millones de barriles de crudo fueron derramados. El impacto de este derrame se observó en muchas zonas llegando a Texas para mediados de agosto de 1980 (Overton, E. *et al.*, 1994).

El Exxon Valdez, buque naviero que transportaba petróleo, liberó aproximadamente 11 millones de galones en Alaska después de que un error de navegación lo hizo encallar en marzo 24 de 1989. La capa de hidrocarburo derramada fue extendida por el viento a 25 000 millas de costa y agua adyacente, estimando que entre 3500 y 5500 animales dejaron de existir por ese accidente. La limpieza sólo en el primer año después del accidente costo cerca de 2.5 mil millones de dólares (Overton, E. *et al.*, 1994).

En la guerra del Golfo Pérsico en 1990 más de 300 pozos petroleros fueron incendiados en un lapso de 10 meses, además de que deliberadamente fueron arrojados al mar varios cientos de barriles que causaron daño en varias especies incluyendo la humana (Overton, E. *et al.*, 1994).

Antecedentes

En enero de 1988, 4 millones de galones de petróleo almacenados en un buque de la compañía Ashland Oil , Inc. se derramaron en las instalaciones de la compañía localizados en Floreffe, Pensilvania. Era la primera vez que llenaban el buque después de haber sido desmantelado para su reparación. El hidrocarburo cubrió las instalaciones de la compañía, el estacionamiento y las propiedades aledañas al lugar, además de que el clima lluvioso ocasionó que el derrame se drenara directamente en el río. Minutos después del inicio del derrame este ya abarcaba varias millas río abajo, por la corriente y el viento, dirigiéndose del río Monongahela al río Ohio contaminando temporalmente la fuente de agua potable de aproximadamente 1 millón de personas, además de la vida salvaje, daño a propiedad privada y afectando la actividad comercial de la zona (Chapelle, F.H. 1999).

En marzo 28 de 1993, un rompimiento ocurrido en los oleoductos en Fairfax County, Virginia causó el derrame de 400,000 galones de gasoleo afectando 9 millas de la costa del río Potomac (Jones, W.R. 1998).

El 2 de enero de 1997 ocurrió un derrame masivo de petróleo por el hundimiento de un buque ruso que vació más de 4 500 toneladas de combustoleo de alta densidad en el mar de Japón, aproximadamente a 65 milla de la costa oeste japonesa. El mal clima frustró los esfuerzos por disminuir el derrame con el uso de detergentes para dispersión del hidrocarburo (Jones, W.R. 1998).

Petróleo como xenobiótico y su impacto ambiental

Los xenobióticos son conocidos como compuestos creados por el hombre, presentes de forma no natural y en grandes concentraciones en el ambiente.

El petróleo existe desde mucho tiempo antes de que el humano tuviera la habilidad tecnológica para utilizarlo como energía. Por miles de años filtraciones naturales de hidrocarburos han creado ecosistemas adaptados para utilizar efectivamente el petróleo como fuente de energía.

Introducción

Composición del petróleo.

La composición natural del petróleo es muy compleja y varía mucho entre los diferentes reservorios. En general, el petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos y no hidrocarburos que son derivados de la descomposición parcial del material biogénico. Los productos resultantes del rompimiento natural de los compuestos son:

- 1.-Formas gaseosas (gas natural)
- 2.-Formas líquidas (aceites, crudo)
- 3.-Formas sólidas (betún)

Cada reservorio de petróleo es el resultado de una combinación única de biomasa y productos del rompimiento natural. Las diferencias en la composición del crudo resultan en propiedades físicas y químicas únicas para cada tipo de crudo, y estas diferencias son importantes para los procesos de refinación del petróleo y para predecir el impacto ambiental en casos de derrames (Crapes, M. *et al.*, 2000).

Los procesos de refinación del petróleo para convertirlo en productos útiles incluyen técnicas como la destilación, donde se separan los productos del petróleo por sus diferentes temperaturas de evaporación (tabla 1).

Tabla 1. Rango de temperaturas en la refinación del petróleo por destilación.

<i>Rango de temperatura de evaporación</i>	<i>Rango de prod. en la destilación del petróleo</i>
<20° C	Gas natural
20-200° C	Gasolina
185-345° C	Keroseno, gasolina de jet, diesels
345-540° C	Aceites de lubricación
>540° C	Aceites residuales

(Overton, E. *et al.*, 1994)

Introducción

Características del petróleo

- **Composición elemental.**

El elemento más común por peso es el carbono, seguido de hidrógeno y del azufre, la mayoría de los hidrocarburos contienen un porcentaje pequeño de azufre y son llamados "crudos dulces", mientras que crudos con un porcentaje mayor de azufre se conocen como "crudos amargos". Los siguientes compuestos más comunes son el nitrógeno y el oxígeno, pero también se encuentran metales en cantidades mínimas (Overton, E. *et al.*, 1994).

- **Composición molecular.**

La nomenclatura de las bases del petróleo se enfoca primero en los enlaces de carbono y su formación estructural. El siguiente esquema clasifica a los componentes del petróleo en 5 grupos:

Tabla 2. Clasificación de productos refinados del petróleo según los tipos de enlaces de carbono

<i>Grupo</i>	<i>Ejemplo</i>
Saturados	Parafinas normales, isoparafinas, cicloparafinas o naftalenos.
Aromáticos	Hidrocarburos aromáticos (AH), hidrocarburos aromáticos polinucleares (PAH) y sus C ₁ a C ₄ homólogos alquilados
Polares	Compuestos aromáticos con azufre, compuestos aromáticos con nitrógeno y compuestos aromáticos con oxígeno
Porfirinas	Estructuras grandes complejas de carbono derivadas de la clorofila y caracterizadas por su capacidad de contener en su parte central un átomo de metal.
Resinas y asfaltenos	Componentes con un peso individual alto que forman básicamente agregados coloidales

(Overton, E. *et al.*, 1994)

Las implicaciones toxicológicas del petróleo ocurren por la exposición y el metabolismo de estructuras aromáticas.

Introducción

La toxicología aguda se da por compuestos aromáticos simples incluyendo al benceno, tolueno y xilenos. Las estructuras con anillos dibenzénicos o naftalenos y series homólogas tienen una toxicidad menos aguda que el benceno pero prevalecen por un periodo de tiempo más largo. La siguiente tabla muestra una comparación entre diferentes compuestos de acuerdo a su Límite de Daño Inmediato a la Vida y Salud (DIVS) y al Límite de Tolerancia (LT) de acuerdo con los manuales del Standard National Institute for Occupational Safety and Health y American Conference of Government Industrial Hygienists.

Tabla 3. Comparación de componentes aromáticos del petróleo

Compuesto	Punto de fusión (°F)	LT (ppm)	DIVS (ppm)	Solubilidad (mg/l a 25°C)
Benceno	12	10	carcinógeno	1,800
Tolueno	40	10	2,000	470 ^a
Xilenos	63	100	10,000	198 ^b
Naftaleno	174	10	500	31.7

^a solubilidad a 16° C
^b promedio de 3 compuestos
(Overton, E. et al., 1994)

Los compuestos grandes y pesados como estructuras aromáticas (con 4 o 5 anillo) son más persistentes en el ambiente y son potenciales en la toxicología crónica. Algunos de estos compuestos son considerados como carcinógenos humanos donde se incluyen al pireno, fenantreno, antraceno y benzopirenos; éstas estructuras y sus homólogos alquilados están en concentraciones bajas en el petróleo. Los impactos toxicológicos a las diferentes especies varían considerablemente de especie a especie. Los compuestos polares son conocidos como no hidrocarburos y su principal grupo funcional se asocia con átomos de nitrógeno, azufre y oxígeno (Choi D. et al., 1999).

Los PAHs son considerados altamente carcinógenos, genotóxicos y agentes que afectan la salud humana. Varios PAHs incluyendo fenantreno, benzo(a)fluorantreno, pireno, benzo(a)antraceno, benzopireno, están listados por la U.S. Environmental Protection Agency como contaminantes de principal importancia a tratar (Keith, L. y Telliard, W., 1979).

- *Propiedades físicas del petróleo.*

Generalmente las propiedades físicas, derivan de su composición total, de la mezcla de las propiedades individuales de los compuestos que lo integran y su proporción, algunas

Introducción

características físicas incrementan la toxicidad de los compuestos, como es el caso de la solubilidad, ya que aumenta la exposición de los organismos a los compuestos (tabla 5).

Propiedades químicas.

Otras propiedades del petróleo que no son rápidamente observables se pueden extrapolar de las características físicas de los compuestos individuales. Las características más importantes son la solubilidad en agua y la presión de vapor, ya que estas son indicadores de la duración del petróleo en el ambiente.

La solubilidad en agua de diferentes compuestos se puede ver afectada por la influencia de diferentes grupos funcionales, a continuación se muestra una tabla con ejemplos:

Tabla 4. Solubilidad en agua de diferentes componentes del petróleo

Compuesto	Grupo funcional	Solubilidad ($\mu\text{g/ml}$)
Benzeno	-	1,800
Fenol	-OH	82,000
Benzaldehído	-COH	3,300
Ácido Benzoico	-COOH	2,900
Metil Benzeno	-CH ₃	515
Bifenil	C ₆ H ₆	7.5
Benzo(a)pireno		<0.01

(Overton, E. *et al.*, 1994)

La presión de vapor es la presión donde el vapor esta en equilibrio con la forma líquida, esta característica es significativa para predecir la volatilidad del producto.

Desgastamiento de los derrames.

El desgastamiento es el cambio de propiedades físicas y químicas en el crudo o productos refinados por su interacción con el ambiente (Overton, E., *et al.*, 1994).

Los factores que afectan a las capas de hidrocarburos derramados en agua para la disminución en su concentración incluyen la diseminación, evaporación, disolución, dispersión, emulsificación, absorción por los sedimentos y degradación fotoquímica y microbiana (Chapelle, H., 1999; Tapan, K. *et al.*, 2000; Baker, K.H. y Herson, D.S. 1990).

Introducción

La velocidad con la que este proceso ocurre es controlada por varios factores como la composición física y química del crudo, la exposición a factores físicos y ambientales y la preexistencia o ausencia de microorganismos degradadores de hidrocarburos. Otro factor es el clima frío ya que resulta en una disminución en la actividad microbiana. Fuertes tormentas aumentan la dispersión de la capa de hidrocarburos aumentando así el área del derrame y disminuyendo su persistencia en el ambiente (Overton, E., *et al.*, 1994).

La velocidad y efectos de la evaporación, disolución, sedimentación y degradación de los compuestos individuales afectan de una u otra manera la toxicidad del crudo y sus derivados.

Tabla 5. Características físicas asociadas a la toxicidad

<i>Peso</i>	<i>No. de átomos de carbono</i>	<i>Punto de ebullición (°C)</i>	<i>Velocidad de evaporación</i>	<i>Solubilidad</i>	<i>Toxicidad</i>
Bajo	<12	<150	rápido	alta	Altamente aguda
Medio	10-12	150-400	moderada	baja	Moderadamente aguda
Alto	>20	>400	Muy bajo	Muy baja	Crónica

(Overton, E., *et al.*, 1994)

Toxicidad y rutas de exposición.

La toxicidad de mezclas complejas como el petróleo y sus refinados es extremadamente difícil de determinar aún cuando la toxicidad de los compuestos individuales sea conocida (Overton, E., *et al.*, 1994).

La composición química del petróleo y sus subproductos tienen diversos efectos en organismos del mismo ecosistema (Crapes, M.A.C. *et al.*, 2000).

- *Componentes con toxicidad aguda*

Los compuestos monoaromáticos y diaromáticos en el crudo son considerados como los más tóxicos y más abundantes durante la fase inicial en un derrame. El naftaleno y compuestos derivados son considerados no carcinógenos, pero cuando están en altas concentraciones los efectos de toxicidad aguda son más comunes. (Overton, E. *et al.*, 1994; Crapes, M.A.C. *et al.*, 2000).

Introducción

La severidad de los efectos depende del organismo expuesto, la concentración del compuesto y la ruta de exposición.

- *Componentes con toxicidad crónica*

Con el tiempo la toxicidad aguda va disminuyendo quedando remanentes de hidrocarburos aromáticos polinucleares con mayor peso molecular. Varios de estos compuestos son conocidos como carcinógenos en humanos los cuales también han sido identificados como mutagénicos (Overton, E. *et al.*, 1994; Crapes, M.A.C. *et al.*, 2000).

Es importante señalar que el petróleo contiene homólogos alquilados de compuestos aromáticos y estos han sido identificados como responsables de la mayoría de la toxicidad conocida.

- *Rutas de exposición*

Las posibles rutas de exposición de varias clases de compuestos encontradas en el petróleo dependen de sus propiedades físicas y químicas. El petróleo es generalmente desgastado de acuerdo a sus propiedades físicas y químicas pero mientras este proceso sucede, entra en contacto con las especies que habitan en el ecosistema por una o más vías de exposición incluyendo la inhalación, ingestión, contacto dérmico y en mucha menor proporción la bioacumulación en alimentos (Overton, E., *et al.*, 1994).

La biodisponibilidad, sensibilidad y bioacumulación afecta la respuesta tóxica según la especie y el estadio de vida.

Aves. Las especies de aves que tienen como hábitats el agua son comúnmente afectadas por los derrames y capas de petróleo, ya que éstas aves dependen del agua para conseguir su alimento, la ingesta de alimento contaminado es común para la mayoría de los casos.

La presencia de petróleo rompe con la fina estructura de su plumaje resultando en la pérdida de la impermeabilidad lo que disminuye el aislamiento del cuerpo que lleva a la hipotermia (Overton, E. *et al.*, 1994).

Los efectos de la ingesta del petróleo incluyen anemia, neumonía, daño al hígado y riñón, disminución del crecimiento, cambios en la química metabólica y disminución en la producción de huevos. El petróleo en la superficie externa de los huevos ha presentado efectos

Introducción

tóxicos como eclosión prematura, teratogenicidad y crecimiento retardado (Crapes, M.A.C. *et al.*, 2000; Overton, E. *et al.*, 1994)

Mamíferos marinos. Sus rutas de exposición son la inhalación, contacto dérmico e ingestión. La inhalación es la más frecuente ya que el alimento de estas especies está en la superficie del agua, esto produce una absorción en el sistema circulatorio, irritación y posible daño permanente en las mucosas. Unas especies son más sensibles a los daños en pulmón y sistema nervioso. La hipotermia que se produce es por la misma causa de permeabilidad que recae en las aves.

Los efectos de toxicidad aguda y crónica concuerdan con: falla renal, destrucción de pared intestinal, desordenes neuronales y bioacumulación. (Overton, E. *et al.*, 1994)

Especies pelágicas. Los efectos del petróleo sobre estas especies son variados. Los efectos tóxicos en el plancton se observan en la duración de la vida, el zooplancton es más sensible que el fitoplancton, el impacto en los peces es principalmente sobre los huevos y larvas teniendo un efecto limitado en los adultos, ya que estos metabolizan los hidrocarburos aromáticos con un sistema enzimático, particularmente citocromo P₄₅₀, oxidasas, hidrolasas epóxida y glutatión s-transferasa. Este sistema facilita la remoción de hidrocarburos en sus tejidos (Malis y Hodgins, 1981); la acumulación de hidrocarburos aromáticos se encuentran contenidos en los lípidos viscerales.

Métodos de mitigación.

Se han descubierto numerosas técnicas durante los últimos 20 años pero ninguna de estas puede ser considerada como infalible. Cuando un derrame ocurre varios factores deben ser tomados en consideración para mitigar el daño y no incrementarlo; entre estos factores están la energía del ambiente, la sensibilidad de las especies residentes en el sitio, y si estas están en época reproductiva o no.

- **Métodos físicos**

Los contaminantes son generalmente almacenados utilizando bombas flotantes alrededor de derrame. Regularmente se agregan aditivos químicos que disminuyen la solubilidad del petróleo en agua (Overton, E. *et al.*, 1994; Crapes, M.A.C. *et al.*, 2000).

Introducción

Otra opción es la incineración del petróleo *in situ*. La desventaja de este método es que está limitada por el tiempo que lleva, el clima y las emisiones de humo que son un problema potencial en una combustión incompleta, ya que produce compuestos de 3 a 5 carbonos que son carcinógenos si son inhalados (Overton, E. *et al.*, 1994).

- **Métodos químicos**

Los métodos químicos pueden dispersar el petróleo en el área marina. Estos compuestos tienen una parte hidrofóbica y una hidrofílica que reaccionan de varias maneras con el petróleo y sus productos refinados (Crapes, M.A.C. *et al.*, 2000).

