

154



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

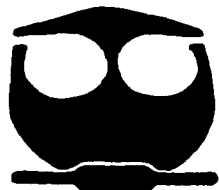
FACULTAD DE QUIMICA

ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE BACTERIAS LIBRES FIJADORAS DE NITROGENO AISLADAS DE LA RIZOSFERA, QUE UTILIZAN EL QUEROSENO COMO FUENTE DE CARBONO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: QUIMICA FARMACEUTICA - BIOLOGA PRESENTA:

ASTRID SCHILMANN HALBINGER



MEXICO, D. F. EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA

2002

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

Paginación

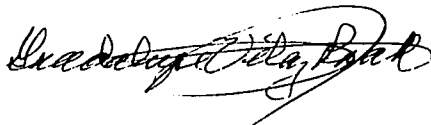
Discontinua

**Jurado asigando:**

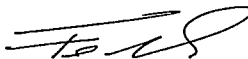
<b>Presidente</b>	<b>Prof. Guadalupe Vélez Pratt</b>
<b>Vocal</b>	<b>Prof. Lilia Vierna García</b>
<b>Secretario</b>	<b>Prof. Biserka Sveshtarova Pekarkova</b>
<b>1er Suplente</b>	<b>Prof. Marco Antonio Ortiz Jiménez</b>
<b>2o Suplente</b>	<b>Prof. Alejandro Camacho Cruz</b>

**Sitio donde se desarrolló el tema:**  
**Laboratorio de Ecología Bioquímica**  
**Departamento de Biotecnología y Bioingeniería**  
**CINVESTAV, México D.F.**

**Nombre completo y firma de la asesora del tema**  
**Q.F.B. Guadalupe Vélez Pratt**



**Nombre completo y firma del supervisor técnico**  
**Dr. Fernando Esparza García**



**Nombre completo y firma del sustentante**  
**Astrid Schilman Halbinger**



---

**ÍNDICE**

ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	IV
ÍNDICE DE GRÁFICAS	IV
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1 ANTECEDENTES	2
CAPÍTULO 2 FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO	5
2.1 Importancia de la fijación biológica de nitrógeno	5
2.1.1 Impacto de la fijación de nitrógeno en los ambientes terrestres	5
2.2 El proceso de fijación de nitrógeno	6
2.2.1 El sistema enzimático nitrogenasa	7
2.2.1.1 Mecanismos de protección de la nitrogenasa en presencia de O <sub>2</sub>	9
2.2.1.2 Genética y regulación	10
2.2.2 Métodos para cuantificar la fijación de nitrógeno	11
2.2.2.1 Método de reducción de acetileno	11
2.2.2.2 Método de isótopo estable <sup>15</sup> N	12
2.3 Microorganismos fijadores de nitrógeno	12
2.4 Bacterias libres fijadoras de nitrógeno en la rizósfera	13
2.4.1 Familia <i>Azotobacteraceae</i>	16
2.4.1.1 Género <i>Azotobacter</i>	17
2.4.1.2 Género <i>Azomonas</i>	19
2.4.1.3 Género <i>Beijerinckia</i>	19
2.4.1.4 Género <i>Derxia</i>	19
2.4.2 Otras familias	20
2.4.2.1 Género <i>Azospirillum</i>	20
2.4.2.2 Género <i>Herbaspirillum</i>	20
CAPÍTULO 3 BIODEGRADACIÓN DE CONTAMINANTES EN LOS AMBIENTES TERRESTRES	21
3.1 Degradación microbiana de hidrocarburos	23
3.1.1 Características de la biodegradación de hidrocarburos	24
3.1.2 Transporte de hidrocarburos al interior de la célula	24
3.2 Biosurfactantes	27
3.3 Vías de degradación de hidrocarburos	28
3.3.1 Alcanos lineales	28
3.3.2 Alcanos ramificados	29
3.3.3 Alquenos	29
3.3.4 Cicloalcanos	31
3.3.5 Compuestos aromáticos	32
3.4 Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos	36
3.4.1 Fitorremediación	38

---

---

CAPÍTULO 4	METODOLOGÍA	39
4.1	Técnicas microbiológicas	39
4.1.1	Preparación del medio de cultivo	39
4.1.2	Cultivos	40
4.1.2.1	Cultivo en medio sólido	40
4.1.2.2	Cultivo en medio líquido	40
4.1.3	Tinciones	41
4.1.4	Cuantificación de microorganismos	41
4.1.4.1	Determinación de biomasa por peso seco	41
4.1.4.2	Cuenta en placa por el método de extensión superficial	41
4.1.4.3	Turbidimetría	42
4.2	Desarrollo en condiciones de anaerobiosis	43
4.2.1	Jarras de anaerobiosis	43
4.3	Producción de biosurfactantes	44
4.3.1	Índice de emulsificación de 24 horas (E24)	44
4.3.2	Medición de tensión superficial	44
4.4	Estudio de la formación de quistes	45
CAPÍTULO 5	RESULTADOS	47
5.1	Características morfológicas	47
5.2	Desarrollo en condiciones de anaerobiosis	52
5.3	Producción de biosurfactantes	53
5.4	Estudio de la formación de quistes	61
CAPÍTULO 6	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	66
CONCLUSIONES		72
BIBLIOGRAFÍA		74

---

---

## Índice de Figuras

FIGURA 1	El sistema enzimático nitrogenasa	8
FIGURA 2	Ciclo de vida de <i>Azotobacter vinelandii</i>	18
FIGURA 3	Micrografía de un quiste maduro	18
FIGURA 4	Esquema general de la entrada del alcano ligado al surfactante a una célula microbiana	26
FIGURA 5	Concepto del canal receptor en la entrada de un alcano	26
FIGURA 6	Oxidación de un alcano lineal	30
FIGURA 7	Oxidación de un alqueno	31
FIGURA 8	Degradación del ciclohexano	32
FIGURA 9	Compuestos aromáticos convertidos a catecol	33
FIGURA 10	Reacciones de la orto fisión	34
FIGURA 11	Reacciones de la meta fisión	35
FIGURA 12	Tinción de Gram (aumento 100x)	50
	a) Cultivo mixto 11K 24 horas de incubación en medio RM	
	b) Cepa 11KMT 72 horas de incubación en medio RM	
	c) Cepa 11KP 72 horas de incubación en medio RM	
FIGURA 13	Tinción de Gram (aumento 100x)	51
	a) Cepa CS 48 horas de incubación en medio RC	
	b) Cepa CAM 72 horas de incubación en medio RC	
	c) Cepa CB 144 horas de incubación en medio RC	
FIGURA 14	Tinción de Gram de la cepa <i>A. vinelandii</i> (aumento 100x)	62
	a) 120 horas de incubación en medio RC-sacarosa	
	b) 120 horas de incubación en medio RM-butanol	
FIGURA 15	Tinción de Gram de la cepa 11KO (aumento 100x)	63
	a) 120 horas de incubación en medio RC-sacarosa	
	b) 120 horas de incubación en medio RM-butanol	
	c) 120 horas de incubación en medio RM-queroseno	
FIGURA 16	Tinción de Gram de la cepa 11KO (aumento 100x)	64
	a) 168 horas de incubación en medio RM-butanol	
	b) 168 horas de incubación en medio RM-queroseno	
	c) cuenta final de células, 30 horas de incubación en medio RC	

## Índice de Tablas

TABLA 1	Estructura genética del regulón <i>nif</i> en <i>Klebsiella pneumoniae</i>	11
TABLA 2	Microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre	13
TABLA 3	Preparación de la curva estándar (Escala de McFarland)	42
TABLA 4	Características macroscópicas (desarrollo en medio sólido)	47
TABLA 5	Características macroscópicas (desarrollo en medio sólido)	48
TABLA 6	Características microscópicas (tinción de Gram)	49
TABLA 7	Incubación en condiciones aerobias y anaerobias por 3 días	52
TABLA 8	Índice de emulsificación de 24 horas (E24) y biomasa de cultivos con 3 días de incubación	54
TABLA 9	Tensión superficial del cultivo mixto 11K	56
TABLA 10	Tensión superficial de la cepa 11KO	57
TABLA 11	Tensión superficial del cultivo mixto 12K	58
TABLA 12	Tensión superficial de la cepa CB	59
TABLA 13	Controles empleados en la medición de la tensión superficial	60
TABLA 14	Porcentaje de formación de quistes	62

## Índice de Gráficas

GRÁFICA 1	Índice de emulsificación de 24 horas (E24) de cultivos con 3 días de incubación	55
GRÁFICA 2	Tensión superficial (TS) e índice de emulsificación de 24 horas (E24) a diferentes tiempos de incubación para el cultivo 11K	56
GRÁFICA 3	Tensión superficial (TS) e índice de emulsificación de 24 horas (E24) a diferentes tiempos de incubación para la cepa 11KO	57
GRÁFICA 4	Tensión superficial (TS) e índice de emulsificación de 24 horas (E24) a diferentes tiempos de incubación para el cultivo 12K	58
GRÁFICA 5	Tensión superficial (TS) e índice de emulsificación de 24 horas (E24) a diferentes tiempos de incubación para la cepa CB	59



## INTRODUCCIÓN

Uno de los grandes problemas de la actualidad es la contaminación de los ambientes terrestres, que afecta la productividad de los suelos. Debido a este problema, se han desarrollado en los últimos tiempos, nuevas tecnologías para remediar los sitios contaminados, entre las cuales se puede mencionar la fitorremediación.

En estudios de fitorremediación de suelos contaminados con queroseno se observó el crecimiento de plantas de frijol y se aisló de la rizósfera de estas plantas, un grupo de cultivos mixtos de bacterias libres fijadoras de nitrógeno (BLFN) capaces de utilizar los hidrocarburos del queroseno como fuente de carbono. Los cultivos mixtos denominados 11K y 12K son los que han despertado mayor interés y constituyen el material biológico de este estudio.

Para conocer y evaluar la acción biológica de la flora microbiana, es necesario tener mayor conocimiento de su fisiología y de ahí deducir su actuación como flora asociada a la rizósfera en los procesos de fitorremediación. Así, este trabajo está incluido en un proyecto más amplio, cuyo objetivo es conocer los aspectos fisiológicos de las BLFN aisladas de la rizósfera de plantas de frijol para estudiar su posible aplicación en procesos de fitorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos.

El objetivo general de este trabajo es estudiar algunos aspectos fisiológicos de estos cultivos mixtos de BLFN, es decir los cultivos mixtos 11K y 12K y las cepas que los constituyen, y de esa manera deducir su aportación a los procesos de fitorremediación.

Los objetivos particulares se enumeran a continuación:

- a) Estudiar la influencia del oxígeno en la capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico en bacterias libres fijadoras de nitrógeno aisladas de la rizósfera.
- b) Investigar la producción de materiales emulsificantes en la incubación de bacterias libres fijadoras de nitrógeno atmosférico que utilizan hidrocarburos del queroseno como fuente de carbono.
- c) Demostrar la presencia de enquistamiento en algunos miembros de los consorcios microbianos y estudiar la influencia del queroseno en este proceso.

## 1. ANTECEDENTES

Este trabajo está incluido en un proyecto más amplio, que se ha desarrollado tanto en el Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas como en el Laboratorio de Ecología Bioquímica del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV, en el que se estudian los procesos de fitorremediación. En el Colegio de Postgraduados se observó el crecimiento de plantas de frijol *Phaseolus vulgaris* en suelos contaminados con queroseno.

Se aislaron diferentes poblaciones microbianas de la zona de la raíz de estas plantas y se encontró que el mayor número de microorganismos se presentaba en la zona del rizoplasma y la rizósfera.

De la rizósfera de estas plantas de frijol, se aislaron varios cultivos mixtos de bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico de vida libre (BFNA) que presentaron la capacidad de crecer en presencia de queroseno, identificados como BFNA 5, 7, 17 y 20<sup>o</sup>. (Hernández Acosta, 1997)

En el Laboratorio de Ecología Bioquímica se hizo una selección de los cultivos que presentaron mayor crecimiento en el medio con queroseno como fuente de carbono y mayor fijación de nitrógeno. El cultivo BFNA 5 colonia 5 fue identificado como 12K y el cultivo BFNA 20<sup>o</sup> colonia 3 fue identificado como 11K (la letra K corresponde a kerosene). (Pérez Vargas, 2001)

Del cultivo mixto 11K se aislaron 3 cepas:

- una cepa que presenta colonias opacas (11KO), que ha sido identificada probablemente como *Azotobacter nigricans* (García Esquivel, 2001)
- una cepa que presenta colonias mucoides transparentes (11KMT), que ha sido identificada probablemente como *Derxia gummosa* (García Esquivel, 2001)
- una cepa que presenta colonias puntiformes (11KP)

Del cultivo mixto 12K se aislaron 4 cepas:

- una cepa que presenta colonias color rosa salmón (CS)
  - una cepa que presenta colonias color amarillo (CAM)
  - una cepa que presenta colonias color naranja (CNA)
  - una cepa que presenta colonias color blanco (CB)
-

Pérez Vargas (2001) y García Esquivel (2001) determinaron las cinéticas de crecimiento poblacional de los cultivos mixtos y las cepas antes mencionadas utilizando queroseno como fuente de carbono y fijando nitrógeno atmosférico.

Los cultivos 11K y 12K y las cepas que los constituyen pueden utilizar los hidrocarburos del queroseno como fuente de carbono. Estos sirven también como fuente de energía para la fijación de nitrógeno. Se observó en todos los casos, que en el crecimiento con queroseno se obtiene una biomasa menor a la que se obtiene con una fuente convencional de carbono (sacarosa y manitol).

El cultivo mixto 11K es capaz de remover un 70% de queroseno en 8 días, la cepa 11KO un 78%, la cepa 11KMT un 33% y la cepa 11KP un 62% en el mismo periodo de tiempo en condiciones de fijación de nitrógeno.

La cepa 11KO presenta la mayor fijación de nitrógeno. Su crecimiento celular así como el porcentaje de remoción de queroseno (66%) se ven disminuidos en presencia de una fuente de nitrógeno como es  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Esta cepa presenta polimorfismo con capacidad de formación de quistes, lo cual podría ser inducido por el queroseno.

La cepa 11KMT presenta una menor capacidad de fijación de nitrógeno comparada con la cepa 11KO. Su crecimiento es más abundante en presencia de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , además de presentar mayor remoción de queroseno (48%) con esta fuente de nitrógeno.

La actividad de nitrogenasa de la cepa 11KP es muy baja. Crece muy poco en presencia de queroseno pero es capaz de removerlo eficientemente. Su crecimiento se ve favorecido por el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  pero no afecta su porcentaje de remoción de queroseno.

Las propiedades que presenta el cultivo mixto 11K, como biomasa celular, porcentaje y cinética de remoción de queroseno, actividad de la nitrogenasa, se deben a la cepa 11KO, que predomina en el cultivo. Así, la fijación de nitrógeno es de la misma magnitud para el cultivo mixto y la cepa predominante, y la remoción de queroseno del cultivo mixto (53%) se ve disminuida en presencia de una fuente de nitrógeno como sucede con la cepa 11KO. (García Esquivel, 2001)

El cultivo mixto 12K presenta una remoción de queroseno del 75% en 13 días de incubación, la cepa CS un 42%, la cepa CB un 40% y el cultivo CAM un 25% en el mismo periodo de tiempo en condiciones de fijación de nitrógeno.

El cultivo mixto 12K presenta la mayor fijación de nitrógeno, así como la mayor remoción de queroseno. La remoción de queroseno se ve disminuida (47%) en presencia

---

de una fuente de nitrógeno, como es  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . El crecimiento del cultivo mixto con queroseno como fuente de carbono es mayor que el de las cepas que lo constituyen. El cultivo mixto 12K es capaz de crecer con xileno o con dodecano como única fuente de carbono.

Las cepas aisladas CS y CB presentan una menor capacidad de fijación de nitrógeno comparadas con el cultivo mixto 12K. Ambas cepas son capaces de crecer con xileno o con dodecano como única fuente de carbono. La remoción de queroseno de la cepa CS se ve disminuida (15%) en presencia de una fuente de nitrógeno, como es  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

La cepa CAM presenta una actividad de la nitrogenasa menor que las cepas CS y CB. Su crecimiento se ve favorecido por una fuente de nitrógeno, pero no afecta significativamente su porcentaje de remoción de queroseno (23%). Esta cepa es capaz de crecer con dodecano como única fuente de carbono, pero no con xileno.

La capacidad de fijación de nitrógeno de la cepa CNA es muy pobre, por lo que el desarrollo en estas condiciones es muy lento. Su crecimiento con queroseno como fuente de carbono está muy reducido. Por esta razón, esta cepa no se ha estudiado con mucho detalle. (Pérez Vargas, 2001)

Algunos componentes del queroseno empleado en estos estudios se identificaron por cromatografía de gases utilizando como estándares una mezcla de alcanos lineales de  $\text{C}_{14}$  a  $\text{C}_{22}$  y otra de  $\text{C}_{24}$  a  $\text{C}_{28}$  y una mezcla de compuestos aromáticos (benceno, tolueno, o-, m- y p-xilenos, trimetilbenceno, tetrahidronaftaleno, naftaleno, cumeno, acenafteno y fenantreno). Se encontró que están presentes los alcanos de bajo peso molecular (de  $\text{C}_{14}$  a  $\text{C}_{22}$ ) y todos los compuestos aromáticos a excepción del fenantreno. (Pérez Vargas, 2001)

## **2. FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO**

### **2.1 Importancia de la fijación biológica de nitrógeno**

El nitrógeno es de extrema importancia para todas las formas de vida que se desarrollan en el planeta. Es un elemento biogénico ya que es un componente esencial de las proteínas, ácidos nucleicos, alcaloides y vitaminas; así, cualquier bacteria, hongo, planta superior o animal, no puede crecer y funcionar a menos que tome el nitrógeno en una forma asimilable. El nitrógeno se encuentra ampliamente distribuido en la tierra en forma soluble y gaseosa, esta última es la reserva más grande de nitrógeno como nitrógeno atmosférico.