Dispersantes con poca toxicidad han sido bien utilizados pero hay que considerar que estos no tengan un impacto en los ecosistemas afectados antes de su uso. Básicamente los dispersantes aumentan el área superficial de los xenobióticos y la biodisponibilidad de los microorganismos degradadores (Foght, J.M. *et al.*, 1996; Overton, E. *et al.*, 1994).

- **Otros métodos**

Estos aplican a una variedad de métodos físicos y químicos. Un método químico es la aplicación de surfactantes en el derrame y uno físico es la limpieza manual de las rocas con absorbentes. Otra técnica es la biorremediación. Este es un proceso natural donde comúnmente están implicados microorganismos como hongos, bacterias y levaduras que utilizan el hidrocarburo como fuente de carbono (Crapes, M.A.C. *et al.*, 2000).

Biorremediación

Es un proceso que siempre ha existido, es natural y que a partir de los años 70 se aplicó por primera vez como técnica oficial para el tratamiento de un derrame de 379, 000 l de gasolina en Township, Pensilvania (Litchfiel, J. *et al.*, 1973) con la inoculación de microorganismos capaces de degradar hidrocarburos.

Biorremediación es un término que se utiliza para el proceso de degradación microbiológica sobre contaminantes ambientales. Los métodos físicos para remover contaminantes hidrocarbonados se ha visto que no son muy eficientes (Mckee, J.E. *et al.*, 1972), por lo tanto hay que considerar otros tratamientos que compitan en costos y que, además, sean mucho más eficaces.

Introducción

Jamison, V.W. *et al.*, reportaron que en Whitemarsh el crecimiento de los microorganismos presentes en el ambiente podía ser estimulado proveyendo oxígeno, nitrógeno y fosfatos al medio.

Desde 1970 la industria para la biorremediación solo en Estados Unidos recibe más de \$290 millones de dólares por año y fue en éste año que se acepto como una tecnología de vanguardia (Glass, D.J. *et al.*, 1995), pero los reportes de este proceso natural se remontan hasta los años 40's dónde Zobell, C.E., reportó que existían microorganismos que degradaban hidrocarburos del petróleo.

Teccani, V. en los 60's reporta que generalmente los n-alcanos son mucho más fácilmente degradables que los alcanos ramificados y los compuestos aromáticos presentes en el petróleo.

No hay que perder de vista que en los ambientes naturales existen otros procesos como dilución, absorción, dispersión y volatilidad que disminuyen la cantidad de contaminantes de forma también natural (Baker, K.H. y Herson, D.S. 1990), pero el término mineralización se aplica cuando existe una completa degradación del hidrocarburo contaminante a moléculas inorgánicas. La mineralización bajo condiciones aeróbicas resulta en la formación adicional de biomasa, CO₂, H₂O y compuestos inorgánicos.

Métodos de biorremediación.

In situ y ex situ

Las técnicas de biorremediación pueden ser clasificadas en *ex situ* donde el tratamiento incluye una remoción física del material contaminado a tratar. En contraste, *in situ* es el tratamiento del material contaminado en la ubicación del derrame. Algunos ejemplos de técnicas *in situ* y *ex situ* son nombradas a continuación (Boopathy, R. 2000).

- 1.-**Cultivo de tierra.** Tratamiento en fase sólida, puede ser *in situ* o *ex situ*.
- 2.-**Abonado.** Aeróbica, proceso de tratamiento termofílico donde el material contaminado es mezclado con un agente enriquecedor, se puede hacer usando columnas estáticas o aeradas.
- 3.-**Biorreactores.** Biodegradación dentro de un reactor para tratar líquidos y aguas pantanosas.

Introducción

4.-**Bioventilación.** Método para tratar contaminantes sólidos por la inyección de oxígeno a través del material contaminado (estimular la actividad microbiana).

5.-**Biofiltros.** Usando columnas con microorganismos fijos para tratar emisiones de aire.

6.-**Bioaumentación.** Adición de cultivos de bacterias al medio contaminado, frecuentemente usados *in situ*, pero también se realiza *ex situ*.

7.-**Bioestimulación.** Estimulación del crecimiento de microorganismos naturales de la región en sólido o en agua proveyendo de nutrientes.

8.-**Biorremediación intrínseca.** Replica el monitoreo del crecimiento de las bacterias originarias de la región.

9.-**Bombeo y tratado.** Bombeo de agua de la superficie contaminada, tratarla y reinyectarla.

Ventajas y desventajas de la biorremediación como método de mitigación

Los métodos biológicos regularmente son recibidos con mucha aceptación por la mayoría de la población, y cuentan con publicidad más favorable que otro tipo de tratamientos. Los métodos de biorremediación dependen de que los microorganismos adecuados estén en el lugar correcto con factores ambientales óptimos para que la degradación ocurra. La mayor ventaja de la biorremediación es que es un proceso natural. En teoría hay una completa destrucción de los contaminantes, ya que los productos de la biodegradación son considerados inocuos en la mayoría de los casos, no se requiere la excavación y remoción de gran parte del terreno o agua contaminada, lo que hace que la biorremediación compita en costo con estas tecnologías (Boopathy, R. 2000).

La mayor desventaja es que es altamente específica, no todos los xenobióticos son susceptibles a una biodegradación rápida y completa, además tiene una gran importancia la capacidad metabólica del microorganismo, las condiciones de crecimiento, concentraciones apropiadas del contaminante y los nutrientes. Se deben de realizar estudios preliminares del tipo de productos que surgen de la biodegradación, por ejemplo, dependiendo de las condiciones del lugar la biodegradación de tricloroetileno puede resultar en la formación de cloruro de vinil, un carcinógeno reportado (Ensley, 1991; Vogel y McCarty, 1986).

Finalmente, el proceso de biorremediación debe ser monitoreado concienzudamente y verificar que los microorganismos y productos no impacten en el futuro.

Xenobióticos y su importancia.

El estudio de los compuestos presentes en un xenobiótico son de gran interés para la elección del candidato óptimo para la biorremediación. Numerosas especies microbianas son caracterizadas por el uso de estos compuestos.

Los xenobióticos han sido estudiados según su forma de degradación, así: 1) las cadenas largas de n-alcenos son transformadas lentamente en cadenas cortas, 2) hidrocarburos saturados son más rápidamente biodegradados que sus análogos insaturados, 3) el grado de ramificación es inversamente proporcional al grado de degradación y, 4) los compuestos recalcitrantes (resistentes a la biodegradación) son comúnmente compuestos alifáticos altamente metilados (Skladany, G.J. y Metting, F.B., 1998).

Los alcanos de cadenas cortas son más tóxicos que de cadenas intermedias ($C_{20}-C_{40}$), estos últimos son sólidos hidrofóbicos que dificultan su degradación ya que tienen baja solubilidad y biodisponibilidad (Baiba *et al.*, 1998). PAH's, especialmente los de peso molecular alto son degradados lentamente con poca eficiencia (Sugiura *et al.*, 1996), probablemente por su poca solubilidad en agua y la alta energía de resonancia en sus estructuras (Cemiglia, 1992).

Tanto los compuestos naturales como los xenobióticos contienen elementos cíclicos y acíclicos incluidos en productos para conservar la madera, aceites, crudo, productos del petróleo refinado, lípidos y pesticidas. Algunos compuestos aromáticos policíclicos son constituyentes de productos del petróleo y preservativos de la madera. Los halógenos están presentes comúnmente en contaminaciones orgánicas por derrames de pesticidas y solventes, el nitrógeno que incluye reactivos azo y anilinas está en herbicidas y explosivos, el sulfuro presente como alquilsulfonatos y arilsulfonatos comercialmente se venden como surfactantes y detergentes (Skladany, G.J. y Metting, F.B., 1998).

Factores que afectan a la biorremediación

La biorremediación de un complejo de moléculas usualmente involucra una mezcla de microorganismos con una versatilidad metabólica de bacterias, hongos y otros microorganismos.

Introducción

El resultado de esta degradación depende del microorganismo (biomasa, diversidad de población, actividad enzimática), sustrato (características físico-químicas, estructura molecular y concentración) y rango de efectos ambientales (pH, temperatura, etc.). Estos parámetros además afectan al periodo de aclimatación del microorganismo al xenobiótico (Boopathy, R., 2000).

La actividad microbiana es afectada por un número de parámetros físicos, químicos y ambientales. Las superficies sólidas, que regularmente reciben material orgánico de plantas, están asociadas con un gran número de microorganismos así como de una amplia diversidad. La materia orgánica provee de una gran fuente de carbono y otros macronutrientes como nitrógeno, fósforo y sulfuro. Subsuelos y aguas superficiales tienen bajos niveles de materia orgánica y por ello un número pobre de microorganismos y diversidad (Adriaens, P., Hickery, W., 1993). Las bacterias comienzan a dominar en la comunidad microbiana cuando aumenta la profundidad del sólido o agua por lo que otros microorganismos como los hongos y actinomicetos disminuyen en número, debido a su incapacidad de usar un aceptor de electrones diferente al oxígeno (Boopathy, R., 2000)

Hay que considerar varios factores cuando se quiere diseñar un sistema de remediación de contaminantes sólidos. Entre los factores más importantes se incluyen la biodisponibilidad, la concentración de oxígeno, temperatura, pH, nutrientes inorgánicos y orgánicos así como la humedad (Skladany, G.J. y Meeting, F.B. 1998; Zaidi *et al.*, 1999).

La biodisponibilidad de compuestos orgánicos se refiere al grado en el que los compuestos pueden ser tomados y utilizados por los microorganismos. Las propiedades físicas y químicas de los xenobióticos son las que dirigen su transporte y absorción, y en gran medida su biodisponibilidad y toxicidad, así como su solubilidad en agua y su fracción lipídica. La disponibilidad de los microorganismos para degradar a compuestos hidrofóbicos depende de la accesibilidad de las células a los compuestos o a su capacidad para producir enzimas extracelulares para degradarlos (Zaidin, *et al.*, 1999; Setti, *et al.*, 1999; Colores *et al.*, 2000). Varias bacterias son capaces de emulsificar hidrocarburos en solución produciendo agentes activos que funcionan como surfactantes (Koch *et al.*, 1991; Neu, 1996) que aumenta la adhesión del sustrato a la célula (Baldi *et al.*, 1999). Otros tratamientos incluyen la agitación vigorosa del sólido contaminado para romper las grandes partículas estimulando la biodegradación drásticamente (Manning, J. *et al.*, 1995).

Introducción

Tabla 6. Factores de mayor importancia que afectan en la biorremediación

<i>Microbiana</i>	Crecimiento de biomasa Mutaciones y transferencia horizontal genética Inducción enzimática Enriquecimiento del medio aprovechable por la célula Producción de metabolitos tóxicos
<i>Ambiental</i>	Depleción de sustratos Biodisponibilidad de nutrientes Condiciones inhibitorias ambientales
<i>Sustrato</i>	Concentración del xenobiótico Estructura química de contaminantes Toxicidad de contaminantes Solubilidad de contaminantes
<i>Procesos biológicos aeróbicos y anaeróbicos</i>	Potencial de oxidación-reducción Biodisponibilidad del aceptor de electrones Población microbiológica presente en el sitio del derrame
<i>Crecimiento, sustrato vs. co-metabolismo</i>	Tipo de contaminantes Concentración Fuente alternativa de carbono presente Interacción microbiana (competitivo, sinergista, etc.)
<i>Biodisponibilidad fisico-química de contaminantes</i>	Absorción irreversible Incorporación de material orgánico
<i>Limitaciones en la transferencia de masa</i>	Difusión de oxígeno y solubilidad Difusión de nutrientes Solubilidad/miscibilidad en/con agua

(Zaidi *et al.*, 1999)

La biodisponibilidad de xenobióticos es controlada por procesos fisico-químicos como absorción, desorción, difusión y disolución (Crapes, *et al.*, 2000).

En ambientes sólidos la biodisponibilidad de los contaminantes en las células se ve disminuida. Friedrich *et al.*, (2000) reportaron la diferencia en la degradación de fenantreno si es enriquecido el medio con diferentes surfactantes. Además ha demostrado que la aplicación de

Introducción

surfactantes a medios con fenantreno y hexadecano alteran la población responsable de la degradación (Colores, G., *et al.*, 2000; Haramaya, S. 1997).

El crecimiento y metabolismo de microorganismos en ambientes naturales está limitada entre otras cosas por la disponibilidad de donadores de electrones, aceptores de electrones y otros nutrientes esenciales. En el derrame de algún hidrocarburo los donadores de electrones no están en forma limitante ya que éste funciona como tal, generalmente el compuesto limitante es el aceptor de electrones, que puede ser oxígeno, nitrato, sulfato o Hierro III. El uso de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es comúnmente utilizado en sistemas de biorremediación ya que el oxígeno molecular es ligeramente soluble (8mg/l a 20°C) en agua lo que limita su uso como aceptor de electrones (Chapelle, F. H. 1999; Zaidin, *et al.*, 1999). En contraste el H_2O_2 es completamente miscible en agua y espontáneamente se descompone en oxígeno $(2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2)$. En 1989 Spain cuantificó la cantidad de oxígeno disuelto demostrando que la vida media del H_2O_2 es de solo 6 minutos.

La cantidad de oxígeno disponible determina si el sistema es aeróbico o anaeróbico. La mayoría de los compuestos son más rápidamente degradados en condiciones aeróbicas. En este caso el oxígeno actúa como último aceptor de electrones. Los microorganismos aeróbicos han sido los más profundamente estudiados, pero la importancia de los microorganismos anaeróbicos radica en que hay algunas reacciones, como la reducción de halógenos, que no se puede llevar a cabo en presencia de oxígeno (Skladany, G.J. y Metting, F.B. 1998).

Varios estudios para la década de los 90 habían sugerido que los hidrocarburos del petróleo comienzan a ser oxidados bajo condiciones anaerobias (Cozzarelli, *et al.*, 1990). Esto fue inesperado ya que en los 70's se creía que las moléculas de oxígeno eran necesarias para la biodegradación de hidrocarburos (Bailey, *et al.*, 1973). De hecho, el primer microorganismo capaz de mineralizar completamente el alquíl benzeno en condiciones estrictamente anaeróbicas fue aislado por primera vez en 1988 (Lovley, D.R. y Phillips, E.J. 1988). Estudios en laboratorios muestran que hidrocarburos del petróleo también son degradados bajo condiciones anaerobias (Huntchins, S.R., *et al.*, 1991). Por varios años la oxidación anaerobia de los hidrocarburos del petróleo fue controversial porque los procesos aeróbicos habían sido el foco de muchos estudios ambientales marinos. Ahora la importancia de la oxidación anaerobia en la degradación de hidrocarburos del petróleo está firmemente establecida (Lovley, D.R. 1997)

Introducción

Si se presenta en altas concentraciones, cualquier compuesto puede ser tóxico; hasta la sencilla azúcar causa efectos sobre las propiedades osmóticas de las células llegando a ser fatal para éstas. La biorremediación en estos casos se lleva a cabo diluyendo los xenobióticos y esto es más factible que otras estrategias como la incineración.

La temperatura también tiene un papel fundamental en la velocidad de reacciones bioquímicas. Algunos microorganismos son capaces de sobrevivir a temperaturas extremas pero sus actividades son disminuidas a temperaturas muy bajas o muy altas.

En la biorremediación de compuestos sólidos hay que identificar y mantener el pH. Las especies mas conocidas tienen un pH óptimo entre 5 y 9 (Zaidi, B.R. *et al.*, 1999).

El nitrógeno y fósforo son los principales compuestos inorgánicos utilizados por la célula. Para cuantificar la cantidad de nitrógeno y fósforo necesario para un crecimiento máximo se tiene que estimar la disponibilidad de carbono en el sistema, y calcular la proporción ideal de C/N/P. Varios estudios utilizan una proporción de 100/10/1 pero también se han reportado de 120/10/1 y 100/4/1. Es importante proveer de estos nutrientes de una forma asimilable. La ausencia o baja disponibilidad de microelementos requeridos no limita de forma importante el crecimiento (Zaidi, B.R. *et al.*, 1999; Skladany, G.J., Metting, F.B., 1998).

El crecimiento microbiano se ve influenciado por la presencia o ausencia de tóxicos o materiales inhibitorios. La inhibición o toxicidad es el resultado de un aumento en la concentración del contaminante y no simplemente de su presencia. Algunos químicos solo inhiben el crecimiento de algunas especies y otros compuestos son letales a las mismas concentraciones. Para un biotratamiento la concentración tóxica de los químicos debe ser cuidadosamente evaluada (Skladany, G.J. y Metting, F.B., 1998).

Vías metabólicas en la biodegradación.

Hay varias vías catabólicas reportadas con mucho detalle (Cerniglia 1984; Garbic-Galic 1989). El rompimiento de los anillos aromáticos está involucrado en procesos de acción de la monooxigenasa y dioxigenasa; se encontró un ataque oxidativo sobre el anillo, formando un diol intermediario seguido de la formación de un ácido orgánico (Gibson, D.T., 1971) y la simple presencia de un metilo sustituyente aumenta la biodegradabilidad de esta molécula (Gibson, D.T. y Subramanian, V. 1984).

Introducción

Todavía falta mucho por entender de las vías metabólicas utilizadas para la biodegradación pero ya existen algunos estudios al respecto.

Varias investigaciones han encontrado que algunos microorganismos poseen un sistema dual-enzimático para una sustancia, un primer sistema con relativamente poca afinidad por el sustrato y es utilizado cuando el sustrato está en alta concentración, el segundo sistema se activa cuando el sustrato está en concentraciones bajas, estas enzimas tienen una alta afinidad. En condiciones de buen crecimiento la célula puede utilizar enzimas relativamente ineficientes pero cuando las condiciones de crecimiento son pobres, enzimas más eficientes pueden ser utilizadas (Skladany, G. y Metting, B., 1998).

Se ha demostrado que microorganismos del mismo género y especie tienen capacidad diferente para degradar hidrocarburos alifáticos (Chakrabarty *et al.*, 1973) ya que esta capacidad frecuentemente está codificada en plásmidos.

Los plásmidos son elementos genéticos semiautónomos y pueden estar en la célula hospedera por 3 razones: confieren una ventaja fenotípica a la célula hospedera, se puede propagar de una bacteria a otra con una alta eficiencia y puede ser heredada en línea directa a su hija (Bingle, L.E.H. y Thomas, C.T. 2001).

Es bien conocido que los plásmidos proporcionan a varias especies de bacterias la habilidad de catabolizar varios hidrocarburos y otros compuestos orgánicos (Farrell, R. y Chakrabarty, A.M. 1979), así como su completa mineralización (Furukawa, K. y Chakrabarty, A. 1982).

Los genes que codifican para la dioxigenasa han sido clonados y secuenciados en plásmidos pertenecientes a las familias de TOL y NAH (Burlage, S., *et al.*, 1989) y se ha demostrado su presencia en DNA cromosómico (Hamann, C. *et al.*, 1999)

También está reportado que hay enzimas encargadas de la degradación codificadas en DNA cromosomal (Hamann, C. *et al.*, 1999).

Tecnología en la biorremediación.

Los tratamientos biológicos exitosos sobre contaminantes sólidos requieren la combinación de conocimientos en ecología microbiana y procesos de ingeniería. El objeto de los proyectos de ingeniería es crear las condiciones más favorables para el crecimiento de los microorganismos como biorreactores o biorremediación en fase sólida (Zgajnar, A. y Zagora-Koncan, J., 1999).

Bioaumentación.

Bioaumentación es la inoculación a sólidos, mantos freáticos, ambientes marinos y espacios cerrados (biorreactores, pipas, tanques de almacenamientos y otros) de microorganismos naturales o genéticamente modificados (GEMs) (Forsyth, *et al.*, 1995; Baud, *et al.*, 1995). En general la bioaumentación no es aprobada por considerar que afecta varias superficies abiertas en el ambiente. En contraste, la bioaumentación en ambientes cerrados como los biorreactores es muy aceptada así como en lugares donde accidentalmente se realizó un derrame de materiales peligroso y en donde dichos microorganismos nunca antes habían estado presentes (Booparthy, 2000; Baud-Grasset, F. y Bogel, T.M., 1995).

- ***Inoculantes comerciales.***

Los inoculantes comerciales, están compuestos por cultivos puros o de una o más especies. Los cultivos puros son manufacturados bajo condiciones controladas. En Estados Unidos hay cerca de una docena de compañías que manufacturan paquetes con microorganismos que degradan compuestos orgánicos. Los productos incluyen sustancias para el tratamiento de aguas municipales, degradación de aceites en fábricas y talleres, así como para restaurantes (Skladani, G. y Metting, B., 1998).

- ***Consorcios aclimatados.***

Los análisis de biotratabilidad han demostrado *in situ* una buena degradación de xenobióticos por la adición continua de un consorcio de microorganismos. En lugares donde se ha producido una biodegradación se toma una muestra que se inocula en un lugar donde haya un contaminante similar y el ambiente sea parecido en condiciones climáticas (Grady, 1985). Si la concentración del xenobiótico es disminuida por disolución puede ser posible encontrar un consorcio de microorganismos capaces de degradar fácilmente al contaminante, y cuando se tiene suficiente tiempo es posible seleccionar y aclimatar al consorcio, además se debe de cuantificar la cantidad adecuada de inóculo a agregar (Hamann, C. *et al.*, 1999).

Introducción

- **GEMs.**

El uso de GEMs es ideal para el tratamiento de compuestos peligrosos. La razón por la que es un método aceptado es por que son fácilmente removidos del ambiente. Teóricamente existen microorganismos que son capaces de degradar compuestos recalcitrantes. Esta tecnología ha mejorado el uso de biorreactores (Hamann, C. *et al.*, 1999; Head, I. y Swannell, R.P.J. 1999; Watanabe, K., 2001)

Existen varias situaciones donde el uso de GEMs representa la mejor alternativa, estas oportunidades se dividen en 3 categorías: (Skladany, G. y Metting, B., 1998)

1.- Situaciones donde el único microorganismo capaz de colonizar y crecer en cierta situación no tiene la capacidad metabólica para degradar los contaminantes presentes. La ingeniería genética en éste caso le proporciona al microorganismo la capacidad de biodegradación.

2.-Situaciones en donde es necesario el uso de un compuesto tóxico para estimular a los microorganismos para la degradación.

3.-Para la producción eficiente de enzimas específicas. Es el caso de bacterias que se inmovilizan en columnas.

La segunda situación es en particular de gran importancia, por ejemplo bacterias que tienen un sistema enzimático capaz para la degradación de tetracloro etileno (TCE) el cual solo es inducido por la presencia de fenol o compuestos tóxicos similares.

Otra especialidad de la ingeniería genética que está surgiendo últimamente es la capacidad de un microorganismos de degradar diferentes contaminantes (Al-hadhrami, M.N., *et al.*, 1997; Cernilia, C.E., 1992)

Necesidades futuras para la biorremediación.

Para llegar al máximo potencial en la biorremediación se requieren de una constante investigación y una transferencia de tecnología de varias materias.

Las investigaciones requieren incluir protocolos estandarizados para analizar los productos nuevos y métodos para monitorear los estudios de tratabilidad. La mayor necesidad se encuentra en la investigación de fenómenos ambientales y ecológicos para mejorar en lo posible

Introducción

las tecnologías actuales e innovar tecnologías, principalmente *in situ* (Zgajnar, A., Zagora-Koncan, J., 1999).

El objetivo de estas acciones es minimizar el riesgo para la salud humana y ambiental ya que varias tecnologías no siempre degradan por completo los contaminantes.

Se están estimando los efectos ambientales y la posible acumulación de productos intermediarios tóxicos del rompimiento de los xenobióticos, colocando como biosensores microorganismos sensibles a estos compuestos. Un sistema, el Microtox Bioassay, está siendo comercializado actualmente (Symons y Sims, 1988). Otra forma de evitar este problema es el uso de cultivos mixtos que cubre un amplio espectro metabólico (Monteiro, A. *et al.*, 2000).

La ignorancia en procesos geológicos, hidrológicos, físicos, químicos y microbiológicos limita la realización de la degradación *in situ*. Varios problemas no han sido bien caracterizados por la naturaleza heterogénea de las causas del derrame y el contaminante en sí (Booparthy, 2000).

Los métodos para la caracterización de las comunidades microbianas y monitoreo de su actividad en la actualidad son insuficientes. Conteo en placa, técnicas como el número más probable, cuantificación de la actividad enzimática, entre otros, están limitadas en su uso. Por el contrario el descubrimiento y mejoramiento de técnicas moleculares para el monitoreo de poblaciones individuales, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y técnicas para la identificación filogenético de microorganismos están en auge (Colores, G.M. *et al.*, 2000; Chakrabarty, A.M., 1976; Hammann, C. *et al.*, 1999).

Microorganismos relevantes en la biorremediación.

Desde 1973 con los trabajos de Chakrabarty se ha puesto de manifiesto que ciertas cepas de *Pseudomonas* tienen la capacidad para degradar hidrocarburos alifáticos (Chakrabarty, 1993). Así mismo, Foght y colaboradores (1996) han establecido que cepas de *Pseudomonas* son importantes en la biodegradación de químicos tóxicos ya sean naturales o producto de la actividad industrial; al mismo tiempo menciona las dificultades para resolver la taxonomía de este organismo.

Introducción

Tradicionalmente los estudios en la degradación de contaminantes han sido iniciados por el aislamiento de uno o más microorganismos capaces de degradar estos compuestos; sin embargo, los métodos de aislamiento convencionales han resultado en el aislamiento de solo una fracción de la diversidad de microorganismos en ese ambiente contaminado. Además, la mayoría de estos microorganismos muestran cinéticas de degradación en laboratorios que difieren de las observadas en el ambiente. (Watanabe, K. y Baker, P. 2000)

La ecología molecular se utiliza para estudiar poblaciones bacterianas que están en ambientes contaminados por petróleo. Estos estudios han arrojado resultados de su análisis filogenético encontrando α y γ *Proteobacterias* en las playas de Sandy, África, y en las playas del ártico noruego bacterias pertenecientes a las familias de *Pseudomonas* y *Cycloclasticus* (Watanabe, K., 2001); en ambas regiones se produjeron derrames accidentales anteriores al análisis.

Poblaciones microbianas que estuvieron en un ambiente contaminado, después de una suplementación del agua con fertilizante fueron monitoreadas, encontrándose un aumento en el crecimiento de α *Proteobacterias* y de *Alcanivorax*. Los hidrocarburos del petróleo son persistentes en condiciones aeróbicas y esta contaminación de la superficie marina es un serio problema ambiental. De una diversidad de derrames de hidrocarburos y solventes se analizaron muestras encontrando *Syntropus spp* y *Methanosacta* actuando en forma sinergista (Watanabe, K., 2001).

Se han encontrado bacterias metanogénicas degradadoras de tolueno en consorcios constituidos por *Methanosacta* y *Methanospirillum* además de dos especies, una relacionada con el género *Desulfotomaculum* y otra sin relación con este género (Watanabe, K., 2001).

Comunidades asociadas con la degradación anaerobia del benceno con Fe (III) como reductor, fueron analizadas encontrando que *Geobacter spp* tiene un papel importante en la oxidación anaeróbica del benceno (Watanabe, K., 2001).

PAHs son compuestos muy conocidos por su capacidad de persistir en el ambiente y su potencial para deteriorar la salud humana (Kanaly, R. y Harayama, S., 2000) *Burkholderia*, *Sphingomonas* y *Mycobacterium* son bacterias relacionadas con la rápida degradación de benzopirenos.

Introducción

Los metales componentes de diversos xenobióticos en el ambiente son un serio problema. Estudios actuales demuestran la capacidad de ciertas bacterias para sobrevivir en ambientes contaminados con metales (Sandaa, R., *et al.*, 1999) como las *α -Proteobacteria* y *Actinobacterium* (Watanabe, K., 2001). Recientemente, *Ralstonia eutropha*, bacteria metaloresistente, fue modificada genéticamente para expresar metalotioneina en la superficie de sus células y fue inoculada en un campo con Cd^{2+} como contaminante. Esta disminuyó los efectos tóxicos de este metal pesado en el crecimiento de las plantas de tabaco (Valls, M., *et al.*, 2000).

Actualmente no se cuenta con un método completamente efectivo y aceptado para el tratamiento de derrames de hidrocarburos, se requiere más investigación en cada uno de los diferentes tratamientos lo que nos lleve al desarrollo de este trabajo de tesis. Creo firmemente que la biorremediación bien aplicada y evaluada será considerada en un mediano plazo el mejor tratamiento en derrames de hidrocarburos ya que la información genética, microbiológica y bioquímica esta avanzando con pasos agigantados. La contribución de este trabajo en el tema consiste en la identificación de bacterias nativas con la capacidad de degradar hidrocarburos así como en la optimización de los procesos de degradación que harán que la permanencia de los hidrocarburos en lugares no deseados sea mucho mas corta.

Objetivos

Objetivo general.

Aislar y caracterizar bacterias capaces de degradar hidrocarburos presentes en una muestra de agua de un derrame accidental de diesel en un estanque en el km 84 de la carretera México-Hidalgo.

Objetivos

Objetivos particulares.

1. Comprobar si el mejoramiento ecológico que se presentó en la zona fue causado por degradación bacteriana.
 - 1.1. Aislar bacterias, capaces de degradar diesel, presentes en la muestra de agua.
 - 1.2. Comprobar su capacidad de degradar diesel.
 - 1.3. Identificar, basándonos en pruebas bioquímicas, a las bacterias aisladas.
 - 1.4. Determinar si las bacterias, en consorcio, presentan una la actividad sinérgica.

2. Determinar si las bacterias aisladas tienen plásmido, donde presuntamente estuvieran codificadas las proteínas responsables de la degradación.

3. Estudiar el patrón electroforético de las proteínas expresadas en las diferentes bacterias.

4. Optimizar el proceso de biodegradación en el laboratorio.

Material y Método

Muestreo

La muestra se obtuvo colectando agua cerca del caudal de un arroyo en época de lluvias, el cual se vio afectado por un derrame accidental de diesel en el Km. 84 de la carretera México-Hidalgo.

Determinación de la presencia de microorganismos en la zona afectada.

1 gramo de la muestra se suspendió en 15 mL de medio mineral (ver anexo), se tomó una alícuota y se le realizaron diluciones 1/100 y 1/1000. Por vaciado en placa se realizó la siembra en un medio con agar, medio mineral y diesel como fuente de carbono. Se incubó durante 48 hrs. a 28 °C. Por su abundancia y características macro- y microscópicas se seleccionaron colonias que fueron crecidas en el mismo medio, y se inocularon por técnica de estria a 28°C durante 24 hrs.

Identificación de bacterias degradadoras de diesel.

Para la identificación de las cepas seleccionadas, cada una de ellas se sembró en medio Pseudomona y Mc Conkey, además de llevar a cabo pruebas bioquímicas. Estas pruebas se llevaron a cabo bajo la técnica y el sistema comercial API 20 E (bacilos no fermentadores), que se basa en los cambios de color en cada una de las cápsulas, debido a la acción microbiana sobre los sustratos contenidos en cada una de ellas. Estos cambios de color se interpretan visualmente y se utilizan las tablas de referencias y el software para su interpretación.

Después de la inoculación de las cepas, el sistema, que consta de 20 pruebas bioquímicas, se inocula a 37°C de 24 a 48 hrs.

Crecimiento bacteriano en medio con diesel.

Se realizó un diseño experimental para la cuantificación celular bacteriana, ya que debíamos asegurarnos de que el diesel no interfiriera para la cuantificación. Éste diseño experimental se realizó teniendo como variables el tiempo de centrifugado, número de lavados y limpieza de las paredes del tubo ependorf en cada lavado ya que el diesel presenta cierta adhesión a las paredes de éste. Las tablas 7, 8 y 9 que se encuentran en el anexo muestran los resultados obtenidos.

Material y Metodo

Los resultados indicaron la mejor forma para que el diesel no entorpeciera en la cuantificación celular. Un mililitro de cultivo se muestreó cada 24 hrs. Se centrifugó por 4 minutos a 10 000 rpm, se resuspendió en 1 mL de agua destilada, se centrifugó nuevamente repitiendo el procedimiento 3 veces, en cada decantado se limpiaron las paredes del ependorf y por último se resuspendió con 1 mL de agua destilada y se procedió a hacer la lectura a 660 nm, con agua destilada como blanco. La lectura se hizo por triplicado para cada curva de crecimiento.

Posteriormente, se evaluó el crecimiento de las cepas seleccionadas a diferentes concentraciones de macro- y micronutrientes. Para este análisis se utilizó como fuente de carbono peptona. La evaluación de las concentraciones de los nutrientes se basó en la elaboración de dos medios minerales, nombrados 1 y 2, dónde su composición se muestra en el anexo.