Aunque es un gas abundante en la atmósfera, es un elemento nutritivo escaso; esto se debe a que el nitrógeno del aire es inerte y estable gracias a la triple ligadura que une a los dos átomos de nitrógeno. La mayoría de los seres vivos son incapaces de utilizar el nitrógeno atmosférico como una fuente de nitrógeno, debido a que carecen del sistema enzimático que rompa la triple ligadura de la molécula de nitrógeno y sólo ciertos microorganismos que contienen el complejo enzimático de la nitrogenasa, pueden llevar a cabo dicha ruptura. A los microorganismos capaces de catalizar el rompimiento de la triple ligadura de la molécula de nitrógeno y activarlo para que se combine con otros elementos químicos, se les conoce como microorganismos fijadores de nitrógeno o diazótrofos. Como característica básica estos microorganismos son células procarióticas y presentan el sistema enzimático de la nitrogenasa. (Ferrera Cerrato y Pérez Moreno, 1995)

#### **2.1.1 Impacto de la fijación de nitrógeno en los ambientes terrestres**

Un requisito indispensable para la productividad de todos los ambientes terrestres es la existencia de una fuente de nitrógeno asimilable. Debido a las inevitables pérdidas de nitrógeno de los suelos por procesos bióticos y abióticos, es necesario un suministro externo para asegurar la productividad a largo plazo; por lo que para poder considerar al nitrógeno como un nutriente renovable en el suelo, se requiere de la existencia de una población de microorganismos fijadores de nitrógeno. (Tate, 1995)

La disponibilidad de una fuente de nitrógeno asimilable por la planta es un factor limitante para la productividad agrícola. Por esta razón se han usado grandes cantidades

---

de fertilizantes químicos para suministrar el nitrógeno necesario a las plantas, pero esta práctica resulta en altos costos y daño al ambiente. En la agricultura sustentable se presenta un manejo integral y eficiente de los recursos agrícolas, de tal manera que se mantenga la calidad ambiental y se conserven los recursos naturales. Se requiere un fertilizante alternativo en este modelo de agricultura, y la fijación biológica de nitrógeno se ha mostrado como esta alternativa. Se trata de una alternativa viable económicamente y amable con el ambiente. (Legocki y col., 1997)

## **2.2 El proceso de fijación de nitrógeno**

En este proceso el átomo de nitrógeno sufre una reducción de su estado basal ( $N_2$ ) a su forma reducida  $NH_3$  como se muestra en la siguiente ecuación:



Bajo condiciones ideales se requiere un mínimo de 16 moléculas de MgATP por cada molécula de nitrógeno reducida. Pero en raras ocasiones se encuentran condiciones ideales en los ecosistemas, así es que el requerimiento de energía es en general entre 20 y 30 moléculas de MgATP. El gasto energético (ATP) proviene del proceso fotosintético, en el caso de los fijadores fotoautótrofos, o del catabolismo de compuestos orgánicos, en el caso de los microorganismos quimioheterótrofos. (Tate, 1995) (Madigan y col., 1999)

Por cada molécula de  $N_2$  reducido se sintetiza una molécula de  $H_2$ , por lo que hay una pérdida de poder reductor ( $2e^-$ ) por la formación del gas hidrógeno. Algunos géneros, por ejemplo *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, aumentan la eficiencia del proceso de fijación de nitrógeno recuperando la energía contenida en la molécula de  $H_2$  al contar con la enzima hidrogenasa, que oxida el  $H_2$  dando como producto  $H_2O$  y la consiguiente formación de ATP. (Tate, 1995) (Atlas y Bartha, 1997) (White, 1995)

Los electrones necesarios para el proceso de fijación de nitrógeno son transportados por los donadores ferredoxina (proteína FeS) o flavodoxina (flavoproteína). La fuente de electrones de estos donadores varía según el metabolismo de cada microorganismo. En el metabolismo quimioheterótrofo anaerobio (fermentación), la oxidación de piruvato a acetil-CoA y  $CO_2$  (reacción fosforoclástica) genera ferredoxina o flavodoxina reducidas. *Clostridium pasteurianum* genera ferredoxina reducida, mientras que *Klebsiella pneumoniae* produce flavodoxina reducida. La ferredoxina o la flavodoxina pueden ser reducidas por NADH generado durante el metabolismo aerobio (respiración),

por ejemplo la oxidación de carbohidratos. Las cianobacterias usan la energía luminosa para reducir a los donadores de electrones. (White, 1995) (Madigan y col., 1999)

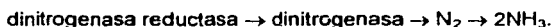
### 2.2.1 El sistema enzimático nitrogenasa

El sistema enzimático nitrogenasa está constituido por dos proteínas: la dinitrogenasa (también conocida como proteína MoFe o proteína I) y la dinitrogenasa reductasa (proteína Fe o proteína II).

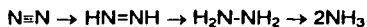
La dinitrogenasa reductasa es un homodímero ( $\chi_2$ ) que contiene un grupo  $Fe_4S_4$ ; esta es la proteína que hidroliza el ATP y transfiere los electrones del donador de electrones a la dinitrogenasa. Es muy sensible al  $O_2$  que la inactiva rápida e irreversiblemente.

La dinitrogenasa tiene una estructura  $\alpha_2\beta_2$  y cada par  $\alpha\beta$  contiene un grupo P ( $Fe_8S_7$ ) y un cofactor FeMo-co ( $Fe_7S_9Mo$ -homocitrato), en esta proteína se encuentra el sitio de reducción del  $N_2$ . (Ferguson, 1998) (Atlas y Bartha, 1997) (Tate, 1995)

Los electrones necesarios para la reducción del  $N_2$ , que provienen de los acarreadores ferredoxina o flavodoxina, son transferidos al grupo FeS de la dinitrogenasa reductasa. El grupo FeS transfiere estos electrones al grupo P de la dinitrogenasa, que actúa como aceptor de electrones intermediario. Así la secuencia de la transferencia de electrones en la nitrogenasa es:



El cofactor FeMo-co de la dinitrogenasa es el sitio de reducción del  $N_2$ . El mecanismo consiste en transferir 6 electrones para llevar a cabo la reducción de  $N_2$  a  $2NH_3$ , y se pierden dos electrones en la formación de  $H_2$ . El amonio es el primer producto demostrable del proceso. No se han aislado intermediarios de la reducción, por lo que se supone que los tres pasos sucesivos de la reducción ocurren en el sitio de reacción de la dinitrogenasa. Los pasos sucesivos de la reducción del  $N_2$  son: (Ferguson, 1998) (Madigan y col., 1999) (White, 1995)



En la Figura 1 se muestra la estructura del sistema enzimático nitrogenasa.

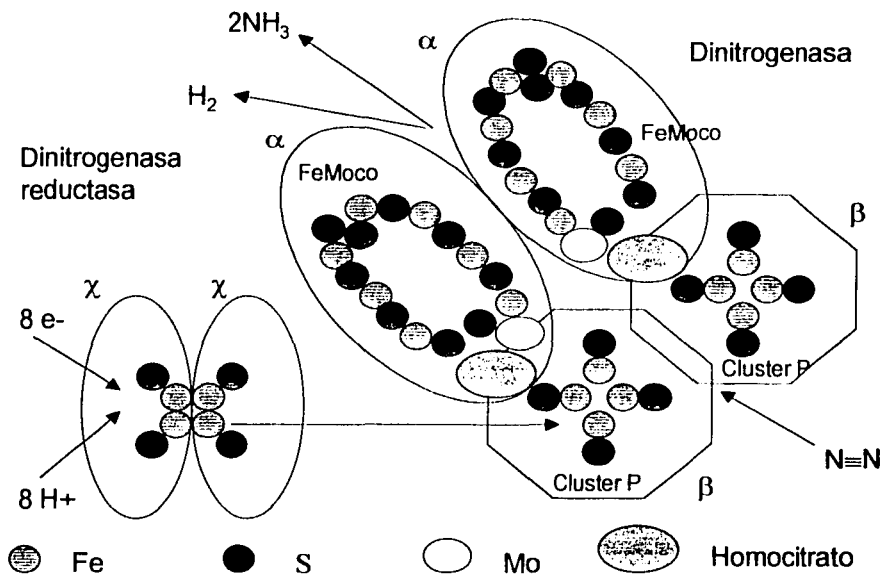


FIGURA 1 El sistema enzimático nitrogenasa (Atlas y Bartha, 1997)

Bajo ciertas condiciones de crecimiento se ha observado que algunas bacterias fijadoras de nitrógeno son capaces de sintetizar nitrogenasas alternativas. Estas nitrogenasas alternativas se sintetizan cuando el medio carece de molibdeno y presentan una actividad menor. Cuando el medio no contiene molibdeno, pero contiene vanadio, se sintetiza la nitrogenasa II. Esta nitrogenasa no presenta el cofactor FeMo-co descrito anteriormente, sino que contiene un cofactor con vanadio, llamado FeV-co. Cuando en el medio no hay molibdeno ni vanadio, se puede sintetizar una tercera nitrogenasa (nitrogenasa III), que sólo contiene hierro. El primer microorganismo en el que se demostró la presencia de estas nitrogenasas alternativas fue *Azotobacter chroococcum*. (Madigan y col., 1999)



### 2.2.1.1 Mecanismos de protección de la nitrogenasa en presencia de O<sub>2</sub>

Existen diferentes mecanismos para proteger al sistema enzimático nitrogenasa de la inactivación por la presencia de O<sub>2</sub> en los microorganismos que fijan el nitrógeno atmosférico en condiciones aerobias.

Protección respiratoria: La velocidad a la cual la célula consume el oxígeno aumenta, de tal manera que los niveles de oxígeno se reducen en su microambiente a niveles aceptables para la enzima. Por ejemplo, *Azotobacter sp.* oxida más sustrato del que necesita para satisfacer sus requerimientos de energía en presencia de oxígeno. Este mecanismo de protección se presenta en microorganismos aerobios de vida libre. (Tate, 1995) (White, 1995)

Protección conformacional: Existe una nitrogenasa que se protege en la presencia de oxígeno mediante un cambio de conformación; a través de este cambio se impide la fijación de nitrógeno, pero la actividad se recupera rápidamente cuando la tensión de oxígeno disminuye a niveles aceptables para la enzima. El cambio conformacional se da por la asociación de la nitrogenasa con una proteína protectora. Este mecanismo se ha observado en el género *Azotobacter*. (Tate, 1995) (White, 1995)

Regulación de la síntesis de nitrogenasa por oxígeno: Bajo condiciones desfavorables se reduce la producción de la enzima. El oxígeno molecular reprime la síntesis de nitrogenasa en *Klebsiella pneumoniae*, *Azotobacter chroococcum* y algunas cepas de *Rhizobium*. (Tate, 1995)

Producción de cápsula: Se puede proteger a la nitrogenasa por una barrera física que evita el contacto con el oxígeno. La presencia de una cápsula reduce la difusión del oxígeno hacia la célula. Este mecanismo ocurre en *Azotobacter sp.* y *Derxia gummosa*. (Tate, 1995)

Producción de heterocistos: La fijación de nitrógeno es un proceso especialmente incompatible en los microorganismos fotosintéticos aerobios, como las cianobacterias, en los que el oxígeno molecular es un producto del proceso de fotosíntesis. Para proteger a la nitrogenasa del contacto con el oxígeno, la enzima se encuentra aislada en estructuras especializadas menos pigmentadas y con una pared celular gruesa (heterocistos). Los heterocistos pierden el fotosistema II productor de O<sub>2</sub> y retienen el fotosistema I anoxigénico. Este mecanismo se da en las cianobacterias filamentosas como *Anabaena*, *Nostoc*, *Gleotrichia*. (Tate, 1995) (White, 1995) (Atlas y Bartha, 1997)

Producción de leghemoglobina: En los nódulos de las raíces de leguminosas, donde se encuentra la bacteria simbiote *Rhizobium*, se sintetiza una proteína parecida a

---

la hemoglobina con alta afinidad por el oxígeno, la leghemoglobina. Esta proteína transporta el oxígeno para satisfacer las necesidades del metabolismo aerobio de la bacteria, pero reduce la tensión de oxígeno en el nódulo, permitiendo la fijación de nitrógeno. (Tate, 1995) (White, 1995)

Migración a ambientes adecuados: Los microorganismos aerotácticos pueden migrar a posiciones adecuadas en el microambiente para realizar la fijación de nitrógeno. Este mecanismo se ha observado con *Azospirillum sp.* (Tate, 1995)

### 2.2.1.2 Genética y regulación

Se han identificado 20 genes necesarios para la expresión y regulación del sistema enzimático nitrogenasa en *Klebsiella pneumoniae* como se observa en la Tabla 1. Se conocen como los genes *nif* de un complejo regulón (un gran sistema de operones) llamado el regulón *nif*. Están presentes, además de los genes estructurales de la nitrogenasa, los genes para FeMo-co, los que controlan las proteínas del transporte de electrones y varios genes reguladores.

La nitrogenasa está sometida a controles regulatorios muy estrictos. La mayor parte de esta regulación se lleva a cabo a nivel de la transcripción. La fijación de nitrógeno se lleva a cabo cuando el nitrógeno atmosférico es la fuente de nitrógeno mayoritaria, pues la síntesis de la nitrogenasa se ve reprimida en presencia de amonio o de otra fuente de nitrógeno exógena, ya sea nitrato, urea o aminoácidos. La síntesis de nitrogenasa se reprime también en presencia de oxígeno. La transcripción de los genes estructurales *nif* se activa por la proteína NifA (regulación positiva), esta activación se elimina por la proteína NifL bajo ciertas condiciones.

**TABLA 1** Estructura genética del regulón *nif* en *Klebsiella pneumoniae*

<b>Gen</b>	<b>Función</b>
<i>nif Q</i>	Procesamiento de Mo
<i>nif B</i>	Síntesis de FeMo-co
<i>nif A</i>	Regulador positivo
<i>nif L</i>	Regulador negativo
<i>nif F</i>	Flavodoxina
<i>nif M</i>	Procesamiento de la dinitrogenasa reductasa
<i>nif Z</i>	Síntesis de FeMo-co
<i>nif W</i>	Síntesis de FeMo-co
<i>nif V</i>	Síntesis de homocitrato
<i>nif S</i>	Biosíntesis del centro de la metaloenzima
<i>nif U</i>	Biosíntesis del centro de la metaloenzima
<i>nif X</i>	No especificado
<i>nif N</i>	Síntesis de FeMo-co
<i>nif E</i>	Síntesis de FeMo-co
<i>nif Y</i>	Inserción de FeMo-co en la dinitrogenasa
<i>nif T</i>	No especificado
<i>nif K</i>	Subunidad $\beta$ de dinitrogenasa
<i>nif D</i>	Subunidad $\alpha$ de dinitrogenasa
<i>nif H</i>	Reductasa de la dinitrogenasa
<i>nif J</i>	Transporte de electrones: Piruvato flavodoxina oxidoreductasa

(Madigan y col., 1999)

## 2.2.2 Métodos para cuantificar la fijación de nitrógeno

### 2.2.2.1 Método de reducción de acetileno

La nitrogenasa no es exclusiva para el  $N_2$ , ya que también puede reducir cianuro ( $CN^-$ ), acetileno ( $HC\equiv CH$ ) y varios compuestos con triples enlaces. La reducción del acetileno por la nitrogenasa es un proceso en el que intervienen dos electrones y se produce etileno ( $H_2C=CH_2$ ). Probablemente la reducción de acetileno no tiene utilidad alguna para la célula, pero suministra al investigador un medio sencillo y rápido de cuantificar la actividad de la nitrogenasa, porque es relativamente fácil medir la cantidad de acetileno y de etileno por cromatografía de gases. Esta técnica se usa ampliamente en la actualidad para detectar la fijación de nitrógeno, ya que es un método más sensible, fácil y rápido que otros. (Madigan y col., 1999) (Atlas y Bartha, 1997)

### 2.2.2.2 Método de isótopo estable $^{15}\text{N}$

Esta prueba directa para detectar la fijación de nitrógeno se basa en la utilización del isótopo pesado  $^{15}\text{N}$ , que se detecta por espectroscopia de masas. La fase gaseosa de un cultivo se enriquece con  $^{15}\text{N}_2$  y después de la incubación se lleva a cabo una digestión para liberar el amoníaco producido, que se analizará en cuanto a su contenido de  $^{15}\text{N}$ . (Madigan y col., 1999) (Atlas y Bartha, 1997)

## **2.3 Microorganismos fijadores de nitrógeno**

Los microorganismos fijadores de nitrógeno se clasifican en simbióticos y no simbióticos (de vida libre); aquellos fijan el  $\text{N}_2$  a mayor velocidad que éstos.

En los ambientes terrestres, la mayor parte de la fuente de nitrógeno asimilable es proporcionada por los microorganismos fijadores simbióticos. (Atlas y Bartha, 1997)

Las bacterias simbióticas fijan el nitrógeno sólo en asociación específica con ciertas plantas.

Los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* se asocian con las raíces de las leguminosas, donde forman nódulos, en los que se lleva a cabo la fijación de nitrógeno. Primero se da un reconocimiento específico entre la planta y la bacteria, para que la bacteria se adhiera a los pelos radicales y realice la infección del pelo radical y la posterior formación de un tubo de infección. A través del tubo de infección, la bacteria se desplaza a la raíz principal, donde aparecen bacterias deformes llamadas bacteroides, que son las que llevan a cabo la fijación de nitrógeno. Continúa el proceso de división de las células bacterianas y vegetales con la formación del nódulo radical maduro.

La cianobacteria *Anabaena* se asocia con la planta acuática *Azolla*.

El aliso (género *Alnus*) presenta también nódulos radicales fijadores de nitrógeno, donde se alberga un microorganismo filamentosos del género *Frankia*, perteneciente al grupo de los actinomicetos. (Madigan y col. 1999)

Los microorganismos fijadores de nitrógeno no simbióticos son de vida libre, y se encuentran en diferentes hábitats acuáticos y terrestres. Estos microorganismos presentan diferentes capacidades metabólicas y requerimientos de oxígeno como se ejemplifica en la Tabla 2.

**TABLA 2** Microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre

	<b>Organótrofos</b>	<b>Fotótrofos</b>	<b>Litótrofos</b>
<b>Aerobios estrictos</b>	<i>Azotobacter</i> <i>Beijerinckia</i> <i>Dexia</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Mycobacterium flavum</i> <i>Azospirillum lipoferum</i> <i>Methylomonas</i> <i>Methylococcus</i>	Cianobacterias: <i>Nostoc</i> <i>Oscillatoria</i>	<i>Thiobacillus</i> <i>Alcaligenes</i>
<b>Anaerobios facultativos</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Bacillus polymyxa</i>	<i>Rhodospirillum</i> <i>Rhodopseudomonas</i> <i>Rhodobacter</i>	
<b>Anaerobios estrictos</b>	<i>Clostridium</i> <i>Desulfovibrio</i> <i>Desulfotomaculum</i>	<i>Chromatium</i> <i>Thiocapsa</i> <i>Chlorobium</i> <i>Heliobacterium</i> <i>Heliobacillus</i>	<i>Methanosarcina</i> <i>Methanococcus</i>

(Madigan y col., 1999) (Tate, 1995) (Döbereiner, Burns, Hollaender 1978) (Sylvia y col., 1999)

## **2.4 Bacterias libres fijadoras de nitrógeno en la rizósfera**

### Características de la rizósfera

Cuando el término rizósfera fue empleado por primera vez por Hiltner en 1904, fue para describir específicamente la zona alrededor de las raíces de las leguminosas, donde se estimula el crecimiento microbiano.

Actualmente se define a la rizósfera como la zona de influencia de la raíz en la interfase raíz-suelo donde se encuentra mayor actividad y crecimiento microbianos. El efecto de la rizósfera se puede expresar cuantitativamente como la proporción del número de microorganismos en la rizósfera, R y el número de microorganismos en el suelo que no está bajo la influencia de la raíz, S. Esta razón R/S es generalmente de 5 a 20, pero algunas veces puede alcanzar valores de 100 o más dependiendo de la población

microbiana estudiada. (Anderson, Guthrie, Walton, 1993) (Sylvia y col., 1999) (Atlas y Bartha, 1997)

Se distinguen en la rizósfera tres zonas: endorrizósfera (involucra epidermis y células corticales de la raíz invadidas por microorganismos), rizoplasma (zona de la superficie de la raíz) y ectorrizósfera (zona alrededor de la raíz). (Ferrera-Cerrato y Pérez Moreno, 1995) (Lynch, 1990).

Las características de la rizósfera están siempre determinadas por la interacción suelo-planta-organismos asociados a la raíz. (Lynch, 1990)

El papel de la planta en la rizósfera es proveer la superficie para el desarrollo de las microcolonias y producir los compuestos orgánicos que utilizan los microorganismos como fuente de carbono, de energía y como factores de crecimiento. (Tate 1995) (Anderson, Guthrie, Walton, 1993)

La materia orgánica liberada al suelo por la raíz durante el crecimiento, definida como rizodeposición, estimula el crecimiento microbiano y se puede clasificar como:

- Exudados hidrofílicos, compuestos de bajo peso molecular filtrados por las células por transporte pasivo, como carbohidratos (pentosas y hexosas), aminoácidos, ácidos orgánicos, hormonas, vitaminas, alcaloides, factores de crecimiento;
- Secreciones, compuestos de bajo y alto peso molecular liberados por transporte activo, como carbohidratos poliméricos y enzimas;
- Lisados celulares, compuestos liberados de células epidérmicas por lisis;
- Gases, como etileno y CO<sub>2</sub>.

Las células de la raíz también secretan un lubricante que facilita el crecimiento de la raíz a través del suelo (Lynch 1990) (Sylvia y col., 1999).

#### Los microorganismos en la rizósfera

Los microorganismos en la rizósfera realizan una serie de actividades benéficas para la planta. Se encargan de descomponer residuos vegetales y materia orgánica, aumentan la disponibilidad de varios nutrientes para la planta como fósforo, manganeso, hierro, zinc. Los microorganismos en la rizósfera promueven también el crecimiento de las plantas, produciendo hormonas de crecimiento para ellas y protegiéndolas de patógenos. Algunos de estos microorganismos presentes en la rizósfera fijan el nitrógeno atmosférico facilitando a la planta una fuente de nitrógeno asimilable. (Sylvia y col., 1999) (Tate, 1995) (Atlas y Bartha, 1997)

Los microorganismos en la rizósfera contribuyen también a la degradación de contaminantes en el suelo, como se verá más adelante. (Alexander, 1999)

Las bacterias son los organismos más numerosos en la rizósfera. Las bacterias que colonizan la rizósfera son predominantemente bacilos gram-negativos no esporulados de crecimiento rápido, que pueden presentar cápsula y/o notable acumulación de materiales de reserva. Los géneros frecuentemente encontrados son: *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Mycobacterium*, *Flavobacterium*, *Cellulomonas*, *Micrococcus*. (Ferrera Cerrato y Pérez Moreno, 1995) (Lynch, 1990) (Tate, 1995)

En la rizósfera se observan complejas interacciones ecológicas, que modulan la actividad bioquímica. La presencia de ciertos microorganismos en la rizósfera, por ejemplo *Pseudomonas putida* y *Azospirillum sp.*, induce la liberación de ciertos compuestos orgánicos de la raíz por medio de señales bioquímicas. (Anderson, Guthrie, Walton, 1993)

#### Bacterias libres fijadoras de nitrógeno (BLFN)

Aunque la velocidad de fijación de nitrógeno es menor en los microorganismos de vida libre que en los simbióticos, los primeros están ampliamente distribuidos en los ambientes terrestres. Se incrementa la velocidad de fijación de nitrógeno de las BLFN en la rizósfera, gracias a que encuentran gran cantidad de sustrato que proporciona la fuente de energía necesaria para este proceso. (Atlas y Bartha, 1997)

La microflora diazotrófica de la rizósfera está constituida predominantemente por bacterias heterótrofas que presentan diferentes requerimientos de oxígeno. Entre las BLFN aerobias y microaerofílicas se encuentran especies de *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Dexia*. Las bacterias anaerobias facultativas están representadas por especies de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Bacillus*, mientras que especies de *Clostridium* representan a las bacterias anaerobias estrictas (Lynch 1990) (Döbereiner, Burns, Hollaender, 1978).

Se describen únicamente las características fisiológicas de las BLFN de metabolismo heterótrofo aerobio, ya que son de gran interés en este trabajo.

### 2.4.1 Familia *Azotobacteraceae*

Las bacterias de la familia *Azotobacteraceae* son células grandes redondeadas de forma oval o bacilar, que presentan cambios dramáticos en la morfología con el tiempo o con diferentes condiciones de crecimiento. Las células se observan frecuentemente en pares, presentan movilidad por flagelos polares o peritricos, o pueden no presentar movilidad; son gram-negativas, aunque pueden ser gram-variable. No producen endosporas, pero algunas especies producen quistes. Son heterótrofas y capaces de fijar nitrógeno molecular. La mayoría de las cepas tienen cápsula y producen abundante mucosidad. Son aerobias estrictas, pero son capaces de crecer y fijar nitrógeno en ambientes microaerófilos. Se encuentran en suelo y en agua. (Holt y col, 1994)

Los géneros dentro de esta familia según el Manual Bergey son:

I. Células grandes de forma oval, la mayoría de las especies producen mucosidad extracelular. Son de crecimiento rápido, catalasa positiva.

- A. Con formación de quistes. *Azotobacter*
- B. Sin formación de quistes. *Azomonas*

II. Bacilos pequeños que producen mucosidad extracelular muy tenaz y que presentan abundantes cuerpos lipoides intracelulares. De crecimiento lento.

- A. Cuerpos lipoides bipolares. Catalasa positiva.  
*Beijerinckia*
- B. Numerosos cuerpos lipoides. Catalasa negativa.  
*Derxia*



### 2.4.1.1 Género *Azotobacter*

Son células grandes de forma oval con diámetro entre 1.5-2.0  $\mu\text{m}$ . Presentan pleomorfismo con variaciones desde las formas bacilares hasta cocoides. Se encuentran solas, en pares o en grupos irregulares, o a veces formando cadenas de longitud variable. No producen endosporas, pero si desarrollan quistes. Son gram-negativas. Se observa movilidad por flagelos peritricos o pueden ser no móviles. El metabolismo es aerobio, se pueden desarrollar en condiciones microaerofilicas. Algunas cepas de todas las especies producen pigmentos hidrofílicos e hidrofóbicos. Son quimioorganótrofas, fijan al menos 10 mg de nitrógeno molecular / g de carbohidrato consumido. (Holt y col. 1994)

El género *Azotobacter* se distingue del resto de los géneros de esta familia por su capacidad de formar quistes después del crecimiento exponencial o por inducción con agentes químicos. Los quistes son células metabólicamente latentes, más resistentes que las células vegetativas a condiciones ambientales adversas. Su principal característica es la resistencia a la desecación, que se emplea para distinguir los quistes de las formas vegetativas. Los quistes presentan también mayor resistencia a la radiación ultravioleta y al daño mecánico, aunque no sucede lo mismo con la resistencia al calor.

En la Figura 2 se observa el ciclo de vida de *A. vinelandii*. Las células vegetativas son bacilos móviles por flagelos peritricos. Cuando se induce el enquistamiento la célula pierde la movilidad, adquiere una forma esférica, aumenta el grosor de la pared y se vuelve refráctil. Este proceso morfogénético da lugar a un cuerpo central, que acumula lípidos, rodeado de una capa interna, que se conoce como intina, y una capa externa, que se conoce como exina. La acumulación de lípidos en el cuerpo central consiste en poli- $\beta$ -hidroxibutirato. En la figura 3 se presenta la micrografía de un quiste maduro.

Bajo condiciones apropiadas el quiste puede germinar. Durante la germinación se pierde la refractibilidad, el cuerpo central se hincha y ocupa el espacio de la intina. El aumento gradual de volumen del cuerpo central causa la fractura de la exina, liberándose una célula no móvil en proceso de división. Después de esta división celular, la célula recupera la movilidad. (Sadoff, 1975)

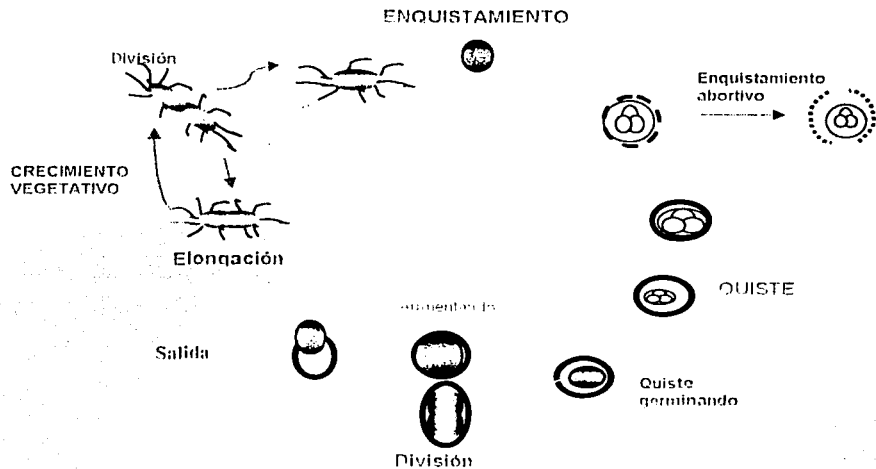


FIGURA 2 Ciclo de vida de *Azotobacter vinelandii* (Sadoff, 1975)

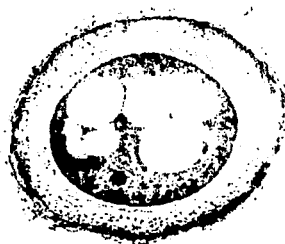


FIGURA 3 Micrografía de un quiste maduro (Sadoff, 1975)

#### 2.4.1.2 Género *Azomonas*

Son células con diámetro de 2.0  $\mu\text{m}$  y longitud variable. Generalmente presentan pleomorfismo con variaciones desde las formas bacilares, ovoides hasta cocoides. Se encuentran solas, en pares o en grupos. No producen endosporas ni quistes. Son gram-negativas o a veces gram-variable. Se observa movilidad por flagelos peritricos o polares. El metabolismo es aerobio, se pueden desarrollar en condiciones microaerofílicas. Casi todas las cepas producen pigmentos hidrofílicos y fluorescentes. Son quimiorganótrofas y fijadoras no simbióticas de nitrógeno, fijando al menos 10 mg de nitrógeno molecular / g de carbohidrato consumido. Se encuentran en suelo y agua. (Holt y col. 1994)

#### 2.4.1.3 Género *Beijerinckia*

Son bacilos redondeados rectos o ligeramente curvos de 0.5-1.5  $\mu\text{m}$  por 1.7-4.5  $\mu\text{m}$ . A veces se observan células grandes deformes de 3.0  $\mu\text{m}$  por 5.0-6.0  $\mu\text{m}$ . Presentan gránulos intracelulares de poli- $\beta$ -hidroxibutirato muy refráctiles, generalmente uno en cada extremo. En algunas especies la cápsula envuelve a varias células. Son gram-negativos y presentan movilidad por flagelos peritricos o pueden ser no móviles. El metabolismo es aerobio estricto, del tipo respiratorio con oxígeno como último aceptor de electrones. Tiene capacidad de fijar nitrógeno atmosférico en condiciones aerobias o microaerofílicas. En placas de agar, especialmente en condiciones de fijación de nitrógeno, se observa la producción de abundante mucosidad tenaz y elástica y el desarrollo de colonias gigantes con una superficie lisa o plegada. Se encuentran en suelo, particularmente de zonas tropicales. (Holt y col. 1994)

#### 2.4.1.4 Género *Derxia*

Son bacilos redondeados de 1.0-2.0  $\mu\text{m}$  por 3.0-6.0  $\mu\text{m}$ , que se encuentran solos o formando cadenas cortas. Presentan pleomorfismo dependiendo de la edad y las condiciones del cultivo. Las células jóvenes tienen un citoplasma homogéneo, mientras que las células más viejas presentan grandes cuerpos intracelulares refráctiles en todo el citoplasma. Son gram-negativas y presentan movilidad por un flagelo polar corto. El metabolismo es aerobio estricto, del tipo respiratorio con oxígeno como último aceptor de electrones. Tiene capacidad de fijar nitrógeno atmosférico en condiciones aerobias o microaerofílicas. En placas de agar las colonias jóvenes son mucoides y

---

semitransparentes, después hay crecimiento masivo, y las colonias son opacas y elevadas con superficie rugosa. Con el tiempo las colonias desarrollan un color café oscuro. Se encuentran en suelos tropicales. (Holt y col. 1994)

## 2.4.2 Otras familias

### 2.4.2.1 Género *Azospirillum*

Son bacilos rectos o anchos, 0.9-1.2  $\mu\text{m}$  de ancho, frecuentemente puntiagudos. Son gram-negativos o gram-variable. Presentan gránulos intracelulares de poli- $\beta$ -hidroxi-butarato. Las células son móviles por un solo flagelo polar. Son fijadores de nitrógeno aerobios, pero en condiciones microaerofílicas requieren de una fuente de nitrógeno para su crecimiento. El metabolismo es de tipo respiratorio con oxígeno como último aceptor de electrones, aunque algunas cepas también pueden tener al ion nitrato como último aceptor de electrones. Son quimiorganótrofos, sin embargo algunas cepas son autótrofas facultativas de hidrógeno. Se encuentran como especies de vida libre en el suelo o asociadas a las raíces de cereales, pastos y tubérculos. (Holt y col. 1994)

### 2.4.2.2 Género *Herbaspirillum*

Son células generalmente en forma vibrioide o a veces helicoidales de 0.6-0.7  $\mu\text{m}$  de ancho. Son gram-negativas y presentan movilidad por medio de 1-3 flagelos polares en uno o ambos extremos. Son fijadoras de nitrógeno aerobias, pero en condiciones microaerofílicas requieren de una fuente de nitrógeno para su crecimiento. El metabolismo es de tipo respiratorio y son quimiorganótrofas. Se encuentran como especies de vida libre en el suelo o asociadas a las raíces de gramíneas. (Holt y col. 1994)

### 3. BIODEGRADACIÓN DE CONTAMINANTES EN LOS AMBIENTES TERRESTRES

Los contaminantes presentes en los suelos son generalmente compuestos introducidos al ambiente por las actividades humanas, y que tienen el potencial de producir daño a los organismos que habitan en el ambiente contaminado, inhibiendo sus procesos vitales básicos. Los contaminantes más comunes y abundantes son los hidrocarburos (petróleo y sus derivados) y productos industriales como plaguicidas.

El petróleo en realidad es un producto natural, pero se ha convertido en un problema de contaminación por su abundante extracción y frecuentemente por derrames de los depósitos de combustible.

#### Biodegradación y biodisponibilidad

Biodegradación se refiere a la transformación parcial o total de un compuesto químico llevada a cabo por microorganismos, plantas o sus enzimas. El contaminante pierde su estructura original (complejidad molecular) o se degrada totalmente. (Sylvia y col., 1999) (Alexander, 1999)

La biodegradación ocurre de manera natural en todos los suelos. Los microorganismos capaces de degradar hidrocarburos están ampliamente distribuidos en el ambiente. Pero la cantidad de petróleo supera las capacidades de la autodepuración de los ambientes y se convierte en un contaminante. (Atlas y Bartha, 1997) (Oberbremer y Müller-Hurtig, 1989)

La biodegradación está influenciada por una compleja serie de interacciones entre el compuesto químico, las poblaciones microbianas y el ambiente.

Los factores fisicoquímicos del ambiente tienen gran influencia sobre la biodegradación de los contaminantes, ya sea que afecten el desarrollo microbiano o la biodisponibilidad del compuesto. (Sylvia y col., 1999)

El desarrollo microbiano depende de factores abióticos del ambiente (temperatura, pH, humedad, potencial redox, salinidad, presencia de toxinas) y de la presencia de nutrientes. Los microorganismos heterótrofos requieren una fuente de carbono y de energía, así como de aceptores de electrones para su metabolismo respiratorio. Muchos microorganismos necesitan también la presencia de factores de crecimiento. Se ha reportado que más del 90% de las bacterias presentes en el suelo son auxótrofas a

---

diversos compuestos. Otros nutrientes necesarios son, una fuente de nitrógeno, una fuente de fósforo y micronutrientes (minerales). (Alexander, 1999)

La biodisponibilidad se refiere a que el compuesto a degradar se encuentre accesible a las células microbianas o a sus enzimas extracelulares. Los microorganismos tienen fácilmente acceso a los compuestos que se encuentran en la fase acuosa, sin embargo los compuestos hidrofóbicos presentan una baja biodisponibilidad. (Sylvia y col., 1999)

Un compuesto no biodisponible puede estar en una fase líquida no acuosa o adsorbido en superficies sólidas. (Alexander, 1999)

Las poblaciones microbianas pueden tener la capacidad de degradar un contaminante, pero el compuesto persistirá si las condiciones ambientales no son favorables para la actividad degradativa. (Sylvia y col., 1999)

#### Conorcios y cometabolismo

Las interacciones entre diferentes microorganismos en el ambiente tienen gran influencia sobre la capacidad degradativa de éstos.

Un compuesto contaminante puede ser degradado por una sola cepa o por un consorcio microbiano. El término consorcio se refiere a la interacción benéfica entre dos o más poblaciones microbianas que presentan funciones metabólicas complementarias para llevar a cabo un proceso en forma coordinada; este puede llevar a cabo una transformación, que un microorganismo solo no podría realizar. El proceso que lleva a cabo el consorcio microbiano es más rápido, que la suma de las velocidades del proceso llevado a cabo por los microorganismos integrantes en forma aislada. (Alexander, 1999) (Sylvia y col., 1999)

El cometabolismo se presenta cuando un compuesto químico es transformado por un microorganismo sin que éste lo use como fuente de energía o de carbono; solamente es convertido a un producto intermediario de degradación, pero el microorganismo no presenta crecimiento a expensas de esta transformación; el intermediario así obtenido se acumula y persiste en el medio de cultivo. Sin embargo, esto no tiene que suceder en los ambientes naturales, pues otra población microbiana puede metabolizar el producto de la transformación inicial. En esta forma, el compuesto es degradado por la acción de dos microorganismos.