Se realizó una solución stock de células microbianas, cuantificando el número de unidades por mililitro para que fueran inoculadas el mismo número de células por matraz para que todas las curvas de crecimiento al tiempo cero tuvieran una concentración inicial de 0.05 de absorbancia en 100 mL de medio mineral.

Una vez que los matraces con medio mineral se inocularon con el mismo número de células bacterianas, se agregó diesel a una concentración final del 2%, y se incubaron a 28°C muestreando cada 24 hrs.

Con la solución stock de cada una de las cepas se realizó una mezcla de la misma cantidad de unidades por microorganismo, generando un consorcio microbiano, que fue evaluado en su crecimiento, de la misma manera que cada uno de los microorganismos aislados separadamente.

Optimización del crecimiento bacteriano en medio con diesel

Con el fin de optimizar el proceso de biodegradación se modificaron algunas variables para evaluar su efecto.

- 1) Primero se realizó una premezcla del diesel con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en una relación 2:1 H_2O_2 – Diesel; esta mezcla se agitó vigorosamente en varias ocasiones

Material y Método

dejando en intervalos de reposo, según se comenta en la técnica de Zaidi e Imam (1999). Este diesel pre-tratado se agregó a matraces inoculados de la misma manera que los matraces que contenían diesel "sin tratar".

- 2) Se compararon los resultados en el crecimiento bacteriano obtenidos en los matraces con diesel "tratado" y "sin tratar". Se seleccionó el tipo de diesel que favorecía el crecimiento y se evaluó el efecto de la concentración de la fuente de carbono en el crecimiento de dicha bacterias. Se corrieron para cada cepa 3 curvas variando la concentración de la fuente de carbono (1, 1.5 y 2%) además de evaluarlo en el consorcio microbiano.
- 3) Finalmente, se evaluó el efecto de la adición periódica de 1 mililitro de H_2O_2 en el aumento de la densidad microbiana, la adición se hacía inmediatamente después de tomar la muestra para la lectura diaria. Se agregaba el peróxido de hidrógeno al 1 %.

Las curvas control se realizaron con el medio mineral pero con 0.5% de peptona. Estos matraces se colocaron en las mismas condiciones de crecimiento que los matraces que contenían como fuente de carbono diesel tratado y sin tratar, se muestrearon cada hora hasta que llegaron a la fase estacionaria de crecimiento. Se leyeron a 660 nm contra el blanco que era medio peptonado de reciente preparación.

Obtención de ADN plasmídico.

La extracción del plásmido se realizó usando la metodología de Kado, C.I y Liu, S.T, (1981) y Montiel, F. (1994). Se cultivaron los microorganismos en 20 mL medio-L (ver anexo), durante 24 hrs a 28°C, se tomó 10 ml del medio y se centrifugaron a 3000 rpm a 4°C durante 10 minutos. El pellet se resuspendió en 1 ml de buffer E (ver anexo). Las células se lisaron añadiendo 2 ml de solución de lisis (ver anexo).

Las células se mezclaron con la solución de lisis con delicadeza. Esta solución se calentó entre 50-65°C durante 20 minutos a baño maría. Después de éste periodo de tiempo se le agregaron 2 volúmenes de una solución 1:1 fenol-cloroformo (el fenol que se utiliza debe ser estandarizado, ver anexo) y se agitó formando una emulsión, ésta se separó por centrifugación a 10 000 rpm a 4°C durante 45 minutos.

Material y Método

Se recuperó la fase acuosa y se le agregó 1/20 de volumen de acetato de sodio 3M y 2.5 volúmenes de etanol. Se incubaron durante 30 minutos a -70°C y se centrifugó a 10 000 rpm a 4°C por 10 minutos. El pellet se lavó con etanol al 70% y se centrifugó nuevamente a las mismas condiciones. El pellet se resuspendió en 50 μL de buffer TE (ver anexo) y se guardó a -4°C , como nuestra solución stock.

Análisis de restricción del ADN plasmídico.

La técnica utilizada para determinar los sitios de corte de los plásmidos aislados de los microorganismos con las enzimas de restricción Eco RI fue descrita anteriormente por Montiel, F. (1994).

En un tubo ependorf se colocaron 13 μl de agua destilada estéril, 2 μl de buffer apropiado para cada enzima de restricción, 2 μl del ADN a cortar y 1 μl de la enzima de restricción Eco RI. Se incubó esta mezcla a 37°C durante 30 minutos y se corrió la muestra en gel de agarosa al 1 %.

Electroforesis en geles de agarosa de ADN

Se preparó 100 ml de gel de agarosa al 1 % en buffer Tris borato 1X (ver anexo). La mezcla buffer-agarosa se llevó a ebullición sin que se derramara, con agitación intermitente en un matraz estéril. Alternativamente, la agarosa se podía disolver por calentamiento en un horno de microondas o bien en autoclave.

Una vez disuelta la agarosa y que la temperatura de la mezcla había descendido a unos 60°C , la mezcla se vaciaba sobre el molde del gel. Cuando la agarosa gelifica se retiraba cuidadosamente el peine formador de los pocillos quedando el gel listo para ser cargado.

Se tomaron 2 μL de la solución stock y se le añadió una décima parte del volumen de la mezcla de reacción de buffer de carga (ver anexo), se mezcló perfectamente bien y se colocaron cuidadosamente en un pocillo del gel. Se iniciaba la corrida aplicando una corriente de 90 volts. Un factor limitante en este punto es el calentamiento del gel y su potencial deformación ya que a mayor cantidad de corriente, mayor producción de calor.

Material y Método

Las bandas de ADN se visualizaron revelando el gel con bromuro de etidio (1 µg/ml) durante unos 10 minutos. El exceso de bromuro de etidio se eliminaba lavando el gel con agua destilada durante 10 minutos, agitando frecuentemente.

El gel teñido se observó utilizando un transiluminador de luz ultravioleta de onda media (302 nm) o corta (298nm).

Extracción de proteínas.

La evaluación del espectro electroforético de las proteínas expresadas en la degradación del diesel se realizó comparando las bandas obtenidas de la extracción proteica de colonias que habian llegado a la fase estacionaria de crecimiento en medio con diesel tratado como fuente de carbono, y de cepas que fueron cultivadas en medio peptonado.

Se tomó 1.5 mL del medio y se centrifugó a 10 000 rpm durante 15 minutos. El pellet se resuspendió en 4 ml de buffer de muestra (ver anexo) y se colocó a ebullición en baño maría durante 5 minutos, se centrifugó por 5 minutos a 10 000 rpm y se recuperó el sobrenadante.

- ***Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida.***

Para detectar las proteínas se utilizó gel de poliacrilamida a 12.5% y el concentrador a 6.0%. La preparación del gel separador y la del concentrador se muestra en el anexo.

La cantidad de proteínas se determinó por el método de Bradford (ver anexo). La corrida se realizó a 150 volts constantes en el gel concentrador y en el gel separador a 180 volts constantes.

Resultados y Discusión

Muestreo

La muestra que se obtuvo en el kilómetro 84 de la carretera México-Hidalgo era una suspensión de color café claro y poco viscosa, con olor característico del diesel.

Determinación de la presencia de microorganismos en la zona afectada

La biorremediación sigue siendo considerada actualmente como una tecnología en desarrollo. Un gran inconveniente con la biorremediación es propio de su naturaleza ya que contiene aún una gran cantidad de microorganismos no caracterizados (Watanabe, K. 2001). La gran mayoría de los microorganismos capaces de degradar contaminantes que han sido aislados y caracterizados en el laboratorio son considerados una minoría de los que contribuyen en la biorremediación. Otra dificultad es que, nunca dos problemas ambientales ocurren completamente en condiciones idénticas; por ejemplo, variaciones en el tipo y cantidad de contaminante, condiciones climáticas y tipo de tierra o agua. Por estas razones se decidió enfocar este estudio solo en un tipo de microorganismos, los bacilos Gram negativos.

De la muestra obtenida, 1 gramo fue suspendido en medio mineral y tomando una alícuota se realizaron diluciones 1/100 y 1/1000; por vertido en placa se sembró la muestra en un medio sólido con Diesel como única fuente de carbono y se inoculó obteniendo aproximadamente 10 tipos de colonias diferentes. Se seleccionaron las colonias que tenían más crecimiento realizando tinción de Gram y seleccionando solo aquellas donde los microorganismos eran bacilos Gram negativos. Varias referencias bibliográficas hacen mención a la efectividad de estos tipos de microorganismos en la degradación de hidrocarburos y otras referencias los señalan como relevantes para la biorremediación (Watanabe, K. 2000; Cochran, W., *et al.* 1999; Hamman, C., *et al.* 1999; Shields, M., 1985; Amor, L., 2000) aunque no son excluyentes con otro tipo de microorganismos.

Los resultados obtenidos de los análisis micro y macroscópico de las colonias seleccionadas se muestran en la tabla 10. Los medios que se seleccionaron para la selección y diferenciación de los microorganismos fueron en relación a las características deseadas para este estudio. El Agar Mac Conkey es un medio selectivo y diferencial para la detección de organismos coliformes y patógenos entéricos, debido a que su concentración de sales biliares y cristal violeta lo hace selectivo para microorganismos Gram negativos y el color de las colonias indica

Resultados y Discusión

su capacidad para la degradación de la Lactosa. Además se cultivaron en Agar nutritivo para la identificación de la *Pseudomona* por su producción de coloración azul verdosa por la producción de pigmentos de plicianina y fluoresceína además de su olor característico en este medio.

Tabla 10. Resultados de las observaciones macro y microscópicas observadas de las colonias seleccionadas.

<i>Pruebas</i>	<i>Colonia A</i>	<i>Colonia B</i>	<i>Colonia C</i>
Tinción de Gram	Bacilos Gram negativos	Bacilos Gram negativos	Bacilos Gram negativos cortos
Siembra en Agar MacConkey	Crecimiento abundante	Crecimiento abundante	Crecimiento moderado
Siembra en Agar Nutritivo	Crecimiento abundante	Crecimiento abundante	Crecimiento abundante
Oxidasa	positiva	positiva	negativo

En las tres colonias seleccionadas y denominadas como A, B y C se detectaron bacilos Gram negativos, con crecimiento abundante en Agar nutritivo.

Las colonias de los microorganismos designados "A" y "B" eran planas, presentan márgenes lacerados, pigmento verde-azul, olor a uvas y son opacas gris verdoso. Observándolas microscópicamente se vieron bacilos Gram negativos. Mediante estas pruebas y basándonos en la morfología colonial, en el olor característico de las colonias y la producción de pigmentos fluorescentes, pudieron identificarse de manera presuntiva como *Pseudomonas*. Esto se comprobó posteriormente mediante la realización de pruebas bioquímicas.

La morfología microscópica de la colonia "C" mostró que son cocobacilos Gram negativos. Las colonias formadas eran chicas con bordes lisos y con un ligero tinte azul-verdoso. No arrojando ningún resultado concluyente con relación a la especie, se procedió a realizar la identificación de los microorganismos a través de pruebas bioquímicas que se explican a continuación.

Aunque los métodos de aislamiento han resultado en la identificación de solo una fracción de la gran diversidad de microorganismos, la cantidad y selección de las bacterias capaces de degradar hidrocarburos muestran que la técnica utilizada, para este tipo de estudio, proporciona suficiente evidencia de su efectividad para el aislamiento de este tipo de microorganismos.

Resultados y Discusión

Identificación

Para la identificación de los microorganismos se utilizó un sistema API 20E.

Los métodos actuales para la identificación de microorganismos en los últimos diez años han tenido un gran desarrollo aumentando su sensibilidad, facilidad de uso y rapidez en el resultado como lo demuestra el sistema utilizado para este trabajo.

Los resultados del sistema API 20E se muestran en la tabla 11 .

Tabla 11. Resultados de las pruebas bioquímicas hechas por tiras reactivas API 20E a las colonias aisladas.

<i>Prueba bioquímica</i>	<i>Colonia A</i>	<i>Colonia B</i>	<i>Colonia C</i>	<i>Control P. aeruginosa</i>
OPNG	-	-	-	-
Arginina	+	+	-	+
Lisina	-	-	-	-
Ornitina	+	+	-	-
Citrato	-	-	+	+
Sulfuro de hidrógeno	-	-	-	-
Ureasa	-	-	+	V
Triptofano deaminasa	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-
Voges Proskauer	-	-	-	-
Gelatina	+	+	+	+
Glucosa	+	+	+	+
Manitol	+	+	V	V
Inositol	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-
Ramnosa	-	-	-	-
Sacarosa	-	-	V	-
Melibiosa	-	-	-	-
Amigdalina	-	-	-	-
Arabinosa	-	-	-	-
Oxidasa	+	+	+	+
Mobilidad	+	+	+	+
Aerobios estrictos	+	+	+	+

(v) variable, (+) positivo, (-), negativo.

Para la identificación de las colonias "A" y "B", se tomaron en cuenta las observaciones microscópicas, morfología colonial y resultados de las pruebas bioquímicas obtenidas. Concluimos que se trata de *Pseudomonas fluorescens* en el caso de la colonia "A" y

Resultados y Discusión

Pseudomonas aeruginosa en el caso de la colonia "B". En el caso de la colonia "C" el microorganismo se identificó como *Acinetobacter*.

Crecimiento de bacterias en medio con diesel.

Con el objetivo de determinar si los microorganismos aislados tenían la capacidad de degradar el diesel se realizaron curvas de crecimiento, cultivando a los microorganismos en medio mineral con diesel como única fuente de carbono y añadiendo macro- y micronutrientes esenciales. Debido a que el medio mineral no contenía ninguna fuente de carbono excepto el diesel, únicamente se presentaría crecimiento si las bacterias son capaces de degradarlo y aprovecharlo como nutriente.

Es bien conocido desde hace tiempo que la mayoría de los constituyentes de los hidrocarburos son susceptibles a la biodegradación (Prince, R.C., 1997; Wang Z.D., *et al.* 1998) y que la biodegradación en ambientes acuáticos es frecuentemente limitada por la disponibilidad de nutrientes, como el nitrógeno y el fósforo (Bragg, J., *et al.* 1994; Colcomb, K., *et al.* 1997). El estudio sobre el efecto de las concentraciones de los macro- y micronutrientes del medio mineral se realizó debido a que en la literatura se encontraron diversas concentraciones de este medio para este tipo de bacterias (Amor, K., *et al.* 2000; Zaidi y Imam 1999). Se utilizaron dos medios minerales que contenían los mismos compuestos pero en diferentes concentraciones; el medio de micronutrientes número 1 presentó un mejor crecimiento por lo que las concentraciones de éste fueron las que se adoptaron para las siguientes determinaciones (Para ver las concentraciones del medio mineral no. 1 y 2, referirse al anexo).

Actualmente se sabe que un gran número de microorganismos son capaces de degradar la gran mayoría de los compuestos presentes en el petróleo y sus derivados, y que estos microorganismos se encuentran presentes en la naturaleza, por esta razón, la biorremediación ha sido considerada una herramienta muy útil en la limpieza de derrames y en el tratamiento de residuos. Con lo anterior no se quiere afirmar que la simple presencia de los microorganismos con esta capacidad garantice que los componentes hidrocarbonados serán metabolizados. Por ejemplo, la baja hidrosolubilidad de los compuestos los convierte a los compuestos en resistentes a la biorremediación ya que su biodisponibilidad disminuye. Aunque los hidrocarburos representen una gran fuente de carbono, otros nutrientes son necesarios para el crecimiento celular y estos pueden estar en forma limitante, esto puede ser remediado con la adición de fertilizantes. Para verificar si la presencia en mayor o menor cantidad de ciertos compuesto presentes en el medio mineral que se utilizó, era relevante en el crecimiento de los

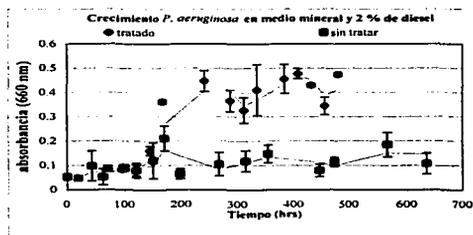
Resultados y Discusión

microorganismos aislados en este trabajo, se variaron, en cierta proporción y como se describe en material y métodos de este trabajo, las concentraciones de algunos compuestos, resultado que en nuestro caso la variación de FeSO_4 , EDTA y citrato de sodio fue fundamental para el buen crecimiento bacteriano de nuestras cepas.