Las enzimas involucradas en el cometabolismo no son absolutamente específicas para su sustrato, por lo que pueden actuar sobre una serie de compuestos relacionados. (Sylvia y col., 1999) (Alexander, 1999)

### **3.1 Degradación microbiana de hidrocarburos**

Los hidrocarburos son compuestos que contienen solamente carbono e hidrógeno. Los variados tipos de compuestos que representan los hidrocarburos comparten ciertas características: son prácticamente insolubles en agua, son menos densos que el agua, son solubles en disolventes orgánicos. La solubilidad en agua se reduce drásticamente conforme aumenta el peso molecular. A temperatura ambiente pueden encontrarse en forma gaseosa, líquida o sólida dependiendo también de su peso molecular. Por su estructura los hidrocarburos se pueden clasificar como:

- Hidrocarburos alifáticos, ya sea lineales o cíclicos, que a su vez pueden ser saturados (alcanos, cicloalcanos) e insaturados (alquenos, cicloalquenos, alquinos, cicloalquinos).
- Hidrocarburos aromáticos, de estos existen mono-, di- y policíclicos, y pueden tener sustituciones o adiciones en el anillo bencénico. (Baker y Herson, 1994) (Ratledge, 1994)

#### **Queroseno**

El queroseno es un producto que se obtiene por destilación fraccionada del petróleo, constituye la quinta fracción en la destilación del petróleo. Se utiliza en iluminación, como combustible de ignición de ingenios, en los motores a reacción de los aviones, como disolvente en productos tales como plaguicidas, cosméticos y otros.

Es un destilado ligero del petróleo, que consiste principalmente de hidrocarburos en el rango de  $C_9$ - $C_{16}$ , de los cuales generalmente predominan los alcanos lineales; contiene también alcanos ramificados, cicloalcanos, alquenos y alquinos. En menor medida se encuentran compuestos aromáticos, como alquilbencenos y contiene menos del 5% de hidrocarburos aromáticos policíclicos, como naftaleno.

Su densidad a 20°C es 0.80 g/mL. La solubilidad en agua a 20°C es de 5 mg/L, pero el queroseno es miscible con otros solventes del petróleo. (García Esquivel, 2001) (Pérez Vargas, 2001) (Baker y Herson, 1994)

---

### 3.1.1 Características de la biodegradación de hidrocarburos

La susceptibilidad a la biodegradación de los hidrocarburos depende del tipo y tamaño de la molécula. En general los compuestos alifáticos son más fácilmente degradados que los compuestos aromáticos. (Ratledge, 1994)

Los hidrocarburos alifáticos de cadena larga ( $C_{10}$ - $C_{24}$ ) son mejor utilizados por los microorganismos, que los de cadena corta, pues éstos suelen ser tóxicos para la célula.

Los compuestos alifáticos lineales sufren una degradación más rápida que los compuestos ramificados, debido al impedimento estérico para las enzimas degradativas. Se ha observado que en un medio heterogéneo la degradación de los compuestos ramificados se ve inhibida por la presencia de compuestos lineales. (Ratledge, 1994) (Atlas y Bartha, 1997)

Los consorcios microbianos son especialmente activos en la degradación de hidrocarburos alifáticos insaturados y cíclicos. Es difícil aislar un cultivo puro que utilice alquenos o compuestos cicloalifáticos como única fuente de carbono y energía, ya que para su degradación total se requiere la interacción entre las poblaciones de un consorcio. En la degradación estos compuestos se pueden ver involucradas reacciones de cometabolismo. (Ratledge, 1994)

De una mezcla de hidrocarburos, los compuestos cicloalifáticos son los más persistentes, seguidos de los compuestos alifáticos ramificados y después de los aromáticos. Los compuestos que son biodegradados primero son los alcanos lineales y los hidrocarburos más solubles en agua como el naftaleno. (Oberbremer y Müller-Hurtig, 1989)

### 3.1.2 Transporte de hidrocarburos al interior de la célula

El transporte hacia el interior de la célula y el crecimiento a expensas de los hidrocarburos se ha relacionado fuertemente con la habilidad del microorganismo de producir biosurfactantes. La síntesis de estos surfactantes se puede considerar como un prerequisite para el metabolismo de los hidrocarburos. (Ratledge, 1994) (Kosaric, 1993)



La interacción del microorganismo con el hidrocarburo para llevar a cabo el transporte hacia el interior de la célula puede ocurrir de tres maneras:

- Interacción de las células con los hidrocarburos disueltos en la fase acuosa.

Este mecanismo es válido únicamente para los hidrocarburos que presentan mayor solubilidad en agua, es decir los de menor peso molecular. (Ratledge, 1994) (Kosaric, 1993)

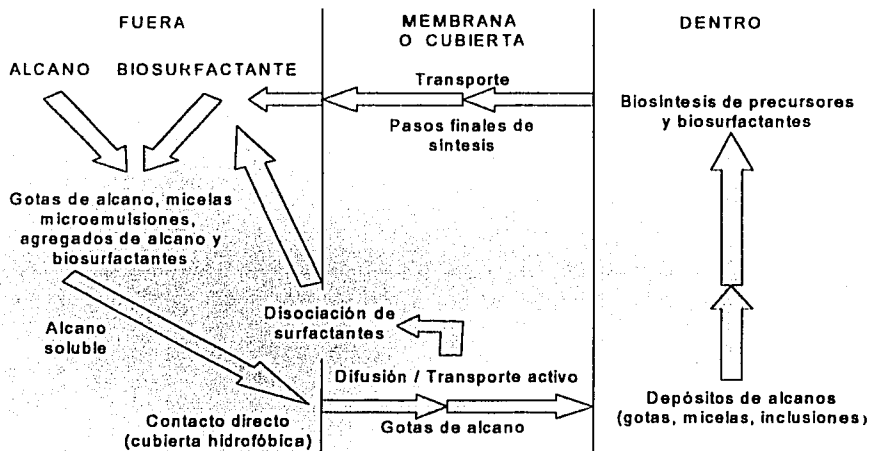
- Contacto directo de las células con grandes gotas de hidrocarburos. Los microorganismos en este caso presentan una superficie celular hidrofóbica, por lo que se da la interacción con las gotas de hidrocarburos. Un factor limitante en este mecanismo de transporte, es el área superficial de contacto con el sustrato. Los microorganismos producen biosurfactantes para emulsificar los hidrocarburos y aumentar su biodisponibilidad. La emulsificación de los hidrocarburos aumenta el área de contacto, por lo que estimula la entrada del sustrato a la célula. (Ratledge, 1994) (Kosaric, 1993)

- Interacción de las células con hidrocarburos emulsificados (pseudosolubilizados) en forma de pequeñas gotas de menor tamaño que la célula. Este es el mecanismo comúnmente empleado por los microorganismos. Los microorganismos producen biosurfactantes para emulsificar los hidrocarburos y aumentar su biodisponibilidad. En este mecanismo, el hidrocarburo emulsificado se une a la superficie de la célula, al contrario del mecanismo anterior, donde la célula se une al sustrato. (Ratledge, 1994) (Kosaric, 1993)

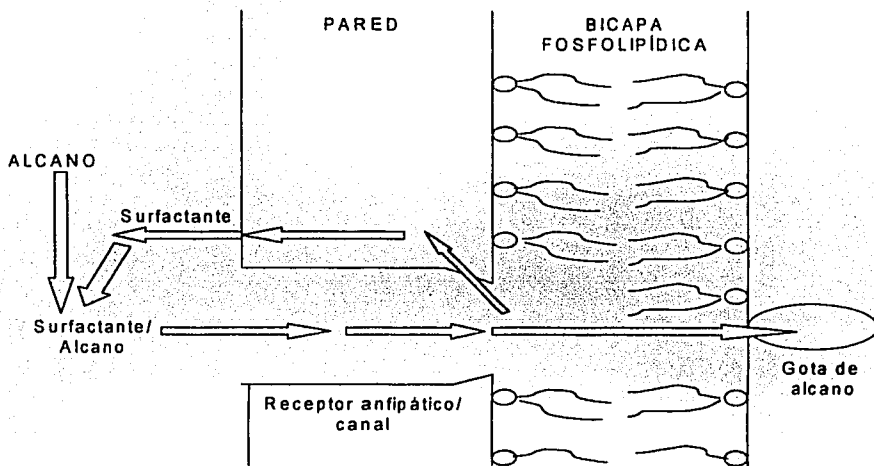
Dependiendo del microorganismo, se emplean uno o varios de los mecanismos arriba mencionados para transportar los hidrocarburos al interior de la célula.

En el punto de contacto del microorganismo con el sustrato, el hidrocarburo entra a la célula por difusión o por transporte activo. Se ha propuesto la participación de un canal o receptor anfipático en el transporte de los hidrocarburos. (Kosaric, 1993)

En las siguientes figuras (Figuras 4 y 5) se muestra el esquema hipotético de la entrada del alcano ligado al surfactante a una célula microbiana.



**FIGURA 4** Esquema general de la entrada del alcano ligado al surfactante a una célula microbiana (Kosaric, 1993)



**FIGURA 5** Concepto del canal receptor en la entrada de un alcano (Kosaric, 1993)

### **3.2 Biosurfactantes**

Los surfactantes o tensoactivos son moléculas anfipáticas con un grupo hidrofóbico (generalmente un hidrocarburo) y otro hidrofílico, que cuando se encuentran disueltos en agua se concentran en la interfase líquido-líquido o líquido-gas y tienden a agregarse en forma de micelas. Cuando la concentración de surfactante es muy baja, se encuentran las moléculas libres, pero conforme aumenta la concentración se alcanza la concentración micelar crítica (CMC); a partir de este punto se empiezan a formar las estructuras micelares y las características de la solución cambian drásticamente (tensión superficial, viscosidad, densidad); por estas características tienen la capacidad de reducir la tensión superficial o interfacial y permitir la emulsificación de dos líquidos inmiscibles. (Margaritis y col., 1979)

Los biosurfactantes han despertado gran interés en los últimos años por su diversidad, su naturaleza biodegradable, y sus posibles aplicaciones; estos compuestos tienen ventajas sobre los surfactantes químicos, como: menor toxicidad, mayor biodegradación y por ende mejor compatibilidad con el ambiente, su uso en ambientes extremos (temperatura, pH, salinidad), y su síntesis a partir de recursos renovables. (Desai y Banat, 1998)

Los biosurfactantes presentan una gama de estructuras químicas diferentes, pero tienen en común la habilidad de emulsificar mezclas de agua e hidrocarburos. Reducen la tensión superficial permitiendo la mezcla y emulsificación. (Kosaric, 1993) (Margaritis y col., 1979)

Se clasifican los biosurfactantes según su estructura química y su origen microbiano. Los principales grupos estructurales son glicolípidos, lipopéptidos y lipoproteínas, fosfolípidos y ácidos grasos y surfactantes poliméricos. Los glicolípidos son muy frecuentes y consisten en un grupo carbohidrato unido a un ácido graso de cadena larga o un ácido graso hidroxilado, por ejemplo: los ramnolípidos, los trehalolípidos y los soforolípidos. Se ha encontrado también un buen número de microorganismos que producen ácidos grasos y fosfolípidos con propiedades tensoactivas durante su crecimiento con alcanos lineales. (Desai y Banat, 1998)

Los biosurfactantes son sintetizados por una gran variedad de microorganismos, y son secretados o están unidos a partes externas de la célula. Su producción se asocia al crecimiento microbiano con un sustrato inmiscible en agua, aunque se producen también con sustratos solubles o miscibles con el agua. (Desai y Banat, 1998) (Margaritis y col., 1979)

La cinética de la producción de los biosurfactantes es muy variable y se han podido hacer pocas generalizaciones. Se ha observado la producción de algunos biosurfactantes asociada al crecimiento, y se encuentra una relación directa entre estos dos parámetros cinéticos. La producción se puede llevar a cabo bajo condiciones limitantes, es decir la producción de biosurfactante aumenta notablemente como resultado de la limitación de uno o más de los componentes del medio. (Desai y Banat, 1998)

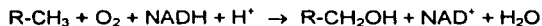
La actividad de un biosurfactante se puede determinar midiendo los cambios en la tensión superficial o interfacial con un tensiómetro y/o midiendo la capacidad de estabilizar o desestabilizar emulsiones que se manifiesta por la turbiedad presente. (Desai y Banat, 1998)

### **3.3 Vías de degradación de hidrocarburos**

Por lo general, el metabolismo de los hidrocarburos es aerobio con oxígeno como último aceptor de electrones. Sin embargo, se ha reportado también el metabolismo de tipo anaerobio. En este trabajo se exponen las características del metabolismo aerobio, que es de gran interés para esta investigación.

#### **3.3.1 Alcanos lineales**

El primer paso en el metabolismo de los alcanos lineales es una oxidación terminal, formándose el alcohol primario correspondiente. Por lo general esta oxidación se lleva a cabo por la alcano hidroxilasa, que es una monooxigenasa (introduce un átomo de oxígeno), como se muestra en la siguiente reacción:



Esta oxidación también se puede llevar a cabo por una dioxigenasa (introduce dos átomos de oxígeno), aunque es menos frecuente.



El alcohol resultante se oxida por la alcohol deshidrogenasa al aldehído correspondiente, y éste se oxida después por la aldehído deshidrogenasa para dar lugar a un ácido graso.

Se ha observado también la oxidación subterminal de los alcanos, resultando un alcohol secundario. Este alcohol es oxidado después para formar la cetona correspondiente, y ésta es oxidada para dar lugar a un éster. El éster resultante sufre una hidrólisis, produciendo un ácido graso y un alcohol.

Los ácidos grasos que resultan de la oxidación de los alcanos son metabolizados por  $\beta$ -oxidación, integrándose al metabolismo energético de la célula. (Ratledge, 1994) (Kosaric, 1993)

En la Figura 6 se muestra la oxidación terminal y subterminal que sufre un alcano lineal.

### **3.3.2 Alcanos ramificados**

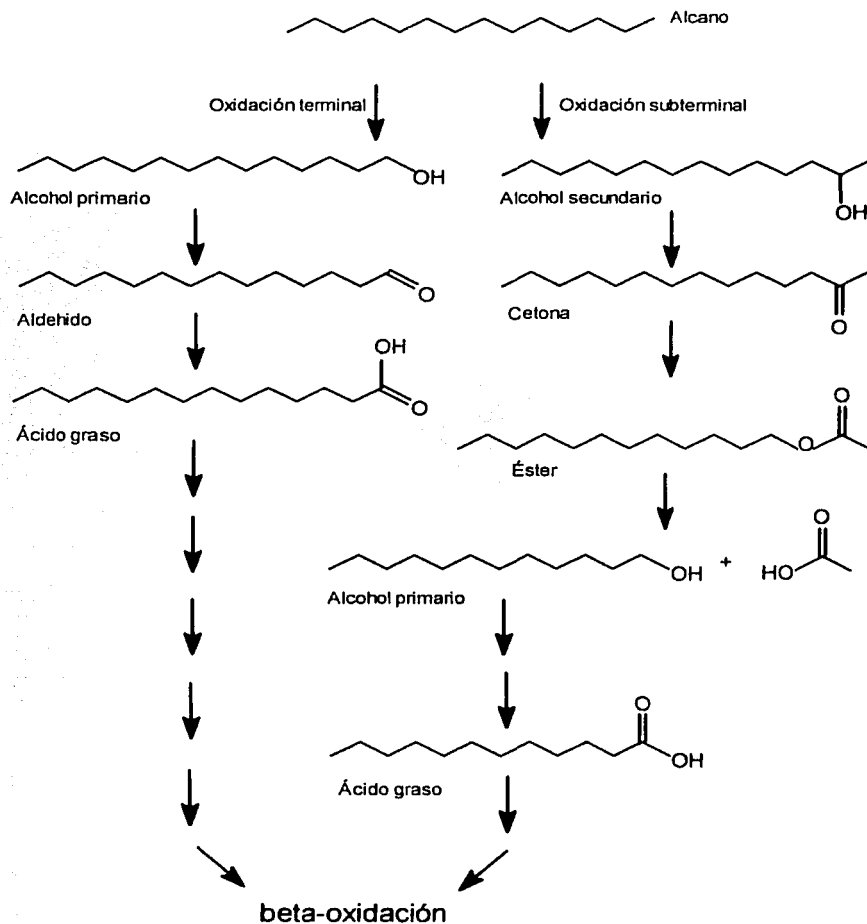
Los alcanos ramificados sufren una oxidación subterminal, dando lugar al alcohol secundario, que posteriormente se oxida resultando una cetona. La cetona es oxidada para dar lugar al éster, que por hidrólisis produce un ácido graso y un alcohol. El ácido graso se integra al metabolismo energético de la célula por  $\beta$ -oxidación.

Generalmente, los alcanos ramificados sufren una degradación más lenta que los correspondientes alcanos lineales. Así, en una mezcla de estos dos tipos de hidrocarburos, la degradación de los alcanos ramificados se ve inhibida por la presencia de los alcanos lineales. (Ratledge, 1994)

### **3.3.3 Alquenos**

La degradación de hidrocarburos alifáticos insaturados se inicia con un mecanismo de ataque al doble enlace o con el mismo mecanismo de los alcanos lineales antes expuesto. Así se reconocen cuatro mecanismos de degradación inicial: oxidación terminal por una oxigenasa dando lugar al alcohol primario correspondiente; oxidación subterminal por una oxigenasa produciendo un alcohol secundario; oxidación del doble enlace dando lugar a un epóxido; oxidación del doble enlace produciendo un diol. Se observan estos mecanismos en la Figura 7.

Los cultivos mixtos presentan gran importancia en la degradación de alquenos, ya que es difícil aislar un microorganismo capaz de utilizar a los alquenos como única fuente de carbono y energía. (Ratledge, 1994)



**FIGURA 6** Oxidación de un alcano lineal (Rattledge, 1994)

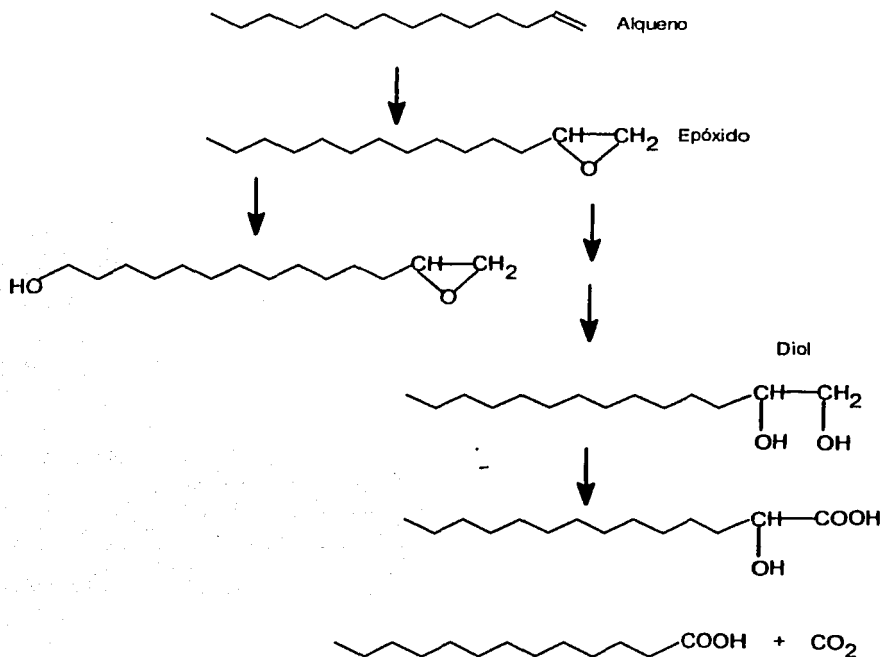
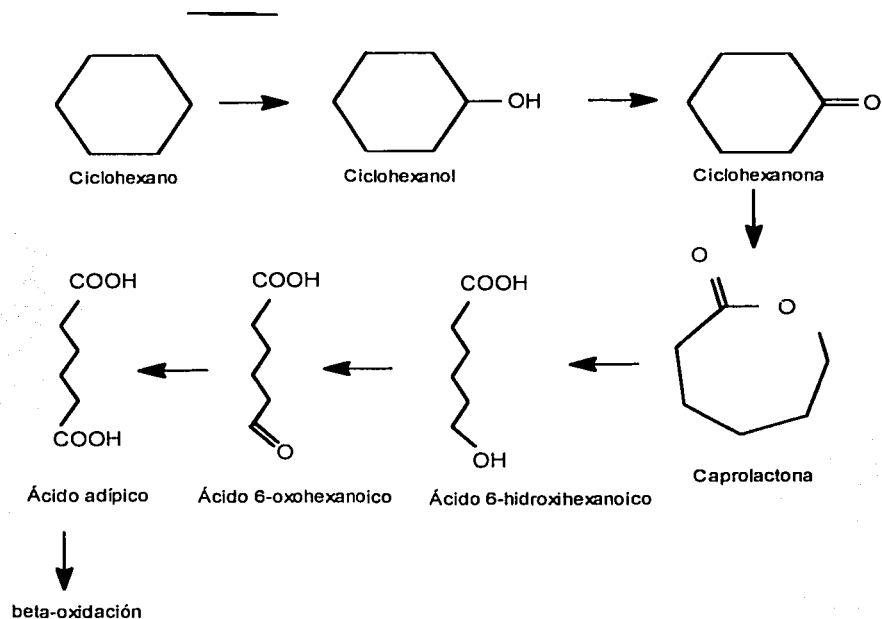


FIGURA 7 Oxidación de un alqueno (Rattledge, 1994)

### 3.3.4 Cicloalcanos

Se han reportado pocos casos en los que un microorganismo es capaz de utilizar un compuesto cicloalifático como única fuente de carbono y energía, por lo que generalmente la biodegradación de estos compuestos involucra a cultivos mixtos, así como reacciones de cometabolismo. El ataque cometabólico inicial involucra la oxidación del anillo por una monooxigenasa poco específica para dar lugar al alcohol correspondiente. Los siguientes pasos del metabolismo son llevados a cabo por otros microorganismos del cultivo mixto. En la Figura 8 se muestra la oxidación del ciclohexano.

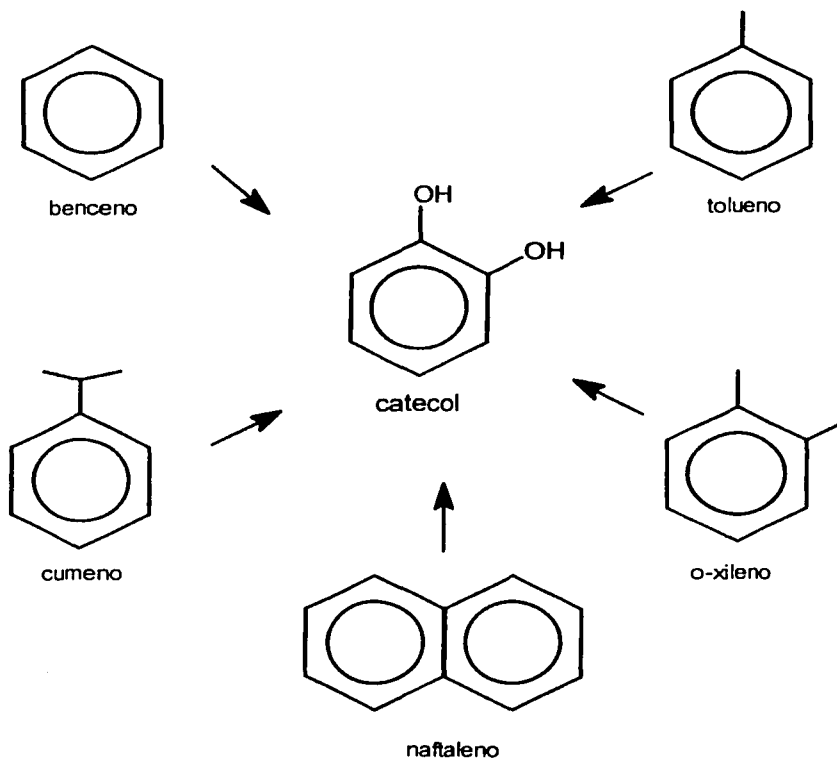


**FIGURA 8** Degradación del ciclohexano (Ratledge, 1994)

### 3.3.5 Compuestos aromáticos

La mayoría de los compuestos aromáticos se convierten como primer paso en la degradación a los intermediarios comunes: catecol o protocatecato, como se muestra en la Figura 9. Estos intermediarios son los sustratos iniciales para la fisión oxidativa del anillo bencénico. El anillo bencénico de estos intermediarios se puede romper por dos vías: la orto fisión y la meta fisión. Si el anillo se rompe entre dos átomos de carbono adyacentes hidroxilados, se trata de una orto fisión descrita en la Figura 10. La ruptura entre un átomo de carbono hidroxilado y un carbono adyacente no hidroxilado corresponde a una meta fisión como se muestra en la Figura 11. (Cork y Krueger, 1991)





**FIGURA 9** Compuestos aromáticos convertidos a catecol. (Cork y Krueger, 1991)

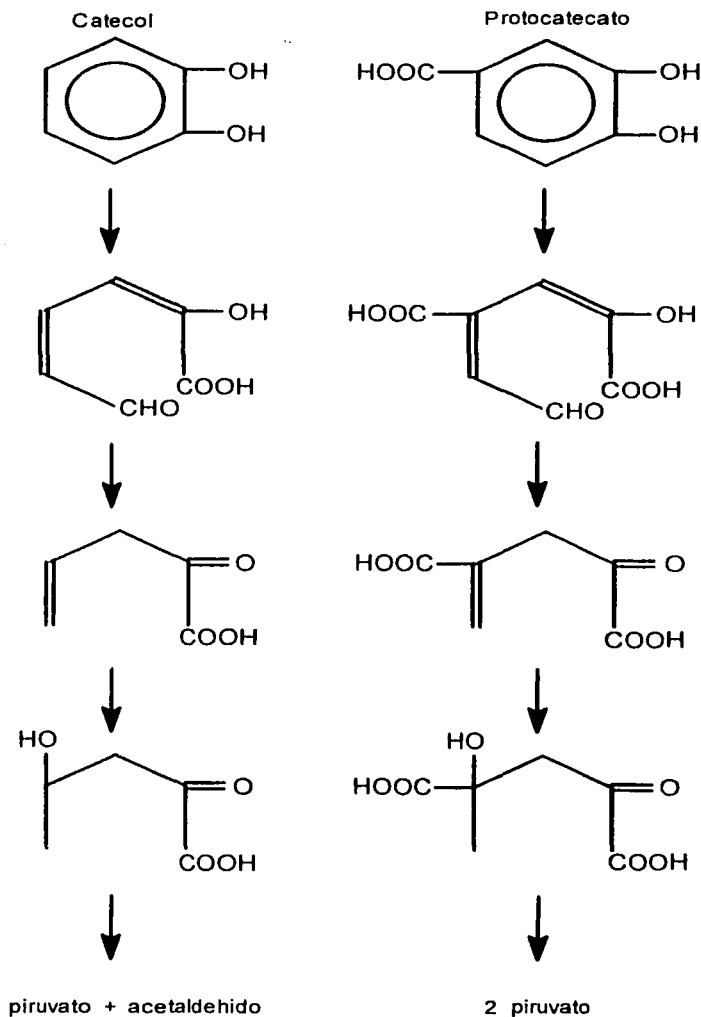


FIGURA 11 Reacciones de la meta fisión (Cork y Krueger, 1991)

En ambas vías (orto y meta fisión) el primer paso es la introducción de una molécula de oxígeno por una enzima dioxigenasa. Por este medio se logra abrir el anillo bencénico. Los productos de orto fisión del catecol y del protocatecol confluyen en un intermediario común, el  $\beta$ -cetoadipato, que después de condensarse con la coenzima A, se incorpora al ciclo del citrato. Los productos de meta fisión del catecol y del protocatecol se incorporan a las vías centrales del metabolismo microbiano. (Cork y Krueger, 1991)

### **3.4 Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos**

La biorremediación es una tecnología que hace uso de microorganismos o plantas, o bien enzimas derivadas de los mismos, para remediar ambientes contaminados. Remediar, en este contexto, significa disminuir o eliminar un contaminante del suelo, con el fin de restaurarle sus propiedades originales. (Sylvia y col., 1999)

La biorremediación hace uso de la acción natural de los microorganismos en la transformación y mineralización de los contaminantes presentes en el ambiente. (Anderson y Coats, 1994)

Para poder hacer uso de esta tecnología, se establecen ciertos criterios:

- El organismo empleado debe presentar la capacidad degradativa hacia el contaminante en cuestión para reducir su concentración a niveles aceptables en un lapso de tiempo razonable;
- El contaminante debe estar biodisponible;
- El ambiente contaminado debe presentar condiciones favorables para la biodegradación;
- El costo de la biorremediación debe ser menor o igual que el de otras tecnologías que se pudieran aplicar. (Sylvia y col., 1999)

La técnica más empleada en biorremediación ha sido la estimulación de la actividad de los microorganismos autóctonos (bioestimulación) adicionando nutrientes, regulando las condiciones redox, optimizando las condiciones de pH, aumentando la biodisponibilidad del contaminante.

Aunque la biodegradación ocurre de manera natural en los ambientes terrestres, se requiere la presencia de nutrientes para optimizar este proceso; el tipo y cantidad de

nutrientes requeridos depende de la composición natural del suelo y de la concentración de contaminante. Los contaminantes en el suelo aumentan la fuente de carbono disponible; en estas circunstancias, otros nutrientes (por ejemplo nitrógeno y fósforo) que antes estaban en cantidades adecuadas, serán ahora un factor limitante para la biodegradación, por lo que la adición de estas fuentes al suelo estimula la biodegradación de hidrocarburos.

Cuando se llevan a cabo reacciones de cometabolismo con los compuestos orgánicos contaminantes, es necesaria la presencia de sustratos para el crecimiento, por lo cual la adición de materia orgánica al suelo frecuentemente estimula la biodegradación. Si el factor limitante en el metabolismo aerobio es el oxígeno, se adiciona peróxido de hidrógeno o se inyecta oxígeno en el sitio para estimular la biodegradación.

Si se trata de compuestos hidrofóbicos, que no están biodisponibles, se ensaya una serie de surfactantes para aumentar la biodisponibilidad de los contaminantes. Se ha observado la producción de biosurfactantes específicos cuando los microorganismos crecen a expensas de hidrocarburos contaminantes. Varios de los biosurfactantes adicionados pueden ser degradados al mismo tiempo que los hidrocarburos de menor solubilidad en agua. (Kosaric, 1993) (Alexander, 1999)

Otros enfoques han sido:

- a) inocular los sitios con microorganismos que presentan capacidades degradativas específicas, por ejemplo, se puede aumentar la velocidad de la biodegradación si se inoculan bacterias autóctonas seleccionadas. (Kosaric, 1993)
- b) aplicar enzimas inmovilizadas,
- c) usar plantas (fitorremediación). (Anderson, 1994)

El diseño del sistema de biorremediación a emplear requiere diferentes estudios previos del sitio a tratar: estudio hidrogeológico, condiciones del sitio, compuestos a degradar, operación del proceso, estudio microbiológico. (Kosaric, 1993)

### 3.4.1 Fitorremediación

La fitorremediación es una tecnología para la remediación de suelos contaminados poco profundos (menos de dos metros), que involucra el uso de plantas superiores que directa o indirectamente resulta en la eliminación o degradación de contaminantes presentes en el suelo. Los procesos que se llevan a cabo involucran la asimilación del contaminante por la planta o la biodegradación del contaminante por los microorganismos que colonizan la rizósfera de la planta. (Alexander, 1999) (Anderson y Coats, 1994)

Las plantas pueden secuestrar, degradar o estimular la degradación de contaminantes en el suelo. Por ejemplo, las plantas secuestran metales pesados presentes en el suelo, reduciendo así la contaminación de estos elementos en el ambiente terrestre. Esta estrategia puede causar problemas de bioacumulación y los metales pesados pueden entrar a las cadenas alimenticias. Las plantas acumulan también compuestos orgánicos presentes en el suelo. Los compuestos orgánicos hidrofílicos pueden ser asimilados y transformados por las plantas. Se ha observado que el metabolismo de estos compuestos, se lleva a cabo por reacciones enzimáticas no específicas, involucrando en algunos casos el citocromo P450. La transformación de compuestos contaminantes en la planta puede causar problemas debido a la producción de metabolitos tóxicos. (Siciliano y Germida, 1998)

El tercer enfoque que se ha dado a la fitorremediación es de interés en este trabajo, pues se ha observado en estudios con plantas de frijol, que se estimulan ciertas poblaciones rizosféricas en presencia de los hidrocarburos del queroseno, resultando en su biodegradación. (Hernández Acosta, 1997)

Como se mencionó en el capítulo anterior, la rizósfera es una zona de gran actividad y crecimiento microbianos, y sus características están determinadas por la interacción suelo-planta-organismos asociados a la raíz. Las plantas pueden alterar a las poblaciones rizosféricas, por medio de la liberación diferenciada de exudados de la raíz. En efecto, se ha propuesto que las plantas producen señales específicas en respuesta a la presencia de compuestos contaminantes en el suelo, que estimulan la actividad microbiana detoxificante en la rizósfera. (Siciliano y Germida, 1998)

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Técnicas microbiológicas

#### 4.1.1 Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo empleado fue el propuesto por Rennie en 1981. El autor propone un medio compuesto de sales, de dos fuentes de carbono comunes (sacarosa, manitol) y dos cofactores nutricionales orgánicos (lactato de sodio y extracto de levadura en pequeñas cantidades), con el que se satisfacen las necesidades de la mayoría de las bacterias fijadoras de nitrógeno.

	Rennie Completo	Rennie Modificado con cofactores	Rennie Completo con amonio
<b>Solución A</b>			
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)	0.8	0.8	0.8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	0.2	0.2	0.2
NaCl (g/L)	0.1	0.1	0.1
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O (g/L)	0.025	0.025	0.025
Na <sub>2</sub> FeEDTA (g/L)	0.028	0.028	0.028
Extracto de levadura (g/L)	0.025	0.025	0.025
Manitol (g/L)	5.0	-----	5.0
Sacarosa (g/L)	5.0	-----	5.0
Lactato de sodio (60%v/v) (mL)	0.5	0.5	0.5
NH <sub>4</sub> Cl (g/L)	-----	-----	1.0
(Agar) (g/L)	15.0	15.0	15.0
Agua destilada (mL)	900	900	900
<b>Solución B</b>			
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (g/L)	0.2	0.2	0.2
CaCl <sub>2</sub> (g/L)	0.06	0.06	0.06
Agua destilada (mL)	100	100	100
<b>Vitaminas</b>			
Biotina (µg/L)	5	5	5
PABA (µg/L)	10	10	10
<b>Otros</b>			
Butanol (mL) al 0.2% w/v	-----	2.5	-----
d = 0.810 g/mL			
Queroseno (mL) al 1.0% v/v	-----	10	-----

Todos los reactivos empleados fueron grado analítico.

Las soluciones A y B fueron esterilizadas por separado en autoclave (20 min a 121°C), después de enfriar se mezclaron.

Las vitaminas se adicionaron esterilizándolas por filtración (filtro de perinola de nylon y fluorocil diámetro 13 mm y porosidad de 0.45  $\mu\text{m}$ ).

Cuando era necesario agregar una fuente de nitrógeno, se empleó cloruro de amonio al 0.1% w/v. (Stevenson y Socolofsky, 1966)

Para obtener el medio sólido se agregó agar purificado.

Para evaluar la capacidad de las cepas de crecer con queroseno como fuente de carbono, se sustituyó la sacarosa y el manitol por el queroseno en el medio de Rennie modificado. En medio sólido, el queroseno se impregnó en un disco de papel filtro que se colocó en la tapa de la caja de Petri; en cultivos en medio líquido, el queroseno se adicionó directamente después de haber inoculado los matraces. El queroseno se adicionó sin esterilizar. (Hernández, 1997) (García, 2001) (Pérez, 2001)

Para el estudio de la formación de quistes, se empleó el butanol como inductor (ver 4.4). En este caso se sustituyó la sacarosa y el manitol por el butanol en el medio de Rennie modificado, ya sea sólido o líquido. El butanol se esterilizó por filtración como se mencionó anteriormente para las vitaminas.