Con el objeto de determinar si el mejoramiento ecológico presentado en el lugar del derrame se debía a la acción bacteriana como un consorcio o de la acción predominante de una de las tres bacterias, se decidió crecer a cada tipo celular por separado y compararlo con el crecimiento que presentó el consorcio.

En una primera fase, se determinó la velocidad de crecimiento de las bacterias aisladas en medio mineral con 2 % de diesel como fuente de carbono (diesel sin tratar) y en presencia de 1% de peróxido de hidrógeno que al descomponerse en agua y oxígeno este último funciona como aceptor de electrones (diesel tratado) que favorecería, según la bibliografía la degradación del diesel. Las figuras a, b, y c representan el crecimiento de cada una de las bacterias observándose en los 3 casos que la velocidad de crecimiento es mejor con diesel tratado y que en el caso del diesel sin tratar el crecimiento es escaso.

Figura a*. Crecimiento bacteriano en medio con diesel sin tratar y tratado con H_2O_2 . la técnica se describe en material y método.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Resultados y Discusión

Figura b. Crecimiento de *P. fluorescens* en medio con diesel tratado y sin tratar.

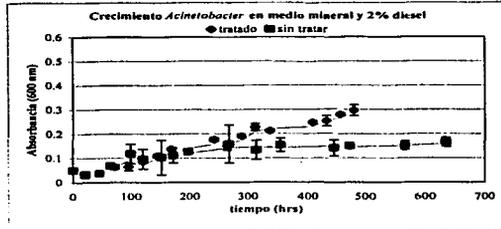
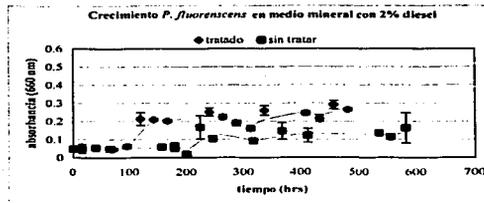


Figura c. Crecimiento de *Acinetobacter* en medio con diesel tratado y sin tratar.



De las figuras a, b y c se puede concluir que en presencia de diesel sin tratar el crecimiento de las tres cepas es escaso y homogéneo entre las tres, sin embargo, el crecimiento mejora cuando es utilizado el diesel tratado con anterioridad con peróxido de hidrógeno, presentando *P. aeruginosa* mejor crecimiento en comparación con las otras cepas, que entre estas dos no se presentó una gran diferencia en su crecimiento. La primera bacteria en entrar a fase logarítmica fue *P. fluorescens* aunque su crecimiento máximo no fue tan marcado como *P. aeruginosa* que entró en fase logarítmica hasta las 150 horas de iniciado el cultivo. Esto puede ser un indicativo

* Todos los datos de las gráficas se muestran en el anexo

Resultados y Discusión

de que las tres bacterias pudieran estar utilizando compuestos diferentes como fuente de carbono. Las curvas control que se desarrollaron en las mismas condiciones experimentales usando como fuente de carbono peptona, muestran un crecimiento muy similar en las 3 cepas con esta fuente de carbono fácilmente degradable (gráficas y datos en el anexo).

El Peróxido de Hidrógeno es otro de los compuestos que ha sido reportado como catalizador en la biorremediación (Harayama, S., 1997; Lansch, B.C. et al 1997; Millar, C.M., 1999). La bibliografía ha presentado dos posturas muy claras, la primera es que el peróxido de hidrógeno actúa como oxidante de los compuestos hidrocarbonados creando cadenas más cortas y más fáciles de metabolizar. La segunda postura consiste en afirmar que la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno más soluble, permite que este último funcione como aceptor de electrones necesarios para la metabolización de los hidrocarburos.

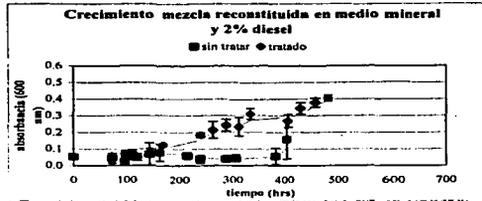
Las primeras curvas, a, b, c y d, se realizaron para comprobar si el peróxido de hidrógeno efectivamente tenía un efecto oxidante en el Diesel, favoreciendo la utilización de éste como fuente de carbono. Tanto *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y *P. fluorescens* presentaron un mejor crecimiento haciéndose más visible en el crecimiento de *P. aeruginosa*, llegando a ser éste cuantificable hasta aproximadamente 0.5 de absorbancia, lo cual corrobora la primera teoría mencionada con anterioridad. Cuando se realizó este experimento con la mezcla reconstituida, como se describe en material y método, donde se colocaron cantidades iguales de los microorganismos aislados para que actuaran en consorcio, se observó también una mejora no muy diferente a la que presentó *P. aeruginosa* aislada lo que posteriormente corroboraríamos con las demás fases experimentales.

Una dificultad con la biodegradación bacteriana es que no todos los componentes de los hidrocarburos son degradados con la misma eficiencia, y en algunos casos consorcios de estas son requeridos para completar su degradación (Jansson, J.K., et al. 2000).

Cuando se reconstituyó el consorcio bacteriano (figura d) también se observó un mejor crecimiento en los matraces que contenían diesel tratado, pero a diferencia de las bacterias aisladas, el crecimiento fue un poco más lento, lo que puede sugerir la producción de metabolitos tóxicos de alguna de ellas que afecta en el crecimiento de las otras cepas.

Resultados y Discusión

Figura d. Crecimiento de la mezcla reconstituida de las 3 bacterias aisladas en medio con diesel tratado y sin tratar. La reconstitución de la muestra fue hecha según la metodología descrita en material y método.



A continuación, se decidió crecer a las bacterias aisladas a diferentes concentraciones de diesel tratado para determinar que tanto la disponibilidad afectaba el crecimiento de estas bacterias (recordando que a mayor concentración de hidrocarburo la disponibilidad de este aumentará), este tema ha sido ampliamente tratado en varias investigaciones (Booparthy, 2000; Zaidí, R., et al. 1999; Jones, W., 1999)

La figura e muestra el crecimiento de *P. fluorescens* a diferentes concentraciones de diesel tratado, observándose una velocidad de crecimiento mejor con 2%.

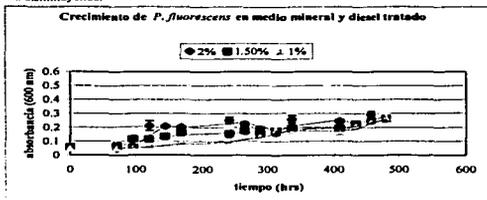
P. aeruginosa mostró un buen crecimiento a las 3 concentraciones pero a 2 % y 1.5% obtuvieron un crecimiento muy similar (figura f) y aunque al 1 % se obtuvo un crecimiento mucho mejor que con diesel sin tratar (figura a) el crecimiento fue menos abundante que a concentraciones mas altas de diesel tratado.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

* Todos los datos de las gráficas se muestran en el anexo

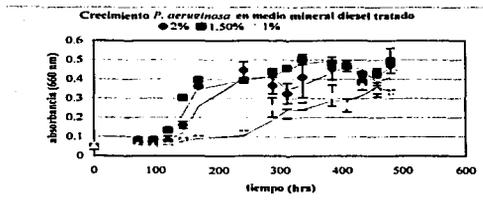
Resultados y Discusión

Figura e*. Crecimiento de *P. fluorescens* a diferentes concentraciones de diesel como fuente de carbono, la disponibilidad del diesel se ve afectada en la medida que la concentración de este hidrocarburo va disminuyendo.



Los resultados que presenta *Acinetobacter* son diferentes ya que su crecimiento máximo se obtuvo a las concentraciones de 1.5 % tal vez porque a una concentración de diesel de 2% comienza a ser tóxico para ésta cepa. El crecimiento más bajo se obtuvo con 1%. Los resultados se observan en la figura g.

Figura f*. Crecimiento de *P. aeruginosa* con diesel tratado a diferentes concentraciones.

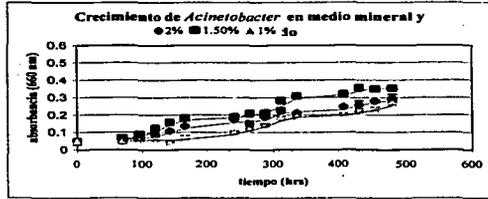


* Todos los datos de las gráficas se muestran en el anexo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

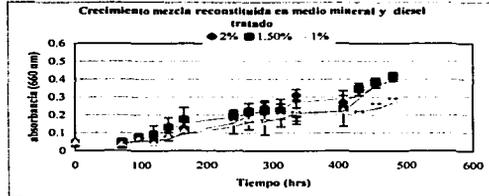
Resultados y Discusión

Figura g*. Crecimiento de *Acinetobacter* a diferentes concentraciones de diesel.



Cuando se reconstituyó la mezcla y se sometió a varias concentraciones de diesel tratado se observa un crecimiento muy similar en todas las concentraciones (figura h). En esta gráfica se vuelve a observar que aunque el crecimiento es mejor que con diesel sin tratar no se ve un incremento en el crecimiento por el hecho de actuar en consorcio ya que la cantidad de células no es mayor que cuando se puso a crecer *P. aeruginosa* solamente.

Figura h*. Crecimiento de la mezcla reconstituida a diferentes concentraciones de fuente de carbono. La reconstitución de la muestra se describe en material y método.



La velocidad con la que las células microbianas pueden convertir los contaminantes durante la biorremediación depende de la velocidad en la que los contaminantes puedan ser disponibles y metabolizados además de la velocidad en que se transfieren a la célula (transferencia de masa).

* Todos los datos de las gráficas se muestran en el anexo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Resultados y Discusión

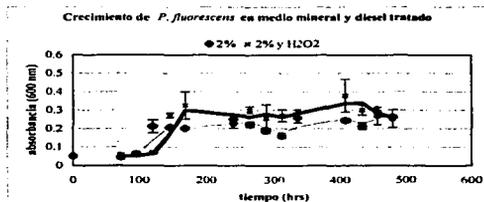
La biodisponibilidad de los contaminantes es controlada por procesos fisicoquímicos. Una biodisponibilidad baja de contaminantes sólidos es causada por una lenta transferencia de masa para la degradación microbiana. El crecimiento en las muestras a pesar de que era muy parecido en los 3 casos, fue mayor en todos los casos a una concentración del hidrocarburo de 2% seguida de la concentración al 1.5% y por último 1% haciéndose mas notable esta diferencia con *P. aeruginosa*.

Los resultados anteriores demuestran que la biodisponibilidad de este hidrocarburo, en particular en estas cepas, es determinante para su crecimiento y bastaría profundizar en este tema para comprobar cual es la concentración tóxica para estas cepas en específico.

Para optimizar el proceso de biodegradación de diesel se decidió correr curvas al 2% con diesel tratado añadiendo periódicamente H_2O_2 . En la literatura también esta reportado la utilización del oxígeno como ultimo aceptor de electrones necesario para la degradación de hidrocarburos (Chapelle, F.H. 1999). El peróxido de hidrogeno aumenta considerablemente la solubilidad del oxígeno en agua (Chapelle, F.H. 1999; Zaidin, et al., 1999).

* La figura i muestra cómo el crecimiento de *P. fluorescens* se ve beneficiado con la adición periódica de peróxido de hidrógeno ocurriendo algo similar con *P. aeruginosa* y *Acinetobacter*, figuras j y k respectivamente; la descomposición espontánea del peróxido en agua y oxígeno, produce que el oxígeno este más disponible en el medio que cuando solo se usa la agitación, y así se pueda utilizar como aceptor final de electrones.

Figura 7. Comparación de el crecimiento de *P. fluorescens* en diesel tratado y con la adición periódica de H_2O_2 .

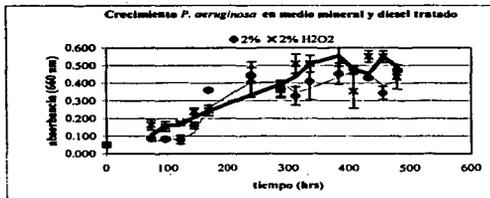


* Todos los datos de las gráficas se muestran en el anexo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Resultados y Discusión

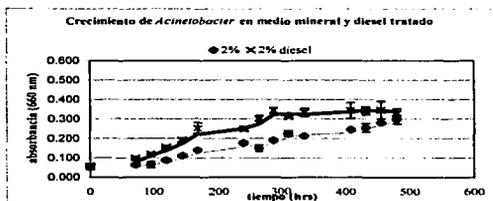
Figura J. Crecimiento de *P. aeruginosa* se ve mejorado con adición periódica de H_2O_2



La mezcla reconstituida, figura I, también crece mejor añadiendo H_2O_2 llegando a ser esta curva muy similar a la de *P. aeruginosa* en las mismas condiciones.

La adición periódica de peróxido favoreció en todos los casos el crecimiento bacteriano, pudiéndose especular que este compuesto pudiera funcionar eficazmente a través de la existencia de un aceptor de electrones necesario para la biorremediación, no descartándose que con la adición continua estuviera oxidando el diesel continuamente para su fácil degradación.

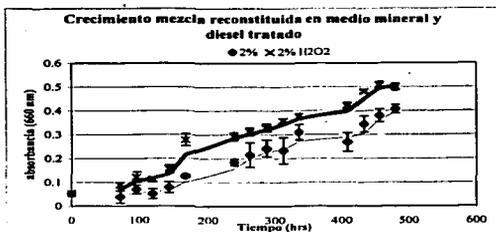
Figura K. Efecto en el crecimiento de *Acinetobacter* de la adición periódica de peróxido de hidrógeno.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Resultados y Discusión

Figura 1. La mezcla reconstituida se creció con diesel tratado con y sin la adición periódica de H_2O_2 . La reconstrucción de muestra se describe en material y método.



Obtención del ADN plasmídico.

Los plásmidos se consideran elementos genómicos que codifican información que confiere a las bacterias características que las hacen más competentes que otro tipo de bacterias en determinados medios. En este caso, no se pudo comprobar de manera definitiva la presencia de plásmido en ninguna de las cepas bacterianas aunque esto debe de ser corroborado posteriormente.

La figura m muestra un gel de agarosa al 1% donde se observa en todas las muestra material genómico con pesos moleculares aproximadamente de 22.1 kb, 1.90 kb y 1.43 kb, comparados con el ADN del fago λ utilizado como marcador de ADN lambda cortado con Eco RI y Hind III. En el extremo derecho se colocó el mismo material genético pero cortado con la enzima de restricción Eco RI según el método descrito en el capítulo anterior

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Resultados y Discusión

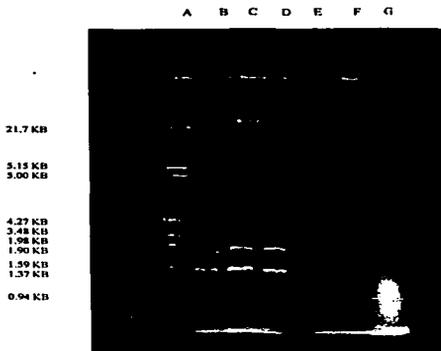


Figura 10. Gel de agarosa para electroforesis de ADN genómico de los 3 microorganismos; Carril B, *P. fluorescens*; carril C, *P. aeruginosa*; Carril D, *Acinetobacter*. Carriles E, F y G, las mismas que B, C y D pero restringidas con Eco RI. Línea A, marcador de peso molecular.

Como se observa claramente, el material genético es totalmente cortado cuando se expone a la enzima de restricción sin que aparezcan bandas discretas de menor peso molecular. Un plásmido debido a su tamaño tiene un número reducido de sitios de corte por lo que las bandas deben de verse claramente en el gel, como en este caso no se nota ninguna banda clara después del tratamiento de restricción, esto sugiere que las enzimas responsables de la degradación de los hidrocarburos se encuentran codificadas no en material plasmídico sino en cromosómico.

Varios autores han demostrado que los plásmidos proporcionan a varias especies de bacterias la habilidad de catabolizar varios hidrocarburos y otros compuestos orgánicos (Furukawa, K. y Chakrabarty, A. 1982; Burlage S., *et al.*, 1989), pero también se ha reportado que hay enzimas encargadas de la degradación codificadas en ADN cromosomal (Hamann, C., *et al.*, 1999; Wang, R., *et al.*, 2000).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Resultados y Discusión

Análisis de proteínas.