## 4.1.2 Cultivos

### 4.1.2.1 Cultivo en medio sólido

El cultivo en medio sólido se realizó en tubo inclinado y/o en caja Petri. Se tomó una asada del cultivo a transferir, que podía provenir de un cultivo de matraz con medio líquido, de tubo inclinado o de caja Petri. En el tubo inclinado se sembró por estría ondulada, mientras que en la caja Petri se sembró por estría continua, cuando se quería obtener abundante crecimiento, o por estría en cuadrante radial, cuando se querían aislar colonias. Los tubos o las cajas se incubaron a 28°C. Siempre se incluyó un blanco de medio de cultivo. (Ramírez Gama y col., 1996)

### 4.1.2.2 Cultivo en medio líquido

El cultivo en medio líquido se realizó en matraces Erlenmeyer de 125 mL que contenían 50 mL de medio de cultivo. Se tomaron una o varias asadas del cultivo de medio sólido o un volumen conocido de cultivo en medio líquido transfiriendo en

condiciones de esterilidad al matraz. Por lo general se tomó la asada de un cultivo fresco en caja Petri (24-48 h de incubación) para inocular los matraces. Los matraces se incubaron a 28°C y agitación de 120 rpm. Siempre se incluyó un blanco de medio.

### **4.1.3 Tinciones**

Se llevó a cabo la tinción de Gram de las preparaciones de los diferentes cultivos. (Ramírez Gama y col., 1996)

Las preparaciones se fijaron aplicando resina sintética y un cubreobjetos para mantenerlas y protegerlas.

### **4.1.4 Cuantificación de microorganismos**

#### **4.1.4.1 Determinación de biomasa por peso seco**

La determinación de biomasa por este método se realizó filtrando una muestra de cultivo en medio líquido por una membrana White HAWP diámetro 47 mm porosidad de 0.45 µm en un equipo Millipore. Antes de emplear las membranas, éstas se secaron en la estufa de vacío a 50°C y se mantuvieron en el desecador, para obtener el peso constante de ellas (peso inicial). Una vez pesadas se utilizaban para filtrar un volumen conocido de la muestra que no tapara la membrana. Se dejaba secar la membrana a temperatura ambiente, después en la estufa de vacío a 50°C, y finalmente se mantuvieron en el desecador, para obtener el peso constante (peso final). Al peso final obtenido se le restaba el peso inicial de cada membrana y se dividía entre el volumen filtrado, obteniendo el valor de biomasa en mg/L.

#### **4.1.4.2 Cuenta en placa por el método de extensión superficial**

Para realizar las series de diluciones decimales se emplearon tubos con tapón de rosca con 9 ml de solución salina isotónica (0.8%). Se tomó 1 ml del cultivo líquido en matraz previa agitación y se transfirió al tubo de la dilución 10<sup>-1</sup>. A partir de este tubo se continuó con la serie de diluciones decimales hasta llegar a la dilución 10<sup>-5</sup>. Cuando el desarrollo observado en cultivo líquido fue abundante se prepararon las diluciones 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> y 10<sup>-5</sup> para realizar la cuenta en placa, y cuando el desarrollo no fue tan abundante se emplearon las diluciones 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> y 10<sup>-4</sup>. Se tomó un volumen de 0.1 ml con micropipeta de la dilución correspondiente y se transfirió a la placa de agar Rennie completo, después



se extendió este volumen en la superficie con un triángulo de vidrio previamente flameado con alcohol. Las placas se incubaron a 28°C por 48-72 h y se realizó la cuenta de UFC en las placas que presentaban un número entre 30 y 300 colonias. (Ramírez Gama y col., 1996) (Sylvia y col., 1999)

#### 4.1.4.3 Turbidimetría

En un espectrofotómetro Spectronic 20 de Bausch & Lomb a una longitud de onda de 600 nm se determinó la absorbancia de las diferentes mezclas de la escala de McFarland calibrando el aparato con un blanco de reactivos. Se tomaron estos datos como la curva estándar. Se determinó la absorbancia de las muestras de cultivo líquido en las mismas condiciones. Las lecturas de las muestras se interpolaron en la gráfica obtenida con la curva de McFarland. (Ramírez Gama y col., 1996)

**TABLA 3** Preparación de la curva estándar (Escala de McFarland)

No. de tubo	BaCl <sub>2</sub> 1% (ml)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1% (ml)	Bacterias * 10 <sup>6</sup> / ml
1	0.1	9.9	300
2	0.2	9.8	600
3	0.3	9.7	900
4	0.4	9.6	1200
5	0.5	9.5	1500
6	0.6	9.4	1800
7	0.7	9.3	2100
8	0.8	9.2	2400
9	0.9	9.1	2700
10	1.0	9.0	3000

(Ramírez Gama y col., 1996)

## **4.2 Desarrollo en condiciones de anaerobiosis**

Se observó el desarrollo de los cultivos en tres diferentes medios sólidos: Rennie completo, Rennie completo con amonio y Rennie modificado con queroseno.

Las cajas Petri recién inoculadas por estria continua se introdujeron a la jarra de anaerobiosis junto con el sobre generador correspondiente para cada sistema empleado y el indicador de anaerobiosis, se cerró rápidamente la jarra y se incubó por 72 h a 28°C. Al mismo tiempo se incubaron los cultivos en condiciones aerobias, y al cabo de 72 h, se hicieron las observaciones comparando el crecimiento obtenido en condiciones aerobias y anaerobias.

### **4.2.1 Jarras de anaerobiosis**

Se emplearon tres tipos de sistemas para generar anaerobiosis.

a) Primero se utilizó la jarra tradicional de anaerobiosis que contiene un catalizador activo y que requiere un sobre generador (Gas Generating Kit Oxoid BR38) al que hay que añadir 10 ml de agua.

b) Se utilizó también un recipiente de anaerobiosis de marca GENbox Jar 2.5 litros con sobres generadores GENbox anaer, que funcionan sin agregar agua ni catalizador

c) La tercera jarra de anaerobiosis empleada fue Oxoid AnaeroJar AG25 de 2.5 litros. No requiere el uso de catalizador como el caso de la primera jarra mencionada. Se emplearon los sobres generadores GENbox.

El indicador de anaerobiosis (Oxoid) permitió controlar que la reacción de anaerobiosis se lograra correctamente y que se mantuviera durante toda la incubación. Se abre el sobre y se deja expuesto alrededor de 10 mm de la tira, que en presencia de oxígeno virará a rosa. El indicador virará de rosa a blanco proporcionando una señal visual de la anaerobiosis creada.

### **4.3 Producción de biosurfactantes**

#### **4.3.1 Índice de emulsificación de 24 horas (E24)**

Cooper y Goldenberg (1987) reportaron la medición de la capacidad de emulsificación por este método, empleando 6 mL de queroseno adicionados a 4 mL de la muestra acuosa. En este trabajo se hizo una modificación en los volúmenes empleados para reducir la cantidad de desechos de queroseno, pero respetando la proporción 60:40 empleada por Cooper y Goldenberg (1987).

Los cultivos se desarrollaron en medio líquido Rennie completo y Rennie modificado con queroseno. Después del tiempo de incubación a 28°C y 120 rpm se tomaron 1.6 mL de medio de cultivo con células y se depositaron en un tubo. Se adicionaron 2.4 mL de queroseno. Se agitaron los tubos vigorosamente en el vórtex por 2 minutos y se dejaron reposar por 24 h. El índice de emulsificación de 24 h (E24) se reportó como el porcentaje de la altura de la columna emulsificada (mm) dividida entre la altura total de la columna líquida (mm). Como control positivo se empleó Tween 80 al 1% y como control negativo el blanco de medio de cultivo. Se determinó la biomasa obtenida al tiempo de incubación por peso seco.

#### **4.3.2 Medición de tensión superficial**

Para esta medición los cultivos se desarrollaron en medio líquido Rennie completo y Rennie modificado con queroseno. A tiempos de incubación preestablecidos (2 o 3, 7, 12 o 14 días) se tomó una muestra del cultivo para medir la tensión superficial. La medición se realizó en un tensiómetro Analite 2141, tomando un mínimo de 3 lecturas y registrando la temperatura. Las lecturas de la tensión superficial se dan en mN/m (miliNewton por metro). Las muestras provenientes del medio con queroseno se pasaron primero a un embudo de separación tratando de eliminar el hidrocarburo para reducir las interferencias. Se tomaron también las lecturas de los blancos de ambos medios (sin inóculo), de agua destilada y de solución de Tween 80 al 0.1%. La cuantificación de los microorganismos a cada tiempo de incubación se realizó por turbidimetría.

#### **4.4 Estudio de la formación de quistes**

Socolofsky y Wyss (1962) describen el experimento de desecación para estudiar la resistencia de los quistes de *Azotobacter vinelandii*. Suspensiones de quistes y de células vegetativas se filtraron por una membrana. Las membranas se transfirieron a una caja Petri con un absorbente seco y se incubaron a 33°C. Después de un periodo de incubación las membranas se lavaron con agitación vigorosa para recuperar cuantitativamente las células, y se determinó la viabilidad por cuenta en placa. Stevenson y Socolofsky (1966) reportan que las células que soportan 4 días de desecación se consideran quistes maduros.

Basándose en estos reportes el experimento de resistencia a la desecación se realizó de la siguiente forma:

Inicialmente se realizó el experimento empleando una cepa de *Azotobacter vinelandii* desarrollada en medio Rennie completo con sacarosa (omitiendo el manitol) y en medio Rennie modificado con butanol para montar las técnicas. Esta cepa se obtuvo de la Colección Microbiana del CINVESTAV. Posteriormente se realizó el experimento con la cepa 11KO para verificar la posible formación de quistes con queroseno como fuente de carbono observada previamente por García Esquivel (2001).

Para iniciar el experimento se tomó el inóculo de las cepas de un cultivo fresco (máximo 24 h de incubación) en caja con medio Rennie completo. El inóculo de las cepas en su forma bacilar o vegetativa se transfirió al medio líquido. En el caso de la cepa de *Azotobacter vinelandii* se inoculó medio líquido Rennie completo con sacarosa y Rennie modificado con butanol, y en el caso de la cepa 11KO se inoculó medio líquido Rennie completo con sacarosa, Rennie modificado con butanol y Rennie modificado con queroseno.

El cultivo líquido se incubó a 28°C y 120 rpm por 7 días. Al cabo de este periodo de incubación, se tomó una muestra de 1 o 2 mL en condiciones de esterilidad y se filtró por una membrana de nylon diámetro 47 mm porosidad de 0.45 µm estéril en el equipo Millipore estéril y se lavó con agua destilada estéril. La membrana se transfirió a una caja Petri estéril con un papel filtro seco y estéril. Se tomó otra muestra de 1 mL de los cultivos para hacer una serie de diluciones decimales ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) y realizar la cuenta en placa por el método de extensión superficial. Así se obtuvo el dato del número inicial de células filtradas.

Las cajas Petri con las membranas se colocaron en un desecador dentro de la incubadora a 28°C por 5 días. Después del periodo de desecación se intentó recuperar

cuantitativamente la biomasa de las membranas agitándolas en solución salina isotónica (0.8%). Se tomó 1 mL de la suspensión de las células para hacer una serie de diluciones decimales ( $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ ) y realizar la cuenta en placa por el método de extensión superficial. Así se obtuvo el dato del número de células que resistieron el periodo de desecación, es decir el número de quistes.

Con estos datos se calculó el porcentaje de formación de quistes, dividiendo el número de quistes entre el número inicial de células multiplicando por 100.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Características morfológicas

En las Tablas 4, 5 y 6 se presenta la descripción de las características macroscópicas y microscópicas de los cultivos estudiados en este trabajo.

Más adelante en las Figuras 12 y 13 se presentan las fotografías que ilustran las características microscópicas de los cultivos.

**TABLA 4** Características macroscópicas (desarrollo en medio sólido)

<b>Cultivo</b>	<b>Rennie completo</b>	<b>Rennie modificado con queroseno</b>	<b>Rennie completo con amonio</b>
11K	Crecimiento extendido blanco-amarillento opaco con abundante mucosidad	Crecimiento extendido blanco-amarillento opaco sin mucosidad	Crecimiento extendido beige crema sin mucosidad
11KO	Colonia circular de borde entero grande convexa blanca-amarillenta opaca mucoide, con el tiempo adquiere un color café	Colonia circular de borde entero grande convexa menos opaca sin mucosidad	Colonia circular de borde entero grande convexa beige crema sin mucosidad
11KMT	Colonia circular de borde entero grande convexa blanca transparente mucoide	Colonia circular de borde entero más pequeña convexa blanca opaca	Colonia circular de borde entero grande convexa beige crema opaca sin mucosidad
11KP	Colonia puntiforme elevada blanca seca	Colonia puntiforme elevada blanca	Colonia puntiforme elevada beige crema opaca

**TABLA 5** Características macroscópicas (desarrollo en medio sólido)

<b>Cultivo</b>	<b>Rennie completo</b>	<b>Rennie modificado con queroseno</b>	<b>Rennie completo con amonio</b>
12K	Crecimiento extendido opaco con abundante mucosidad	Crecimiento extendido transparente sin mucosidad	Crecimiento extendido blanco opaco sin mucosidad
CS	Colonia circular de borde entero pequeña plana rosa salmón mucoide	Colonia circular de borde entero más pequeña plana con poca coloración	Colonia circular de borde entero pequeña plana rosa salmón mucoide
CAM	Colonia puntiforme convexa amarilla	Colonia puntiforme convexa con poca coloración	Colonia puntiforme convexa amarilla
CB	Colonia circular de borde entero grande convexa blanca transparente con abundante mucosidad	Colonia circular de borde entero más pequeña convexa blanca opaca con menos mucosidad	Colonia circular de borde entero grande convexa blanca opaca mucoide con menos mucosidad

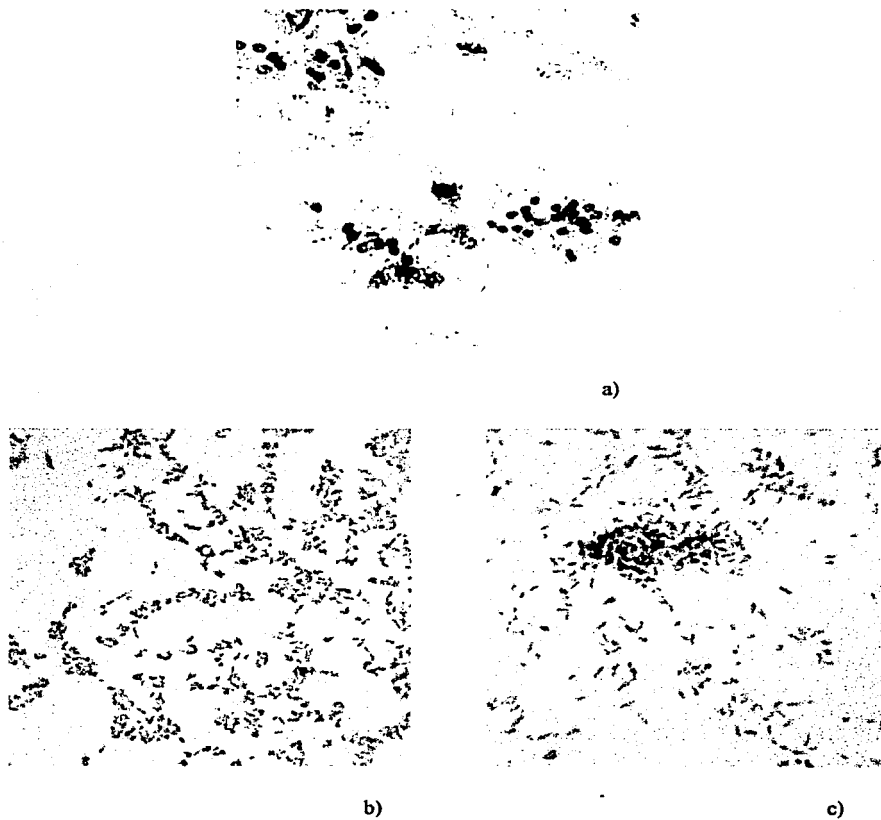
Como se puede observar en la descripción de las características macroscópicas en medio sólido de algunos de los cultivos, el crecimiento en el medio de Rennie completo, es decir en condiciones de fijación de nitrógeno, presenta abundante mucosidad. Este es un mecanismo de protección física de la enzima nitrogenasa en presencia de oxígeno, como se menciona en el Capítulo 2 (Fijación biológica de nitrógeno). Cuando estos cultivos se desarrollan en el medio que contiene una fuente de nitrógeno, es decir en ausencia de fijación de nitrógeno, disminuye la presencia de mucosidad. En el medio que tiene queroseno como fuente de carbono, el desarrollo en todos los casos es menor, el crecimiento es más lento y se pierden algunas de las características observadas en el crecimiento en medio de Rennie completo, por ejemplo la presencia de coloración de algunas cepas.

En medio líquido con queroseno, el crecimiento se adhiere a la pared del matraz. Hay crecimiento en la parte superior del medio de cultivo, formando una película en la superficie.

**TABLA 6** Características microscópicas (Tinción de Gram)

<b>Cultivo</b>	<b>Características</b>
11K	Bacilos grandes, células redondas, bacilos pequeños y cocobacilos pequeños gram negativos
11KO	Presenta pleomorfismo Cultivo joven: Bacilos grandes redondeados gram negativos, algunos en pares Cultivo viejo: Células redondas gram negativas, algunas en pares
11KMT	Bacilos pequeños cortos gram negativos, algunos en pares
11KP	Cocobacilos pequeños gram negativos, algunos en pares y cadenas
12K	Bacilos grandes y bacilos pequeños gram-negativos
CS	Células ovoides o bacilares grandes gram variables en racimos
CAM	Bacilos pequeños cortos gram negativos
CB	Bacilos grandes redondeados gram negativos





**FIGURA 12** Tinción de Gram (aumento 100x).

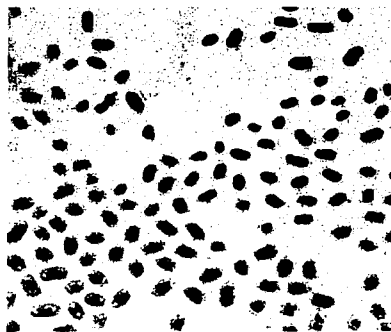
- a) Cultivo mixto 11K 24 horas de incubación en medio Rennie modificado
- b) Cepa 11KMT 72 horas de incubación en medio Rennie modificado
- c) Cepa 11KP 72 horas de incubación en medio Rennie modificado



a)



b)



c)

**FIGURA 13** Tinción de Gram (aumento 100x).

- a) Cepa CS 48 horas de incubación en medio Rennie completo
- b) Cepa CAM 72 horas de incubación en medio Rennie completo
- c) Cepa CB 144 horas de incubación en medio Rennie completo

## 5.2 Desarrollo en condiciones de anaerobiosis

Los resultados de este experimento se resumen en la Tabla 7. El crecimiento en condiciones de anaerobiosis se compara con el crecimiento obtenido en condiciones de aerobiosis.

**TABLA 7** Incubación en condiciones aerobias y anaerobias por 3 días (72 horas)

Cultivo	Incubación en Condiciones	Rennie completo	Rennie completo con amonio	Rennie modificado con queroseno
11K	Aerobias	++++	+++	+++
	Anaerobias	+/-	+/-	+/-
11KO	Aerobias	++++	+++	+++
	Anaerobias	-	-	-
11KMT	Aerobias	+++	++++	+++
	Anaerobias	+/-	+/-	+/-
11KP	Aerobias	+++	+++	+++
	Anaerobias	-	-	-
12K	Aerobias	++++	+++	++
	Anaerobias	+/-	+/-	+/-
CS	Aerobias	+	++	+/-
	Anaerobias	+/-	+/-	+/-
CAM	Aerobias	++	+++	+/-
	Anaerobias	+/-	+/-	+/-
CB	Aerobias	++++	+++	++
	Anaerobias	+/-	+/-	+/-

- no hay crecimiento +/- crecimiento muy escaso + crecimiento escaso

++ poco crecimiento +++ crecimiento regular ++++ crecimiento abundante

Como se puede observar en esta tabla, todas las cepas son aerobias obligadas. Ninguna presentó crecimiento en condiciones de anaerobiosis. El signo +/- se considera como falta de crecimiento, pues el poco desarrollo observado, se puede deber a las condiciones microaerófilicas iniciales mientras se logra la anaerobiosis completa.

En condiciones de anaerobiosis, los diferentes cultivos no son capaces de fijar nitrógeno, y tampoco son capaces de crecer con una fuente de nitrógeno.

El cultivo mixto 11K y la cepa 11KO presentaron el mismo comportamiento en los tres medios ensayados en condiciones aerobias. El mayor desarrollo se da en el medio de Rennie completo, mientras que se observa un menor crecimiento en el medio de Rennie con amonio y el medio con queroseno. Como se ha mencionado en el Capítulo 1, el crecimiento de la cepa 11KO disminuye en presencia de una fuente de nitrógeno, en este caso el cloruro de amonio.

En cambio, la cepa 11KMT presenta mayor desarrollo cuando se adiciona una fuente de nitrógeno, como se ha mencionado anteriormente. El crecimiento en el medio Rennie completo y Rennie modificado es menor.

La cepa 11KP tiene un desarrollo parecido en los tres medios ensayados.

El desarrollo del cultivo mixto 12K se ve favorecido en el medio Rennie completo y disminuye en los otros dos medios empleados durante este experimento. El mismo comportamiento se observa para la cepa CB.

Las cepas CS y CAM presentan poco crecimiento en el medio Rennie completo a los tres días de incubación. El crecimiento de estas tres cepas se ve favorecido por la presencia de una fuente de nitrógeno. No se observa desarrollo con queroseno como fuente de carbono en este tiempo de incubación, es necesario un tiempo de incubación más prolongado para el desarrollo de estas cepas en el medio con queroseno en condiciones aerobias.

### **5.3 Producción de biosurfactantes**

Se determinó el índice de emulsificación de 24 horas. Para cada uno de los cultivos, el inóculo inicial fue igual en el medio de Rennie completo que en el de Rennie modificado con queroseno, por lo que la biomasa obtenida en el medio con queroseno fue mucho menor que en el medio Rennie completo. La prueba se realizó a los tres días (72 horas) de incubación en todos los casos.

En la Tabla 8 y en la Gráfica 1 se observan los resultados obtenidos.

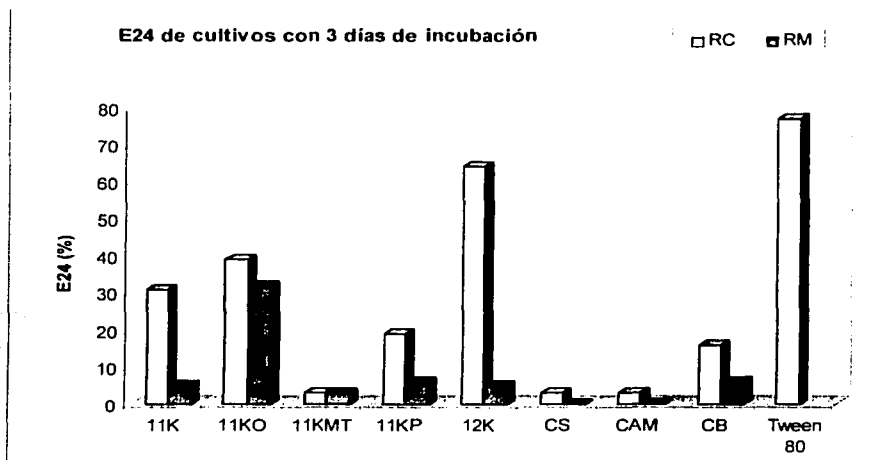
**TABLA 8** Índice de emulsificación de 24 horas (E24) y biomasa obtenida de cultivos con 3 días de incubación

Cultivo	Biomasa (g/L)		E24	
	Rennie Completo	Rennie Modificado	Rennie Completo	Rennie Modificado
11K	3.8	0.7	31%	5%
11KO	9.6	0.9	39%	32%
11KMT	nd	nd	3%	3%
11KP	nd	nd	19%	6%
12K	2.9	0.5	64%	5%
CS	1.6	0.3	3%	0%
CAM	2.3	0.6	3%	0%
CB	6.9	1.1	16%	6%
Control positivo (Tween 80)			77%	

nd = no determinado

El cultivo 12K presentó una emulsión de aspecto homogéneo con ambos medios, mientras que los cultivos 11K, 11KO y CB presentaron una emulsión no homogénea con presencia de burbujas visibles. Cuando el medio empleado fue el de Rennie completo, se observaron grandes burbujas, y con el medio de Rennie modificado las burbujas eran pequeñas.

La biomasa que se obtiene en el medio Rennie completo es mucho mayor que la que se obtiene para el medio Rennie modificado en todos los casos. Esta es una de las posibles razones por la que se obtiene un índice de emulsificación más bajo en el medio Rennie modificado.



**GRÁFICA 1** Índice de emulsificación de 24 horas (E24) de cultivos con 3 días de incubación.

Medio de cultivo: Rennie completo (RC) y Rennie modificado con queroseno (RM)

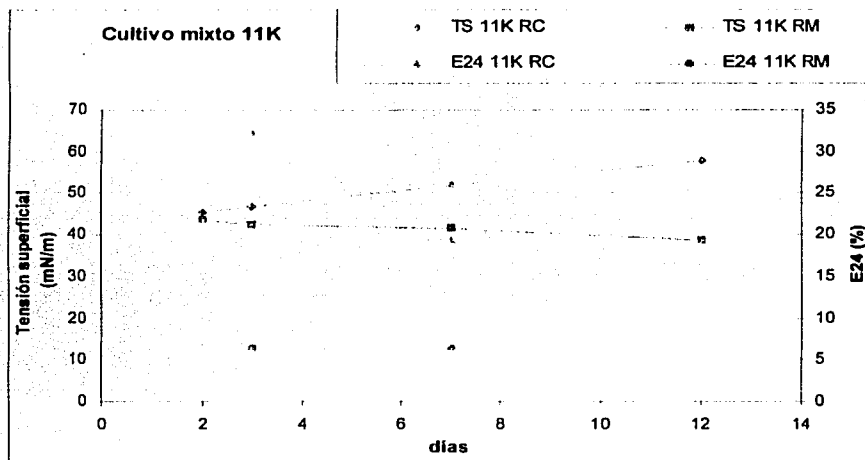
Con esta prueba preliminar se eligieron los cultivos 11K, 11KO, 12K y CB para continuar con los estudios. Se midió la tensión superficial a los 2 o 3 días, a los 7 días, y a los 12 o 14 días de incubación en medio RC y RM. Se reporta el promedio de al menos tres lecturas de tensión superficial, y el valor del blanco de medio sin inocular en cada caso. La prueba de E24 se repitió para estos cultivos a los 3 y 7 días de incubación en medio RC y RM, resultados que no se encuentran en las tablas, solamente en las gráficas. Durante estos experimentos el inóculo inicial en el medio de Rennie modificado con queroseno fue aproximadamente 10 veces mayor que el empleado en el medio de Rennie completo.

Los resultados de estos experimentos se observan en las siguientes tablas y gráficas: Tabla 9 y Gráfica 2 para el cultivo mixto 11K; Tabla 10 y Gráfica 3 para la cepa 11KO; Tabla 11 y Gráfica 4 para el cultivo mixto 12K; Tabla 12 y Gráfica 5 para la cepa CB.

**TABLA 9** Tensión superficial del cultivo mixto 11K

Medio	Día	Inóculo inicial (bact)	Conc. final (bact/mL)	Tensión superficial (mN/m)	Temp. (°C)
Rennie completo	2	$5.0 \cdot 10^8$	$3.1 \cdot 10^9$	$45.4 \pm 0.6$	24.1
	7	$5.0 \cdot 10^8$	$4.5 \cdot 10^9$	$52.1 \pm 1.2$	24.0
	12	$7.4 \cdot 10^8$	$6.2 \cdot 10^9$	$57.7 \pm 1.8$	25.6
Blanco sin inóculo				$43.7 \pm 0.9$	24.1
Rennie modificado	2	$3.3 \cdot 10^9$	$3.7 \cdot 10^8$	$43.6 \pm 1.3$	24.1
	7	$3.3 \cdot 10^9$	$6.9 \cdot 10^8$	$41.4 \pm 2.0$	24.0
	12	$7.4 \cdot 10^9$	nd	$38.6 \pm 1.3$	25.6
Blanco sin inóculo				$44.5 \pm 1.1$	23.8

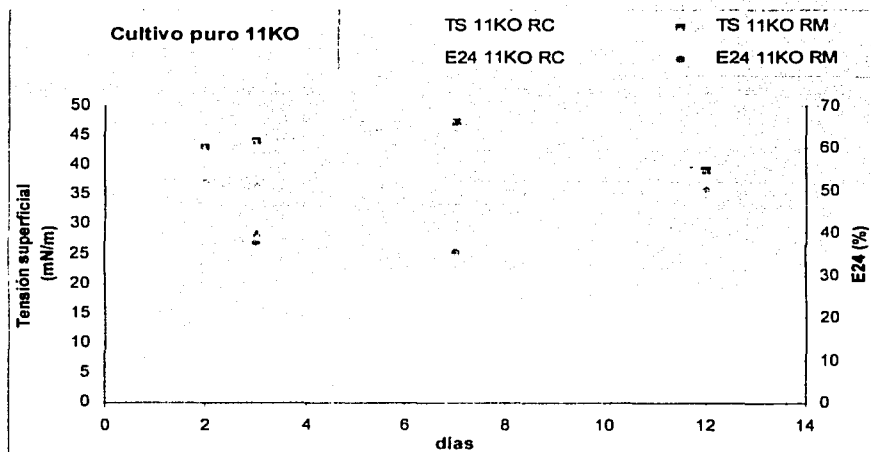
nd = no determinado

**GRÁFICA 2** Tensión superficial (TS) e Índice de emulsificación de 24 horas (E24) a diferentes tiempos de incubación para el cultivo mixto 11K.

Medio de cultivo: Rennie completo (RC) y Rennie modificado con queroseno (RM).

TABLA 10 Tensión superficial de la cepa 11KO

Medio	Día	Inóculo inicial (bact)	Conc. final (bact/mL)	Tensión superficial (mN/m)	Temp. (°C)
Rennie completo	2	$5.0 \cdot 10^8$	$4.3 \cdot 10^9$	$37.2 \pm 1.4$	24.4
	7	$5.0 \cdot 10^8$	$8.3 \cdot 10^9$	$33.0 \pm 1.1$	24.0
	12	$6.4 \cdot 10^8$	$1.5 \cdot 10^{10}$	$35.8 \pm 1.4$	25.6
Blanco sin inóculo				$43.7 \pm 0.9$	24.1
Rennie modificado	2	$7.6 \cdot 10^9$	$3.9 \cdot 10^8$	$42.9 \pm 1.2$	23.8
	7	$7.6 \cdot 10^9$	$5.8 \cdot 10^8$	$47.2 \pm 1.0$	23.8
	12	$6.4 \cdot 10^9$	$8.1 \cdot 10^8$	$39.3 \pm 1.4$	25.9
Blanco sin inóculo				$44.5 \pm 1.1$	23.8



**GRÁFICA 3** Tensión superficial (TS) e Índice de emulsificación de 24 horas (E24) a diferentes tiempos de incubación para la cepa 11KO.

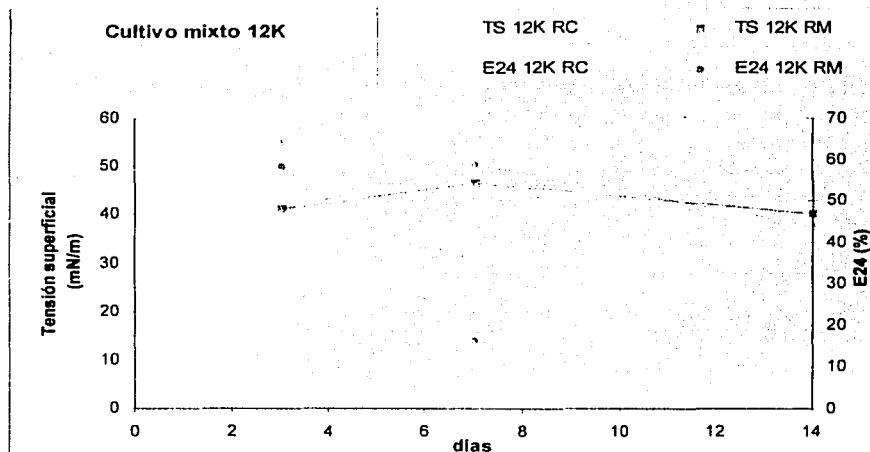
Medio de cultivo: Rennie completo (RC) y Rennie modificado con queroseno (RM).



TABLA 11 Tensión superficial del cultivo mixto 12K

Medio	Día	Inóculo inicial (bact)	Conc. final (bact/mL)	Tensión superficial (mN/m)	Temp. (°C)
Rennie completo	3	$6.9 \cdot 10^8$	$2.5 \cdot 10^9$	$41.0 \pm 1.6$	23.1
	7	$6.9 \cdot 10^8$	$2.2 \cdot 10^9$	$50.2 \pm 1.8$	23.4
	14	$4.2 \cdot 10^8$	$5.5 \cdot 10^9$	$37.5 \pm 0.7$	25.6
Blanco sin inóculo				$45.5 \pm 2.6$	25.3
Rennie modificado	3	$6.9 \cdot 10^9$	$5.7 \cdot 10^8$	$41.1 \pm 0.8$	23.4
	7	$6.9 \cdot 10^9$	$8.5 \cdot 10^8$	$46.5 \pm 0.8$	23.8
	14	$4.2 \cdot 10^9$	nd	$40.2 \pm 1.8$	24.4
Blanco sin inóculo				$47.8 \pm 1.2$	25.6

nd = no determinado

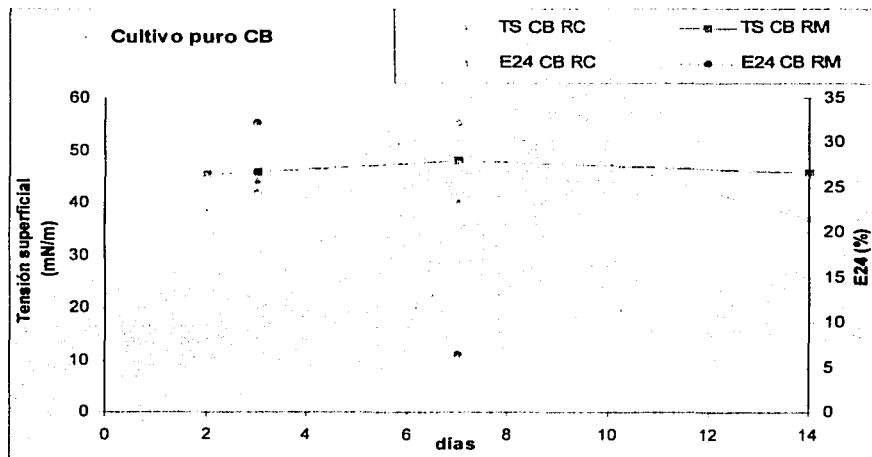


GRÁFICA 4 Tensión superficial (TS) e Índice de emulsificación de 24 horas (E24) a diferentes tiempos de incubación para el cultivo mixto 12K.

Medio de cultivo: Rennie completo (RC) y Rennie modificado con queroseno (RM).

TABLA 12 Tensión superficial de la cepa CB

Medio	Día	Inóculo inicial (bact)	Conc. final (bact/mL)	Tensión superficial (mN/m)	Temp. (°C)
Rennie completo	2	$5.0 \cdot 10^8$	$9.1 \cdot 10^8$	$38.2 \pm 1.6$	24.4
	7	$1.2 \cdot 10^8$	$4.2 \cdot 10^8$	$55.3 \pm 1.5$	23.8
	14	$1.2 \cdot 10^8$	$2.0 \cdot 10^8$	$36.6 \pm 1.8$	25.3
Blanco sin inóculo				$45.5 \pm 2.6$	25.3
Rennie modificado	2	$5.0 \cdot 10^9$	$7.7 \cdot 10^9$	$45.4 \pm 1.4$	24.4
	7	$1.2 \cdot 10^9$	$4.2 \cdot 10^9$	$47.9 \pm 0.7$	24.1
	14	$1.2 \cdot 10^9$	$2.2 \cdot 10^9$	$45.6 \pm 1.2$	24.1
Blanco sin inóculo				$47.8 \pm 1.2$	25.6



GRÁFICA 5 Tensión superficial (TS) e índice de emulsificación de 24 horas (E24) a diferentes tiempos de incubación para la cepa CB.

Medio de cultivo: Rennie completo (RC) y Rennie modificado con queroseno (RM).

Los controles empleados durante la medición de la tensión superficial se indican en la Tabla 13.

**TABLA 13** Controles empleados en la medición de la tensión superficial

Controles	Tensión superficial (mN/m)	Temp. (°C)
Agua destilada	53.0 ± 0.8	24.7
Tween 80 al 0.1%	32.4 ± 1.0	24.1

Como criterio para cuantificar la producción de biosurfactantes se toma el aumento en el E24 y la disminución de la tensión superficial del medio de cultivo. En general se puede observar esta relación: cuando aumenta el índice de emulsificación, disminuye la tensión superficial. En las gráficas que se han presentado, se observa la tendencia en la producción de biosurfactantes, que permite hacer algunas suposiciones.