La figura n muestra el patrón electroforético de proteínas de las diferentes bacterias encontradas en la muestra de agua observando una notoria banda de aproximadamente 29 kD en los 3 casos comparada con el marcador del peso molecular colocado en los carriles A y E. Los carriles subsiguientes muestran el patrón de cada una de las bacterias en un medio donde la fuente de carbono no era un hidrocarburo (peptona 5%); B para *Acinetobacter*, C para *P. aeruginosa* y D para *P. fluorescens*. En los carriles F, G y H se muestra el mismo orden de las bacterias pero el patrón corresponde a las proteínas expresadas en medio con diesel como fuente de carbono. *P. aeruginosa* fue la que expresó más claramente la proteína de 29k D identificada como calretinin, que en la bibliografía se ha identificado en varias mezclas de bacterias degradadoras de hidrocarburos y esta asentada en bancos genéticos como en: www.infobiogen.fr/db/index-gcg/genbank/gb_sg_000.ref, lo que podría estar relacionado con su mejor adaptabilidad al medio con hidrocarburo.

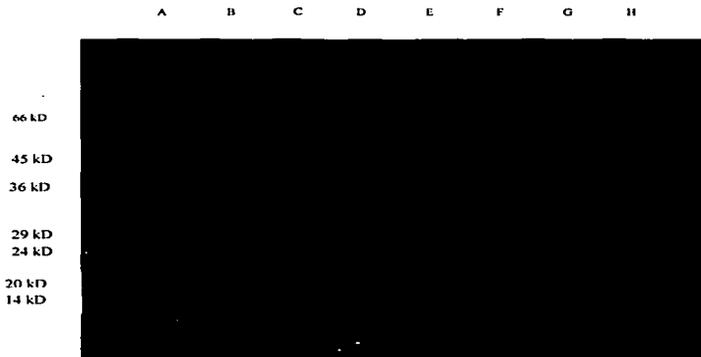


Figura n. Gel de poliacrilamida. Carril B, *Acinetobacter*, carril C, *P. aeruginosa*; carril D, *P. fluorescens*; carril F, G y H, los mismos microorganismos respectivamente pero en medios con diesel mientras que los 3 primeros corresponden a microorganismos crecidos en medio peptonado. Líneas A y E marcadores de peso molecular.

Conclusiones

El mejoramiento ecológico presentado en el km 84 de la carretera México Hidalgo reportado antes de la toma de muestra, pudo ser, en parte, por la acción de las bacterias sobre el diesel derramado. No hay que olvidar que factores naturales como la dilución, absorción, dispersión y volatilidad pudieran también ser parte de la mitigación en el daño causado a esta zona.

Las bacterias aisladas en este estudio corresponden a bacilos Gram negativos (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter*).

P. aeruginosa mostró un mejor aprovechamiento del diesel.

Estos microorganismos no presentan una actividad sinérgica en su acción metabólica sobre el diesel como fuente de carbono.

Los resultados obtenidos en este trabajo no arrojan la suficiente evidencia para afirmar que las proteínas necesarias para la degradación del diesel se encuentren codificadas en plásmidos, como esta reportado en innumerables fuentes bibliográficas.

En este estudio todas las cepas expresaron en medio con diesel una proteína a 29 kD de masa, que podría estar involucrada en el aprovechamiento del diesel, y presuntivamente podemos declarar que la cantidad expresada de esta proteína pudiera ser determinante para la degradación del diesel.

El uso de Peroxido de hidrógeno en el proceso de biorremediación, mejora considerablemente la acción microbiana sobre los sustratos.

- **Medio mineral 1**

Macronutrientes:

NH ₄ SO ₄	2 g/l
K ₂ HPO ₄	0.039g/l
MgSO ₄	0.075 g/l
NaCO ₃	0.02 g/l
EDTA	0.01g/l
citrato de sodio	0.06 g/l
FeSO ₄	0.03 g/l

Micronutrientes:

H ₃ BO ₃	2.8 mg/l
MnSO ₄	0.181 mg/l
ZnSO ₄	0.222 mg/l
NaMoO ₄	0.19 mg/l
CuSO ₄	0.079 mg/l
Co(NO ₃) ₂	0.049 mg/l

- **Medio mineral 2**

Macronutrientes:

NH ₄ SO ₄	2 g/l
K ₂ HPO ₄	0.039g/l
MgSO ₄	0.075 g/l
NaCO ₃	0.02 g/l
EDTA	0.001g/l
citrato de sodio	0.006 g/l
FeSO ₄	0.006 g/l

Micronutrientes:

H ₃ BO ₃	0.028 mg/l
MnSO ₄	0.0018mg/l
ZnSO ₄	0.0022 mg/l
NaMoO ₄	0.0019 mg/l
CuSO ₄	0.0079mg/l
Co(NO ₃) ₂	0.0049 mg/l

- **Medio Peptonado**

Peptona	5 g
Medio mineral	1000 ml

- **Medio-L**

Caseina	10 g
NaCl	10 g
Extracto de levadura	5 g
Agua destilada	1000 ml

- **Buffer E**

Tris-acetato	40 mM
EDTA	2mM

- **Solución de lisis**

SDS	3 %
Tris	50 mM

La solución es ajustada a pH 12.6 por la adición de 1.6 ml de NaOH 2N, el volumen es ajustado a 100ml con agua destilada, y finalmente se filtra con un filtro de membrana (0.2 μ m de tamaño de poro).

- **Fenol estandarizado**

A una solución hidratada de fenol se le agrega un volumen igual de solución de Tris 1M y se agita enérgicamente y se guarda a 4°C, cuando las fases estén separadas, al fenol se le mide el pH hasta que esté en 8; si es necesario, repetir la operación. Cuando el pH sea el adecuado se guarda a 4°C con Tris 0.1M.

- **Solución Fenol-cloroformo 1:1**

Fenol	50 ml
Cloroformo	50 ml

- **Buffer TE**

Tris-HCl	0.010 M a un pH de 7.5
EDTA	0.001 M

- **Buffer Tris boratos IX**

Tris base pH 8.0	54.0 g
Ácido bórico	27.5 g
EDTA	3.72 g
Agua destilada a	1000 ml

- **Buffer de carga para DNA (10X)**

Sacarosa	37%
EDTA	50 mM
Azul de bromocresol	0.1%
SDS	0.1%

- **Reactivo de Bradford**

Azul de coomassie	100 mg (G-250)
Etanol 95%	50 ml
Ácido fosfórico 85%	100 ml
Agua destilada a	1000 ml

- **Gel separador 12.5%**

Sol stock bis-acrilamida (30: 0.8)	16.60 ml
Buffer Tris-HCl pH 8.3, 3M (8X)	5.0 ml
SDS 10%	320 µl
Agua destilada	18.02 ml
Persulfato de amonio (10%)	300 µl
TEMED	20 µl

- **Gel concentrador 6.0 %**

Sol stock bis-acrilamida (30:0.8)	2 ml
Buffer Tris-HCl pH 6.8, 0.5 M (4X)	2.5 ml
SDS 10%	100 µl
Agua destilada	50.4 ml
Persulfato de amonio (10%)	150 µl
TEMED	125 µl

- **Solución stock acrilamida (30:0.08)**

Acrilamida	58.4 g
Bisacrilamida	1.6 g

- **Buffer muestra**

Tris-HCl pH 6.8	0.125 M
SDS	4%
Glicerol	20%
Ajustar a un volumen final de 10 mL. almacenar en ependorf a -20°C	

- **Solución teñidora**

Azul de coomassie	1.25 g
Metanol	500 ml
Ácido acético glacial	100 ml
Agua destilada a	1000 ml
Filtrar con filtros Whatman # 1	

- ***Solución de electrodos***

Metanol	1 l
Ácido acético	0.7 l
Agua destilada a	10 l

- ***Buffer de electrodos (5X)***

Tris base	9 g
Glicerina	43.2 ml
SDS	3 g
Agua destilada a	600 ml

- ***Buffer de carga para proteínas (10 X)***

Tris-HCl	0.125 M
SDS	4%
Glicerol	20%
β -mercaptoetanol	10%
Azul de bromo-fenol	2 mg/ml

• **Tablas de resultados.**

Tabla 7. Variables para la determinación celular a 600nm

Condiciones	tiempo de centrifugado	de número de lavados	Negativo	Positivo
A			3 min	4min
B			2	3
C	limpiado		sin limpiar	limpiando

Tabla 8. Resultados obtenidos del blanco (agua destilada)

A	B	C	k1 (abs a 600nm)	k2 (abs a 600nm)	promedio
1	-	-	0.000	0.000	0.000
2	+	-	0.000	0.000	0.000
3	-	+	0.000	0.000	0.000
4	+	+	0.000	0.000	0.000
5	-	-	0.000	0.000	0.000
6	+	-	0.000	0.000	0.000
7	-	+	0.000	0.000	0.000
8	+	+	0.000	0.000	0.000

Tabla 9. Resultados del problema (medio mineral mas 1% de diesel)

A	B	C	k1(abs a 600nm)	k2 (abs a 600nm)	promedio
1	-	-	0.030	0.030	0.030
2	+	-	0.007	0.072	0.039
3	-	+	0.035	0.022	0.028
4	+	+	0.019	0.007	0.013
5	-	-	0.025	0.015	0.020
6	+	-	0.043	0.064	0.053
7	-	+	0.007	0.027	0.034
8	+	+	0.013	0.004	0.008

Tabla 12. Crecimiento de *P. fluorescens* a 2 % de diesel tratado (absorbancia a 660 nm).

tiempo (hrs)	k1	k2	k3	prom	desv
0	0.050	0.053	0.054	0.052	0.0021
72	0.041	0.047	0.052	0.047	0.0055
96	0.065	0.050	0.073	0.063	0.0117
120	0.252	0.187	0.198	0.212	0.0348
144	0.203	0.210	0.214	0.209	0.0058
168	0.210	0.198	0.196	0.201	0.0076
240	0.275	0.234	0.243	0.251	0.0215
264	0.226	0.210	0.235	0.224	0.0127
288	0.174	0.188	0.187	0.180	0.0136
312	0.154	0.154	0.176	0.161	0.0127
336	0.282	0.230	0.265	0.259	0.0265
408	0.255	0.234	0.245	0.245	0.0105
432	0.205	0.204	0.234	0.214	0.0170
456	0.310	0.298	0.265	0.291	0.0233
480	0.270	0.265	0.256	0.264	0.0071

Tabla 13. Crecimiento de *P. fluorescens* con diesel sin tratar (absorbancia a 660 nm).

tiempo (hrs)	k1	k2	k3	promedio	desviación
0.0	0.047	0.041	0.056	0.048	0.0075
16.5	0.034	0.040	0.078	0.051	0.0239
41.8	0.052	0.047	0.065	0.055	0.0093
67.5	0.043	0.050	0.052	0.048	0.0047
158.5	0.054	0.058	0.063	0.058	0.0045
179.5	0.033	0.076	0.067	0.059	0.0227
199.5	0.017	0.016	0.023	0.019	0.0038
223.3	0.125	0.241	0.134	0.167	0.0645
246.3	0.098	0.112	0.100	0.103	0.0076
316.3	0.094	0.081	0.099	0.091	0.0093
368.1	0.093	0.166	0.178	0.146	0.0460
411.6	0.079	0.152	0.132	0.121	0.0377
535.6	0.144	0.142	0.120	0.135	0.0133
556.4	0.118	0.124	0.100	0.114	0.0125
583.1	0.100	0.258	0.133	0.164	0.0833

Tabla 14. Crecimiento de *P. fluorescens* a 1.5 % de diesel tratado (absorbancia a 660 nm)

tiempo (hrs)	k1	k2	k3	promedio	desviación
0	0.055	0.060	0.057	0.057	0.0025
72	0.067	0.065	0.089	0.067	0.0020
96	0.116	0.112	0.123	0.117	0.0056
120	0.132	0.105	0.106	0.114	0.0153
144	0.130	0.134	0.145	0.136	0.0078
168	0.158	0.160	0.173	0.164	0.0081
240	0.145	0.156	0.165	0.155	0.0100
264	0.176	0.167	0.178	0.174	0.0059
288	0.178	0.154	0.134	0.155	0.0220
312	0.186	0.165	0.178	0.176	0.0108
336	0.210	0.198	0.178	0.195	0.0162
408	0.189	0.199	0.196	0.195	0.0051
432	0.205	0.234	0.243	0.227	0.0199
456	0.254	0.245	0.234	0.244	0.0100
480	0.265	0.245	0.274	0.261	0.0148

Tabla 15. Crecimiento de *P. fluorescens* a 1 % de diesel tratado (absorbancia a 660 nm)

tiempo (hrs)	k1	k2	k3	promedio	desviación
0	0.05	0.054	0.047	0.050	0.0035
72	0.057	0.054	0.045	0.052	0.0062
96	0.054	0.048	0.056	0.053	0.0042
120	0.065	0.054	0.069	0.063	0.0078
144	0.085	0.065	0.076	0.075	0.0100
168	0.085	0.078	0.098	0.087	0.0101
240	0.112	0.076	0.115	0.101	0.0217
264	0.116	0.134	0.121	0.124	0.0093
288	0.143	0.124	0.133	0.133	0.0095
312	0.187	0.178	0.177	0.181	0.0055
336	0.18	0.176	0.179	0.178	0.0021
408	0.154	0.164	0.178	0.165	0.0121
432	0.199	0.203	0.243	0.215	0.0243
456	0.245	0.234	0.256	0.245	0.0110
480	0.256	0.278	0.285	0.272	0.0148

Tabla 16. Crecimiento de *P. fluorescens* con la adición periódica de H_2O_2 (absorbancia a 660 nm).

tiempo (hrs)	k1	k2	k3	Promedio	desviación
0	0.043	0.054	0.050	0.049	0.0056
72	0.033	0.065	0.054	0.051	0.0163
96	0.054	0.066	0.065	0.058	0.0059
120	0.076	0.067	0.069	0.071	0.0047
144	0.276	0.259	0.284	0.273	0.0128
168	0.411	0.278	0.289	0.326	0.0738
240	0.200	0.234	0.242	0.225	0.0223
264	0.322	0.298	0.284	0.301	0.0192
288	0.173	0.310	0.287	0.257	0.0734
312	0.233	0.289	0.291	0.271	0.0329
336	0.282	0.298	0.301	0.294	0.0102
408	0.481	0.314	0.342	0.379	0.0894
432	0.271	0.311	0.318	0.300	0.0254
456	0.238	0.245	0.325	0.269	0.0483
480	0.199	0.278	0.286	0.254	0.0481

Tabla 17. Crecimiento de *P. aeruginosa* con 2 % de diesel tratado (absorbancia a 660 nm)

tiempo (hrs)	k1	k2	k3	promedio	desviación
0	0.05	0.043	0.057	0.050	0.0070
72	0.096	0.076	0.087	0.086	0.0100
96	0.086	0.091	0.076	0.084	0.0076
120	0.054	0.089	0.097	0.080	0.0229
144	0.18	0.156	0.145	0.160	0.0179
168	0.366	0.352	0.367	0.362	0.0084
240	0.478	0.465	0.398	0.447	0.0429
288	0.341	0.342	0.418	0.367	0.0442
312	0.272	0.334	0.376	0.327	0.0523
336	0.29	0.456	0.486	0.411	0.1056
384	0.386	0.487	0.491	0.455	0.0595
408	0.478	0.456	0.497	0.477	0.0205
432	0.434	0.421	0.435	0.430	0.0078
456	0.303	0.373	0.356	0.344	0.0365
480	0.483	0.471	0.457	0.474	0.0083

Tabla 18. Crecimiento de *P. aeruginosa* con 2 % de diesel sin tratar (absorbancia a 660 nm)

tiempo (hrs)	k1	k2	k3	promedio	desviación
0	0.051	0.049	0.058	0.053	0.0047
19.75	0.036	0.049	0.057	0.047	0.0106
44.75	0.051	0.167	0.073	0.097	0.0616
64	0.032	0.09	0.034	0.052	0.0329
99.5	0.088	0.092	0.095	0.092	0.0035
119.75	0.100	0.092	0.046	0.079	0.0291
150.5	0.111	0.198	0.052	0.120	0.0734
171	0.269	0.172	0.194	0.212	0.0509
197.75	0.044	0.067	0.084	0.065	0.0201
267	0.078	0.161	0.077	0.105	0.0482
314.5	0.088	0.1	0.168	0.119	0.0431
354.25	0.114	0.144	0.186	0.148	0.0362
445.75	0.062	0.067	0.109	0.079	0.0258
473.25	0.133	0.116	0.097	0.115	0.0180
566.25	0.153	0.243	0.16	0.185	0.0501
634.5	0.091	0.075	0.156	0.107	0.0429

Tabla 19. Crecimiento de *P. aeruginosa* con 1.5% de diesel tratado (absorbancia a 660 nm)

tiempo (hrs)	k1	k2	k3	promedio	desviación
0	0.042	0.047	0.051	0.047	0.0045
72	0.076	0.087	0.071	0.078	0.0082
96	0.094	0.053	0.078	0.075	0.0207
120	0.123	0.134	0.142	0.133	0.0095
144	0.299	0.311	0.297	0.302	0.0076
168	0.401	0.407	0.378	0.395	0.0153
240	0.398	0.378	0.406	0.394	0.0144
288	0.456	0.423	0.436	0.438	0.0166
312	0.458	0.465	0.453	0.459	0.0060
336	0.514	0.475	0.522	0.504	0.0251
384	0.491	0.489	0.467	0.482	0.0133
408	0.476	0.438	0.492	0.469	0.0277
432	0.353	0.397	0.402	0.384	0.0270
456	0.412	0.433	0.457	0.434	0.0225
480	0.561	0.432	0.494	0.496	0.0645

Tabla 20. Crecimiento de *P. aeruginosa* con 1% de diesel tratado (absorbancia a 660 nm)

tiempo (hrs)	k1	k2	k3	promedio	desviación
0	0.045	0.061	0.052	0.053	0.0080
72	0.067	0.065	0.053	0.062	0.0076
96	0.063	0.054	0.045	0.054	0.0090
120	0.074	0.052	0.061	0.062	0.0111
144	0.093	0.084	0.087	0.088	0.0046
168	0.103	0.097	0.083	0.094	0.0103
240	0.104	0.132	0.118	0.118	0.0140
288	0.287	0.276	0.194	0.252	0.0508
312	0.231	0.194	0.237	0.221	0.0233
336	0.245	0.256	0.261	0.261	0.0184
384	0.376	0.289	0.277	0.314	0.0540
408	0.301	0.243	0.245	0.263	0.0329
432	0.365	0.344	0.394	0.368	0.0251
456	0.342	0.367	0.328	0.346	0.0198
480	0.335	0.317	0.341	0.331	0.0125

Tabla 21. Crecimiento de *P. aeruginosa* con la adición periódica de H_2O_2 (absorbancia a 660 nm)

tiempo (hrs)	k1	k2	k3	promedio	desviación
0	0.053	0.058	0.041	0.051	0.0087
72	0.191	0.167	0.134	0.164	0.0286
96	0.125	0.163	0.178	0.155	0.0273
120	0.169	0.173	0.182	0.175	0.0067
144	0.221	0.256	0.243	0.240	0.0177
168	0.276	0.217	0.242	0.245	0.0296
240	0.537	0.367	0.362	0.422	0.0996
288	0.418	0.324	0.351	0.364	0.0484
312	0.448	0.525	0.556	0.510	0.0556
336	0.455	0.543	0.532	0.510	0.0479
384	0.715	0.507	0.582	0.601	0.1053
408	0.243	0.423	0.398	0.355	0.0975
432	0.515	0.564	0.577	0.552	0.0327
456	0.541	0.587	0.523	0.550	0.0330
480	0.356	0.467	0.483	0.435	0.0692

Tabla 22. Crecimiento de *Acinetobacter* con 2 % de diesel tratado (absorbancia a 660 nm)

Tiempo (hrs)	k1	k2	k3	promedio	desviación
0	0.050	0.041	0.063	0.051	0.0111
72	0.062	0.073	0.057	0.064	0.0082
96	0.063	0.081	0.051	0.065	0.0151
120	0.081	0.093	0.087	0.087	0.0060
144	0.117	0.105	0.108	0.110	0.0062
168	0.134	0.142	0.137	0.138	0.0040
240	0.171	0.184	0.174	0.176	0.0068
264	0.163	0.154	-0.132	0.150	0.0159
288	0.184	0.197	0.190	0.190	0.0065
312	0.217	0.220	0.243	0.227	0.0142
336	0.208	0.213	0.215	0.212	0.0036
408	0.241	0.250	0.248	0.246	0.0047
432	0.263	0.231	0.272	0.255	0.0215
456	0.274	0.283	0.284	0.280	0.0055
480	0.300	0.317	0.273	0.297	0.0222

Tabla 23. Crecimiento de Acinetobacter con 2% de diesel sin tratar (absorbancia a 660 nm)

tiempo (hrs)	k1	k2	k3	promedio	desviación
0	0.052	0.054	0.043	0.050	0.0059
19.75	0.020	0.045	0.034	0.033	0.0125
44.75	0.033	0.034	0.045	0.037	0.0067
64	0.075	0.056	0.076	0.069	0.0113
99.5	0.155	0.076	0.123	0.118	0.0397
119.75	0.070	0.143	0.076	0.096	0.0405
150.5	0.176	0.098	0.034	0.103	0.0711
171	0.123	0.076	0.134	0.111	0.0308
197.75	0.134	0.123	0.123	0.127	0.0064
267	0.142	0.089	0.243	0.158	0.0782
314.5	0.122	0.100	0.176	0.133	0.0391
354.25	0.145	0.132	0.184	0.154	0.0271
445.75	0.165	0.104	0.156	0.142	0.0329
473.25	0.147	0.158	0.145	0.150	0.0070
566.25	0.157	0.167	0.134	0.153	0.0169
634.5	0.156	0.154	0.187	0.166	0.0185

Tabla 24. Crecimiento de Acinetobacter con 1.5% de diesel tratado (absorbancia a 660 nm)

Tiempo (hrs)	k1	k2	k3	promedio	desviación
0	0.050	0.047	0.041	0.046	0.0046
72	0.071	0.068	0.063	0.067	0.0040
96	0.084	0.081	0.093	0.086	0.0062
120	0.124	0.120	0.131	0.125	0.0056
144	0.150	0.163	0.161	0.158	0.0070
168	0.174	0.181	0.191	0.182	0.0085
240	0.193	0.195	0.178	0.189	0.0093
264	0.209	0.215	0.211	0.212	0.0031
288	0.197	0.230	0.207	0.211	0.0169
312	0.270	0.291	0.287	0.283	0.0112
336	0.310	0.315	0.307	0.311	0.0040
408	0.320	0.317	0.318	0.318	0.0015
432	0.360	0.364	0.348	0.357	0.0083
456	0.350	0.348	0.351	0.350	0.0015
480	0.363	0.351	0.349	0.354	0.0076

Tabla 25. Crecimiento de Acinetobacter con 1 % de diesel tratado (absorbancia a 660 nm)

Tiempo (hrs)	k1	k2	k3	promedio	desviación
0	0.041	0.050	0.057	0.049	0.0080
72	0.050	0.040	0.053	0.048	0.0068
96	0.061	0.058	0.048	0.056	0.0068
120	0.071	0.050	0.073	0.065	0.0127
144	0.043	0.049	0.047	0.046	0.0031
168	0.075	0.063	0.081	0.073	0.0092
240	0.099	0.107	0.104	0.103	0.0040
264	0.120	0.117	0.119	0.119	0.0015
288	0.143	0.145	0.151	0.146	0.0042
312	0.179	0.181	0.193	0.184	0.0076
336	0.191	0.194	0.190	0.192	0.0021
408	0.197	0.204	0.210	0.204	0.0055
432	0.211	0.217	0.220	0.216	0.0046
456	0.243	0.217	0.231	0.230	0.0130
480	0.250	0.278	0.280	0.269	0.0168

Tabla 26. Crecimiento de Acinetobacter con la adición periódica de H₂O₂ (absorbancia a 660 nm)

Tiempo (hrs)	k1	k2	k3	promedio	desviación
0	0.060	0.051	0.067	0.059	0.0080
72	0.094	0.098	0.105	0.099	0.0056
96	0.117	0.120	0.121	0.119	0.0021
120	0.151	0.161	0.157	0.156	0.0050
144	0.190	0.183	0.201	0.191	0.0091
168	0.230	0.241	0.284	0.252	0.0285
240	0.240	0.260	0.247	0.249	0.0101
264	0.301	0.317	0.288	0.302	0.0145
288	0.340	0.357	0.332	0.343	0.0128
312	0.310	0.320	0.311	0.314	0.0055
336	0.350	0.310	0.341	0.334	0.0210
408	0.380	0.350	0.301	0.344	0.0399
432	0.341	0.363	0.322	0.342	0.0205
456	0.294	0.381	0.361	0.345	0.0456
480	0.301	0.347	0.337	0.328	0.0242

Tabla 27. Crecimiento de la mezcla reconstituida con 2 % de diesel tratado (absorbancia a 660 nm)

Tiempo (hrs)	k1	k2	k3	promedio	desviación
0	0.053	0.048	0.058	0.053	0.0050
72	0.043	0.062	0.011	0.039	0.0258
96	0.084	0.076	0.049	0.070	0.0183
120	0.044	0.074	0.035	0.051	0.0204
144	0.087	0.096	0.052	0.078	0.0232
168	0.133	0.121	0.124	0.126	0.0062
240	0.184	0.172	0.196	0.184	0.0120
264	0.233	0.254	0.157	0.215	0.0510
288	0.264	0.262	0.202	0.243	0.0352
312	0.253	0.276	0.171	0.233	0.0552
336	0.263	0.301	0.346	0.310	0.0324
408	0.224	0.293	0.289	0.269	0.0387
432	0.310	0.345	0.378	0.344	0.0340
456	0.350	0.389	0.401	0.380	0.0267
480	0.389	0.410	0.423	0.407	0.0172

Tabla 28. Crecimiento de la mezcla reconstituida con 2% de diesel sin tratar (absorbancia a 660 nm)

tiempo (hrs)	k1	k2	k3	promedio	desviación
0	0.065	0.05	0.043	0.053	0.0112
72	0.010	0.06	0.061	0.044	0.0292
96	0.013	0.021	0.039	0.024	0.0133
111	0.069	0.035	0.093	0.066	0.0291
142	0.024	0.037	0.146	0.069	0.0670
161	0.056	0.042	0.136	0.078	0.0507
215	0.042	0.059	0.077	0.059	0.0175
239	0.059	0.016	0.037	0.037	0.0215
287	0.053	0.021	0.043	0.039	0.0164
305.5	0.056	0.053	0.022	0.044	0.0198
382.9	0.112	0.024	0.032	0.056	0.0487
404.9	0.189	0.028	0.252	0.156	0.1155

Tabla 29. Crecimiento de la mezcla reconstituida con 1.5% de diesel tratado (absorbancia a 660 nm)

Tiempo (hrs)	k1	k2	k3	promedio	desviación
0	0.023	0.047	0.043	0.038	0.0129
72	0.054	0.058	0.018	0.043	0.0214
96	0.084	0.071	0.076	0.077	0.0066
120	0.147	0.079	0.056	0.094	0.0473
144	0.184	0.131	0.080	0.132	0.0520
168	0.243	0.173	0.111	0.176	0.0660
240	0.212	0.222	0.182	0.205	0.0208
264	0.200	0.233	0.229	0.221	0.0180
288	0.277	0.184	0.208	0.222	0.0486
312	0.250	0.243	0.180	0.224	0.0386
336	0.183	0.181	0.247	0.204	0.0375
408	0.298	0.121	0.287	0.235	0.0992
432	0.345	0.331	0.367	0.348	0.0181
456	0.389	0.376	0.378	0.381	0.0070
480	0.425	0.419	0.420	0.421	0.0032

Tabla 30. Crecimiento de la mezcla reconstituida con 1% de diesel tratado (absorbancia a 660nm)

tiempo (hrs)	k1	k2	k3	promedio	desviación
0	0.053	0.048	0.052	0.051	0.0026
72	0.010	0.050	0.063	0.041	0.0278
96	0.049	0.071	0.078	0.066	0.0151
120	0.029	0.064	0.052	0.048	0.0178
144	0.052	0.094	0.089	0.078	0.0229
168	0.119	0.110	0.104	0.111	0.0075
240	0.236	0.119	0.124	0.160	0.0662
264	0.213	0.132	0.144	0.163	0.0437
288	0.247	0.116	0.124	0.162	0.0734
312	0.271	0.162	0.161	0.198	0.0632
336	0.295	0.174	0.181	0.217	0.0679
408	0.221	0.214	0.240	0.225	0.0135
432	0.214	0.217	0.221	0.217	0.0035
456	0.264	0.241	0.253	0.253	0.0115
480	0.293	0.274	0.281	0.283	0.0098

Tabla 31. Crecimiento de la mezcla reconstituida con la adición periódica de H_2O_2 (absorbancia a 660 nm)

tiempo (hrs)	k1	k2	k3	promedio	desviación
0	0.063	0.051	0.048	0.054	0.0079
72	0.089	0.097	0.079	0.088	0.0090
96	0.143	0.120	0.101	0.121	0.0210
120	0.107	0.122	0.107	0.112	0.0087
144	0.167	0.137	0.163	0.156	0.0163
168	0.289	0.297	0.250	0.279	0.0251
240	0.310	0.289	0.278	0.292	0.0163
264	0.301	0.329	0.310	0.313	0.0143
288	0.317	0.347	0.324	0.329	0.0157
312	0.348	0.365	0.360	0.358	0.0087
336	0.368	0.389	0.370	0.376	0.0116
408	0.420	0.434	0.410	0.421	0.0121
432	0.489	0.478	0.478	0.482	0.0064
456	0.501	0.523	0.498	0.507	0.0137
480	0.487	0.500	0.513	0.500	0.0130

Tabla 32. Curva control de *P. fluorescens* con medio peptonado.

Tiempo (hrs)	k1
0	0.053
1.5	0.081
2.5	0.150
3.66	0.217
5.16	0.340
6.49	0.560
7.99	0.758
8.99	0.883
9.99	0.899
10.65	0.920

Tabla 33. Curva control de *P. aeruginosa* en medio peptonado

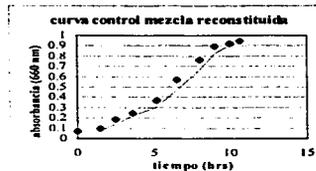
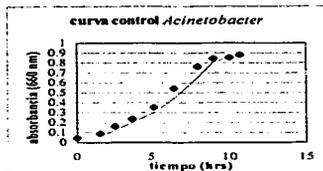
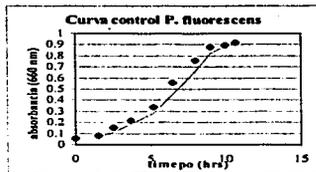
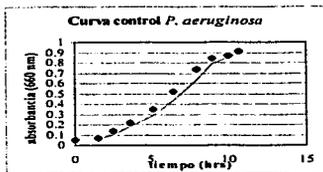
Tiempo (hrs)	k1
0	0.050
1.5	0.073
2.5	0.143
3.66	0.219
5.16	0.350
6.49	0.522
7.99	0.741
8.99	0.840
9.99	0.873
10.65	0.910

Tabla 34. Curva control de *Acinetobacter* en medio peptonado.