En el caso del cultivo mixto 11K (Gráfica 2), se observa la mayor producción de biosurfactante al inicio de la incubación en el medio Rennie completo. El E24 a los tres días es muy alto; conforme pasa el tiempo de incubación, la tensión superficial aumenta, mientras que el E24 disminuye, lo que indica menor agente tensoactivo. Todos los valores de tensión superficial en este caso se encuentran por arriba del valor del blanco (medio de cultivo). En el medio con queroseno, el E24 permanece constante en la primera semana de incubación, igualmente la tensión superficial tampoco varía mucho en este lapso de tiempo. Se observa una disminución del valor de tensión superficial al final de la incubación (12 días). Los valores de tensión superficial para este medio se encuentran por debajo del valor del blanco.

El cultivo 11KO en el medio RC presenta un aumento en el E24 junto con una disminución de la tensión superficial a los 7 días. El comportamiento en el medio con queroseno es al contrario: a los 7 días de incubación disminuye el E24 y aumenta la tensión superficial por arriba del valor del blanco. Al final de la incubación (12 días) la tensión superficial disminuye nuevamente por debajo del valor del blanco de medio.

El cultivo mixto 12K presenta un comportamiento muy parecido en ambos medios. Al principio de la incubación (3 días), se observa un E24 alto y una tensión superficial baja en ambos medios. A los 7 días se encuentra una menor cantidad de biosurfactante en ambos medios, determinado por la disminución del E24 y el aumento en la tensión superficial, que en el caso del medio RC es mayor que el valor del blanco de medio. Al

final de la incubación (14 días), ocurre nuevamente una disminución en la tensión superficial por debajo de los valores promedio de los blancos de medio correspondientes.

El cultivo CB presenta un comportamiento similar al descrito para el cultivo 12K. A los 7 días de incubación, se observa una disminución en el E24 junto con un aumento en la tensión superficial en ambos medio, que en el caso del medio de Rennie completo es mayor que el valor del blanco. El cambio en la tensión superficial en el medio de Rennie modificado es poco notorio, y los valores están muy cercanos al valor del blanco de medio.

### **5.4 Estudio de la formación de quistes**

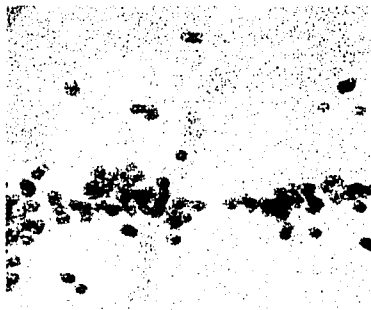
Inicialmente se realizó el experimento empleando una cepa de *Azotobacter vinelandii* desarrollada en medio Rennie completo con sacarosa (omitiendo el manitol) y en medio Rennie modificado con butanol para montar las técnicas. Con esta cepa de *Azotobacter* se verificó que el ensayo de resistencia a la desecación fuera desarrollado correctamente, y también se observó la morfología que presentan los quistes al microscopio, para poder comparar éstos con los quistes obtenidos en los experimentos siguientes.

Posteriormente se realizó el experimento con la cepa 11KO, identificada presuntivamente como *Azotobacter nigricans*, para verificar la posible formación de quistes. En especial se estudió la influencia del queroseno como fuente de carbono en este proceso para verificar las observaciones hechas previamente por García Esquivel (2001).

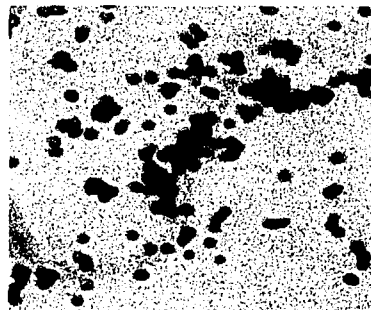
Se estudió la formación de quistes de la cepa 11KO en tres medios líquidos diferentes: Rennie completo (solamente con sacarosa, omitiendo el manitol), Rennie modificado con butanol y Rennie modificado con queroseno. Se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 14):

TABLA 14 Porcentaje de formación de quistes

	RC-sacarosa	RM-butanol	RM-queroseno Experimento 1	RM-queroseno Experimento 2
Cuenta inicial	$89 \cdot 10^8$ UFC	$26 \cdot 10^8$ UFC	$54 \cdot 10^5$ UFC	$85 \cdot 10^4$ UFC
Cuenta final	$63 \cdot 10^8$ UFC	$27 \cdot 10^8$ UFC	$8 \cdot 10^4$ UFC	$60 \cdot 10^2$ UFC
Porcentaje de formación de quistes	70.8%	103.8%	1.5%	0.7%



a)

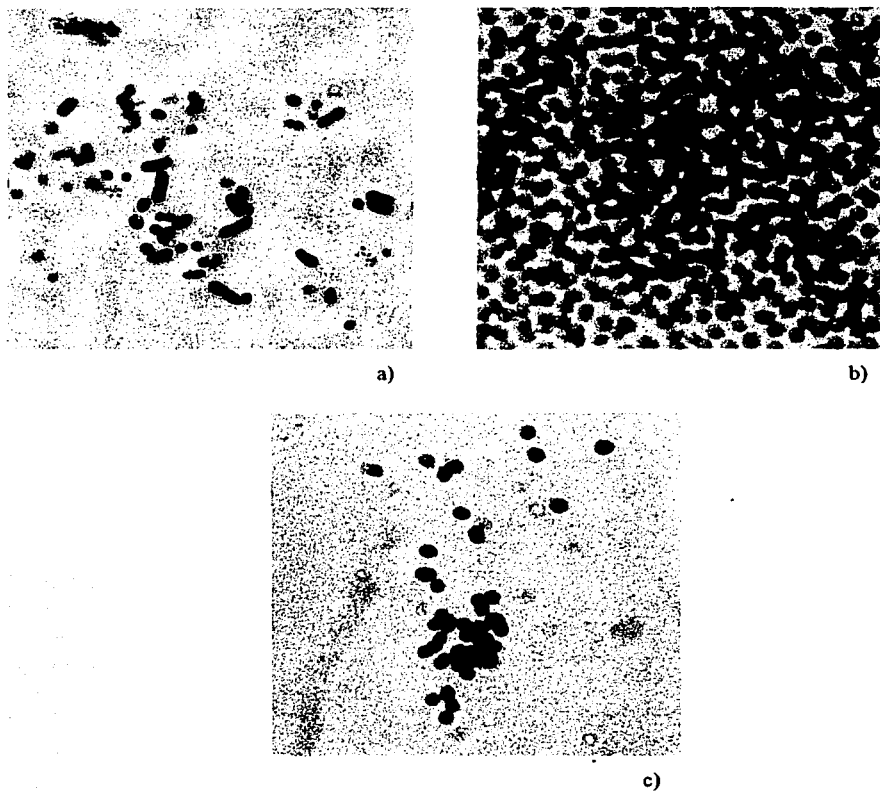


b)

FIGURA 14 Tinción de Gram de la cepa *A. vinelandii* (aumento 100x).

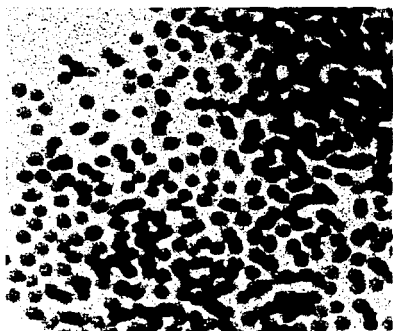
a) 120 horas de incubación en medio RC-sacarosa

b) 120 horas de incubación en medio RM-butanol

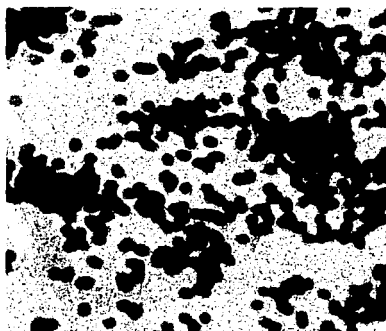


**FIGURA 15** Tinción de Gram de la cepa 11KO (aumento 100x).

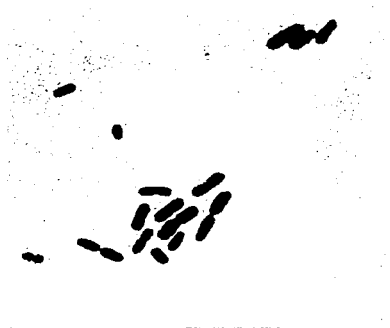
- a) 120 horas de incubación en medio RC-sacarosa
- b) 120 horas de incubación en medio RM-butanol
- c) 120 horas de incubación en medio RM-queroseno



a)



b)



c)

**FIGURA 16** Tinción de Gram de la cepa 11KO (aumento 100x).

a) 168 horas de incubación en medio RM-butanol

b) 168 horas de incubación en medio RM-queroseno

c) cuenta final de células, 30 horas de incubación en medio RC

En la Figura 14 se observan las fotografías de la tinción de Gram de la cepa *Azotobacter vinelandii*, con la que se iniciaron los estudios de enquistamiento. Las fotografías corresponden a 5 días de incubación en medio RC-sacarosa (a) y en medio RM-butanol (b). En ambas fotografías se observan células redondas de tamaño uniforme, que presentan un patrón de tinción característico: la coloración es más intensa en el centro de la célula y menos intensa en la periferia, por lo que se considera un cultivo sincrónico de quistes.

En la Figura 15 se muestran las fotografías de la cepa estudiada 11KO en diferentes medios de cultivo al mismo tiempo de incubación (5 días). Esta cepa se desarrolló en tres medios de cultivo diferentes: a) RC-sacarosa, b) RM-butanol y c) RM-queroseno. En la fotografía b, se observa la tinción de Gram de la cepa 11KO cuando se induce el enquistamiento con butanol. Se puede observar que las células presentan las características microscópicas mencionadas anteriormente para *A. vinelandii*, por lo que se comprueba la obtención de un cultivo sincrónico de quistes maduros en este medio de cultivo. No sucede lo mismo con los otros dos medios de cultivo. Cuando se emplea RC-sacarosa (fotografía a) se observa una mezcla de formas celulares, desde bacilos hasta células redondas de apariencia desigual. En la fotografía c, que corresponde a la tinción de Gram del medio RM-queroseno, se presentan células ovoides y redondas, que no concuerdan con las características mencionadas para los quistes maduros.

Las fotografías de la Figura 16 (a y b) muestran la tinción de Gram de la cepa 11KO a los 7 días de incubación, tiempo en el que se filtran las células para someterlas al periodo de desecación. La fotografía a) presenta las células incubadas en el medio RM-butanol, donde se observa un cultivo sincrónico de quistes maduros, que resisten el periodo de desecación según los resultados que aparecen en la Tabla 14. En la fotografía b) se observa la tinción de Gram del medio RM-queroseno, y según las características microscópicas antes mencionadas, en este caso no se obtiene un cultivo sincrónico de quistes maduros. En los resultados presentados en la Tabla 14 se observa que en este medio de cultivo hay una formación mínima de quistes maduros resistentes a la desecación. En la fotografía c) de esta Figura 16 se observan los bacilos que se obtienen al hacer la cuenta final de células, es decir cuando germinan los quistes que resistieron el periodo de desecación.



## 6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Como primer objetivo de este trabajo figura el estudio de la influencia del oxígeno en la capacidad de fijación de nitrógeno de los diferentes cultivos. Como se ha mencionado en el capítulo anterior (Resultados, Tabla 7), todos los cultivos están formados por bacterias aerobias obligadas. Ninguna de las cepas o de los cultivos mixtos presentaron crecimiento en condiciones de anaerobiosis y no son capaces de fijar nitrógeno en estas condiciones. Por esta razón todas las cepas se clasifican dentro del grupo de bacterias libres fijadoras de nitrógeno heterótrofas aerobias (ver Tabla 2). Las cepas 11KO y 11KMT se han identificado presuntivamente como *Azotobacter nigricans* y *Derxia gummosa* respectivamente; las demás cepas se deben identificar tomando como base la característica de ser aerobias obligadas y las características morfológicas mencionadas en el capítulo anterior (Resultados, Tablas 4, 5 y 6).

Todos los cultivos son capaces de fijar nitrógeno atmosférico cuando están en presencia de queroseno como única fuente de carbono y energía en condiciones aerobias, es decir que el metabolismo de los hidrocarburos constituyentes del queroseno aporta la energía suficiente para llevar a cabo este proceso. Como se ha expuesto en el Capítulo 3, la degradación aerobia de los diferentes hidrocarburos da por resultado productos que se incorporan al metabolismo energético de la célula.

En cuanto a la producción de biosurfactantes durante la degradación del queroseno, Colombo, Correa y Zachia (2000) describen al Índice de emulsificación de 24 horas (E24) como una prueba preliminar ampliamente usada para detectar la producción de biosurfactantes; los autores reportan los resultados de varias cepas aisladas de sitios contaminados con hidrocarburos del petróleo, siendo 58% el mayor valor de E24 obtenido. Cooper y Goldenberg (1987) al estudiar la producción de biosurfactantes de dos cepas del género *Bacillus* en un medio con sacarosa, es decir un sustrato soluble en agua, detectaron la presencia de bioemulsificante, ya que el medio de cultivo después de dos días de incubación presentaba un Índice de emulsificación del 60% y una reducción en la tensión superficial a 28 mN/m.

Iqbal, Khalid y Malik (1995) reportaron la obtención de una mutante de *Pseudomonas aeruginosa* hiperproductora de biosurfactante; ellos cuantificaron la producción de biosurfactante en un medio con n-heptadecano tomando en cuenta el

aumento en el índice de emulsificación y la disminución en la tensión superficial. Estos autores reportan un índice de emulsificación de 54%, mientras la tensión superficial se reduce a 29 mN/m.

Durante el presente trabajo se realizó la prueba preliminar del índice de emulsificación, para elegir los cultivos que presentaran mayor producción de biosurfactante (Resultados, Tabla 8 y Gráfica 1). Se obtuvieron mejores resultados en el medio Rennie completo que en el medio con queroseno. Como se ha mencionado, la producción de biosurfactantes se puede observar tanto con sustratos solubles en agua como con sustratos insolubles. En este caso, una de las posibles razones por las cuales se obtiene un mejor resultado en el medio RC, es porque la biomasa es mucho mayor que en el medio RM. Cuando se repitió esta prueba para los cuatro cultivos elegidos para continuar los estudios (cultivos mixtos 11K y 12K, cepas 11KO y CB), se empleó un inóculo 10 veces mayor para el medio Rennie modificado, y se observó un mejor resultado para este medio de cultivo a los tres días de incubación. El cultivo mixto 12K es el que presenta el mayor índice de emulsificación, con un 64% en el medio Rennie completo. En el medio con queroseno se obtuvo primero un 5%, pero cuando se aumentó el inóculo este valor subió hasta 58% (Resultados, Gráfica 4). Estos valores se consideran muy buenos comparando con los reportes arriba mencionados. En el primer experimento con la cepa CB, se obtuvo un E24 en el medio con queroseno de 6%, mientras que aumentando el inóculo en este medio de cultivo, se eleva el valor a 32% (Resultados, Gráfica 5). La cepa 11KO presenta 39% de emulsificación en el medio Rennie completo y 32% con queroseno, a pesar de que la biomasa obtenida en el medio con queroseno es 10 veces menor a la del medio RC (Resultados, Tabla 8). En este caso, la diferencia en la biomasa obtenida no fue importante para el resultado del índice de emulsificación, pues cuando se repitió el experimento con un mayor inóculo en el medio RM, los valores fueron 40% para RC y 38% para RM (Resultados, Gráfica 3), los cuales no son significativamente mayores.

Oberbremer y Müller-Hurtig (1989) describen un experimento en el cual estudian la degradación aerobia de una mezcla conocida de hidrocarburos (alcano lineal, alcano ramificado, alqueno lineal, cicloalcano, aromático monocíclico y policíclico), realizada por una población microbiana aislada de suelo. Reportan los datos de concentración de los diferentes hidrocarburos, tensión interfacial y consumo de oxígeno a diferentes tiempos de incubación. En este experimento se observa un periodo de adaptación, seguido de una

primera fase de degradación, otro periodo de adaptación y finalmente una segunda fase de degradación. Las fases de degradación se caracterizan por el consumo de oxígeno. La primera fase de degradación consiste en la eliminación del hidrocarburo más soluble en agua (naftaleno), que no requiere de la presencia de un biosurfactante, por lo que la tensión interfacial permanece constante. En la segunda fase de degradación se oxidan los hidrocarburos insolubles en agua, por lo que se observa una disminución en la tensión interfacial por la producción de biosurfactante.

García Esquivel (2001) y Pérez Vargas (2001) han realizado la cinética de remoción de queroseno de los diferentes cultivos empleados en este trabajo, midiendo hidrocarburos totales. Se ha observado que la mayor actividad degradadora se da en las primeras 24 horas de incubación. La producción de biosurfactantes no se estudió durante estas primeras horas de incubación, sino que se cuantificó en un periodo de tiempo más largo. Los estudios de producción de biosurfactantes realizados en este trabajo, no detallan la cinética de este proceso, sino que presentan tendencias que permiten acercarse al conocimiento del proceso de degradación de queroseno llevado a cabo por los cultivos.

El cultivo mixto 11K presenta una producción de biosurfactantes constante durante el tiempo de incubación con queroseno como fuente de carbono, como lo indican las mediciones del Índice de emulsificación de 24 horas (E24) y la tensión superficial (Tabla 9 y Gráfica 2). Al final de la incubación (12 días) se observa una pequeña disminución de la tensión superficial, la cual se podría deber a una acumulación de biosurfactante en el medio de cultivo. La oxidación de los hidrocarburos del queroseno por este cultivo parece ser continua, sin presentar periodos de adaptación. Se sabe que este cultivo mixto ha degradado 70% del queroseno a los 8 días de incubación (García Esquivel, 2001), pero se puede observar por la producción de biosurfactante, que la oxidación de los hidrocarburos más persistentes continúa después de este tiempo de incubación.

El comportamiento de la tensión superficial que presenta la cepa 11KO (Tabla 10 y Gráfica 3) indica que a los 2 días de incubación en el medio con queroseno, se encuentra en una fase de degradación, seguida de un periodo de adaptación a los 7 días de incubación. Se sabe que esta cepa ha degradado 78% del queroseno a los 8 días de incubación. (García Esquivel, 2001) Así es que en la primera fase de degradación se lleva a cabo la oxidación de la mayor parte de los hidrocarburos. Después de un periodo de adaptación observado a los 7 días de incubación, se presenta otra fase de degradación, en la cual son oxidados los hidrocarburos más persistentes.

Como se ha mencionado anteriormente, varias características