Tiempo (hrs)	k1
0	0.041
1.5	0.093
2.5	0.164
3.66	0.240
5.16	0.358
6.49	0.541
7.99	0.761
8.99	0.850
9.99	0.857
10.65	0.881

Tabla 35. Curva control de la mezcla reconstituida en medio peptonado

tiempo (hrs)	k1
0	0.068
1.5	0.094
2.5	0.181
3.66	0.250
5.16	0.371
6.49	0.570
7.99	0.764
8.99	0.891
9.99	0.920
10.65	0.944



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

- Adriaens, P., Hickey, W.J. (1993) En *Biotechnology for the treatment of hazardous waste*. 97-120. Lexis Publishers, Ann Arbor.
- Al-hadhrami, M.N., Lappin-Scott, H.M. Fisher, P.J. (1997) Studies on the biodegradation of three groups of pure n-alkanes in the presence of molasses and mineral fertilizer by *Pseudomonas aeruginosa*. *Marine Pollution Bulletin*. **34**, 969-974.
- Amor, L., Kennes, C., Beiga, M.C. (2001) Kinetics of inhibition in the biodegradation of monoaromatic hydrocarbons in presence of heavy metals. *Bioresource technology*. **78**, 181-185.
- Bachoon, D. S., Hodson, R.E., Araujo, R. (2001) Microbial community assessment in oil-impacted salt marsh sediment microcosms by traditional and nucleic acid-bases indices. *Journal of Microbiological Methods*. **46**, 37-49.
- Bailey, N.J.L., Jobson, A.M., Rogers, M.A. (1973) Bacterial degradation of crude oil: Comparison of field and experimental data. *Chemical Geology*. **11**, 203-221.
- Baker, K.H., Herson, D.S. (1990) In situ bioremediation of contaminated aquifers and subsurface soils. *Geomicrobiology Journal*. **8**, 133-146.
- Balba, M.T., Al-Awadhi, N., Al-Daher, R. (1998) Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment an field evaluation. *Journal of Microbiology Methods*. **32**, 155-164.
- Baldi, F., Ivosevic, N., Minaui, A., Pepi, M., Fani, R., Svetlicii, V., Zutti, V., (1999) Adhesion of *Acinetobacter venetians* to diesel fuel droplets studied with in situ electrochemical an molecular probes. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**, 2041-2048.
- Barathi, S., Vasudevan, N. (2001) Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated form petroleum-contaminated soil. *Environment International*. **26**, 413-416.
- Baud-Grasset, F., Vogel, T.M. (1995) Bioaugmentation: Biotreatment of contaminated soil by adding adapted bacteria. En *Bioaugmentation for site remediation*, Ed. R.R. Hinchee, J. Fredrickso. Columbus, Ohio.
- Berekaa, M., Steinbücher, A. (2000) Microbial Degradation of the multiply branched alkane 2,6,10,15,19,23. Hexamethyltetracosane (squalane) by *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium ratisbonense*. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**, 4462-4467.
- Bingle, L.E.H., Thomas, C. T., (2001) Regulatory circuits for plasmid survival. *Current Opinion in Microbiology*. **4**, 194-200.
- Bong, H., Chang, Y., Coi, S., Park, Y. (2000) Degradation of dibenzofuran by *Pseudomonas putida* PH-01. *Water Resources*. **34**, 2404-2407.
- Boopathy, R. (2000) Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Tech*. **74**, 63-67.
- Bragg, J.R., Prince R.C., Hamer, E.J., Atlas, R.M. (1994). Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill. *Nature*, **368**: 413-418.

Referencias

- Burlage, S., Hooper, S.W., Saylor, G.S. (1989) The TOL (pWWO) plasmid. *Applied and Environmental Microbiology*, **55**, 1323-1328.
- Casse, F., Boucher, C., Julliot, J.S., Michel, M., Denarie, J. (1979) Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. *Journal of General Microbiology*, **113**, 229-242.
- Cerniglia, C.E. (1992) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, **3**, 351-368.
- Chakrabarty, A.M. (1976) Plasmids in *Pseudomonas*. *Annual Review Genetics*, **10**, 7-30.
- Chakrabarty, A.M. (1980) Plasmid and dissimilation of synthetic environmental pollutants. 21-30. En C. Stutter y K.R. Rozee (ed). Plasmids and transposons; environmental effects and maintenance mechanisms, Academic Press, Inc., Nueva York.
- Chakravarty, A.M., Chou, G., Gunsalus, I.C. (1973). Genetic regulation of octane dissimilation plasmid in *Pseudomonas*. *Proceedings of the National Academic of Science*, **70**, 1137-1140.
- Chapelle, F.H. (1999) Bioremediation of petroleum Hydrocarbon-contaminated ground water: The perspectives of history and hydrology. **27**, 122-132.
- Cho, M.C., Kang, D.O., Yoon, B.D., Lee, K. (2000) toluene degradation pathway from *Pseudomonas Putida* F1: substrate specificity and gene induction by 1-substituted benzenes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **25**, 163-170.
- Choi, D., Hori, K., Tanji, Y., Unno, H. (1999) Microbial degradation kinetics of solid alkane dissolved in nondegradable oil phase. *Biochemical Engineering Journal*, **3**, 71-78.
- Cochran, W.L., McFeeters, G.A., Stewart, P.S. (2000) Reduced susceptibility of thin *Pseudomona aeruginosa* biofilms to hydrogen peroxide and monochloramine. *Journal of Applied Microbiology*, **88**, 22-33
- Colcomb, K., Bedborough, D., Shimwell, S., Lunel, T., Lee, K., Swannell, R., Wood, P., Bailey, N., Halliwell, C., Davies, L., et al., (1997) Shoreline clean-up and waste disposal issues during the Sea Empress incident. In Proceedings of the 1997 International Oil Spill Conference. Washington DC: *American Petroleum Institute*; 195-203
- Colores, G.M., Macur, R.E., Ward, D.M., Inskip, W.P. (2000) Molecular analysis of surfactant-driven microbial population shifts in hydrocarbon-contaminates soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 2959-2964.
- Cozzarelli, I.M., Eganhouse, R.P., Baedecker, M.J. (1989) The fate and effects of crude oil in a shallow aquifer. II. Evidence of anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. En *Proceedings of the technical meeting of the U.S. geological survey toxic substances hydrology program*, Phoenix, Arizona, ed. G.E. Mallard. Water resources Investigations Reports. 88-4220.

Referencias

- Crapes, M.A.C., Tosta, Z.T., Das, M., Bispo, G.S., Pereira, D.C. (2000) Acute and chronic impacts caused by aromatic hydrocarbons on bacterial communities at Boa Viagem and Forte do Rio Branco beaches, Buanabara Bay, Brazil. *Environmental Pollution*. **108**, 291-295.
- Eaton, R.W., Chapman, P.J. (1992) Bacterial metabolism of naphthalene: construction and use of recombinant bacteria to study ring cleavage of 1,2-dihydrocynaphthalene and subsequent reactions. *Journal of Bacteriology*. **174**, 7542-7554.
- Environmental Protection agency. (1985) Evaluation and estimation of potential carcinogenic risks of polynuclear aromatic hydrocarbons. *Environmental Protection Agency*, Washington, D.C.
- Farrell, R., Chackabarty, A.M.(1979) Degradative plasmids. Molecular nature and mode of evolution. 97-109. En K.N. Timmis and A. Puhler (ed.) Plasmids of medical, environmental and commercial importance. Elsevier/North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
- Fiedrich, M., Frosser, R., Kern, E.A. Inskip, W.P., Ward, D.M. (2000) Effect of model sorptive phases on phenanthrene biodegradation; molecular analysis of enrichments and isolates suggests selection bases on bioavailability. *Applied Environmental Microbiology*. **66**, 2703-2710.
- Foght J.M., Westlake, W.S., Jonhson, W., Ridgway, H., (1996) *Microbiology*. **142**, 2333-2340.
- Forsyth, J.V., Tasao, Y.M., Bleam, R.D. (1995) bioremediation: When is augmentation needed. En *Bioaugmentation for site remediation* ed. R.S. Hinche, J. Fredrickson . Columbus, Ohio.
- Fuller, M.E., Scow, K.M. (1997) Lack of capsular Exopolymer effects on the biodegradation of organic compounds by *Pseudomonas sp* strains Js1 and JS150. *Microbial Ecology*. **34**, 248-253.
- Furukawa, K. (2000) Biochemical and genetic bases of microbial degradation for polychlorinated biphenyls (PCBs). *Journal Genetically Applied Microbiology*. **46**, 283-296.
- Furukawa, K. Chacrabarty, A.M. (1982) Involvement of plasmids in total degradation of chlorinated biphenyls. *Applied and Environmental Microbiology*. **44**, 619-626.
- Furukawa, K., Miyazaki, T. (1986) cloning of a gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudotulcaligens*. *Journal of Bacteriology*. **166**, 392-398.
- Garnier, P. M., Auria, C., Augur, C., Revah, S. (2000) Cometabolic biodegradation of methyl tert-butyl ether by a soil consortium; Effect of components present in gasoline. *Journal of Genetically Applied Microbiology*. **46**, 79-84.
- Gibson, D.T. (1971) The microbial oxidation of aromatic hydrocarbons. *Critical Reviews in Microbiology*. **1**, 199-223.
- Gibson, D.T., Subramanian, V. (1984) Microbial degradation of aromatic hydrocarbons, En *Microbial Degradation of Organic Compounds*, ed. DT. Gibson 181-252. Nueva York.

Referencias

- Glass, D.J., Raphael, T., Valo, R., Eyk, J. (1995) International activities in bioremediation: Growing markets and opportunities. En *Applied Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons*, ed. R.E.Hinche, J.A. Kettle, y H.J. Reisinge, 11-34. Columbus, Ohio.
- Hamann, c., Hegemann, J., Hildebrandt, A. (1999) Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation genes in different soil bacteria by polymerase chain reaction and DNA hybridization. *FEMS Microbiology Letters*. **173**, 255-263.
- Hamann, Christian, Hegemann, J., Hildebrandt, A. (1999) Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation genes in different soil bacteria by polymerase chain reaction and DNA hybridation. *FEMS Microbiology Letters*. **173**, 255-263.
- Harayama, S. (1997) Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design. *Current Opinion in Biotechnology*. **8**, 268-273.
- Head, I., Swannell, R.P.J. (1999) Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats. *Current Opinion in Biotechnology*. **10**, 234-239.
- Head, I.M., Swannell, R.P.J. (1999) *Current Opinion in Biotechnology*. **10**, 234-239.
- Hutchins, S.R., Sewell, G.W., Kovacs, D.A. Smith, G.A. (1991) Biodegradation of aromatic hydrocarbons by aquifer microorganisms under denitrifying conditions. *Environmental Science and Technology*. **25**, 68-76.
- Jamison, W.V., Raymond, R.L., Hudon, J.O. (1975) Biodegradation of high-octane gasoline in groundwater. *Developments in Industrial Microbiology*. **16**, 305-312.
- Jansson, J.K., Björklöf, K., Elvang, A.M., Jorgensen, K.S. (2000) Biomarkers for monitoring efficacy of bioremediation by microbial inoculants. *Environmental Pollution*. **107**, 217-223.
- Jones, W.R. (1998) Practical applications of marine bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*. **9**, 300-304.
- Kado, C.I., Liu, S.T. (1981) Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *Journal of Bacteriology*. **143**, 1365-1373.
- Kanally, R.A. Harayama, S. (2000) Biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology*. **182**, 2059-2067.
- Keith, L.H., Tellard, W.A. (1979) Priority pollutants I-a perspective view. *Environmental Science Technology*. **13**, 416-423.
- Koch, A.K., Kappeli, O., Fiechter, A., Reiser, J. (1991) Hydrocarbon assimilation an biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Journal of Bacteriology*. **173**, 4212-4219.
- Larisch, B.C., Duff, J.B., (1997) Effect of H₂O₂ and DTPA on the characteristics and treatment of TCF (totally chlorine free) and ECF (elementally chlorine free) craft pulping effluents. *Water Science and Technology*. **35**, 163-171.

Referencias

- Lichfield, J.H., Clark, L.C., (1973) Bacterial activity in ground waters containing petroleum products. *American Petroleum Institute Publication*. no. 4211. Washington, D.C.
- Lovley, D.R. (1997) Potential for anaerobic bioremediation of BTEX in petroleum-contaminated aquifers. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **18**, 75-81.
- Lovley, D.R. Phillips, E.J.P. (1988) Novel mode of microbial energy metabolism: Organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Applied and Environmental Microbiology*. **54**, 1472-1480.
- Manning, J., Booparth, R., Kulpa, C.F. (1995) A laboratory study in support of the pilot demonstration of a biological soil slurry reactor. Report no. SFIM-AEC-TS-CR-94038. US Army Environmental Center, Aberdeen Proving Ground, MD.
- Masse, R., Messier, F., Peloquin, L., Ayotte, C., Sylvestre, M. (1984) Microbial biodegradation of 4-chlorobiphenyl, a model compound of chlorinated biphenyls. *Applied and Environmental Microbiology*. **47**, 947-951.
- McKee, J.E., Laventy, F.B., Herte, R.N. (1972) Gasoline in groundwaters. *Journal of the Water Pollution Control Federation*. **44**, 293-302.
- Miller, C. M., Valentine, R. L. (1999) mechanistic studies of surface catalyzed H₂O₂ decomposition and contaminant degradation in the presence of sand. *Water Resources*. **33**, 2805-2816.
- Monteiro, A., Boaventura, R., Rodrigues, A.E. (2000) Phenol biodegradation by *Pseudomonas putida* DSM 548 in a batch reactor. *Biochemical Engineering Journal*. **6**, 45-49.
- Montiel, F. (1994) Introducción a la metodología del ADN recombinante e ingeniería genética. En *Manual de laboratorio*. Departamento de Bioquímica. Facultad de Química. UNAM.
- Neu, T.R. (1996) Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiology Review*. **60**, 151-166.
- Overton, E.B., Sharp, W., Roberts, P. (1994) Toxicity of Petroleum. En *Basic Environmental Toxicology*. 133-153. USA
- Prince, R.C. (1997) Bioremediation of oil spills. *Trends Biotechnology*. **15**: 158-160.
- Sandaa, R.A., Enger, O., Torsvik, V. (1999) Abundance and diversity of archaea in heavy-metal-contaminated soils. *Applications Environmental Microbiology*. **65**, 3293-3297.
- Setti, L., Mazziere, S., Pifferi, P.G. (1999) Enhanced degradation of heavy oil in an aqueous system by a *Pseudomonas sp.* In the presence of natural and synthetic sorbents. *Bioresource Technology*. **67**, 191-199.
- Shields, M.S., Hooper, S.W., Saylor, G.S. (1985) Plasmid-mediated mineralization of 4-chlorobiphenyl. *Journal of Bacteriology*. **3**, 882-889.

Referencias

- Singer, M.E., Finnerty, W.R. (1984) Microbial metabolism of straight-chain and branched alkanes. *Petroleum Microbiology* . 1-59.
- Skladany, G.J., Metting, F.B. (1998) Bioremediation of Contaminated Soil . *Journal of Bacteriology* , 483-509.
- Spain, J.E., Milligan, J.D. Downey, D.C., Slaughter, J.K. (1989) Excessive bacterial decomposition of hydrogen peroxide during enhanced biodegradation. *Ground Water*. 27, 2, 163-167.
- Sugihara, K., Ishihara, M., Shimauchi, R., Harayama, S. (1996) Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. *Environmental Science Technology*. 31, 45-51.
- Tapan, K., Harayama, D., Harayama, S. (2000) Fate of crude oil by the combination of photooxidation and biodegradation. *Environmental Science and Technology*, 34, 1500-1505.
- Teccani, V. (1964) Microbial degradation of hydrocarbons. *Progress in Industrial Microbiology*. 4, 3-33.
- Valls, M., Atian, S., De Lorenzo, V., Fernandez, L.A. (2000) Engineering a mouse metallothionein on de cell surface of *Kalstonia eutropha* CH34 for immobilization of heavy metals in soil. *Natural Biotechnology*. 18, 661-665.
- Wang Z.D., Gingas, M., Blenkinsopp, S., Sergy, G., Landriault, M., Sigouin, L., Goght, J., Semple, K., Westlake, D.W.S., (1998) Comparison of oil composition changes due to biodegradation and physical weathering in different oils. *Journal of Chromatography*, 809: 89-107.
- Watanabe, K. (2001) Microorganisms relevant to bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*. 12, 237-241.
- Watanabe, K., Baker, P.W. (2000) Environmentally relevant microorganisms. *Journal for Bioscience and biotechnology*, 89, 1-11.
- Wheatcroft, R., Williams, P.A. (1981) Rapid methods for de study of both stable an unstable plasmids in *Pseudomonas*. *Journal of General Microbiology*. 124,433-437.
- www.earth.nasa.gov/history/landsat/landsat.html
- www.envir.ee/baltics/pollutant.htm
- www.epa.gov/oilspill/colonial.htm
- www.exonvaldez.com
- www.sajs-jhu.edu/depts7asja/reischauer/9697briefbook/ceest_health/text.html
- www.umassd.edu7cfpa/mef/welcome.html
- www.infobiogen.fr/djb/index-gcpc/genbank/gb_sy_000.ref

Referencias

- Yuste, L., Corbella, M.E., Turiégano, M.J., Karlson, U., Puyet, A., Rojo, F. (2000) Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing. *FEMS Microbiology Ecology*. **32**, 69-75.
- Zaidi, B.R., Imam, S.H., (1999) Factors affecting microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene in de Caribbean coastal water. *Marine Pollution Bulletin*. **8**,737-742.
- Zgajnar, A., Zagorc-Koncan, J. (1999) Biodegradation Studies as an important way to estimate the environmental fate of chemical. *Water Science and Technology*. **39**,375-382.
- Zobell, C.E. (1946). Action of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriology Reviews*. **10**, 1-49.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA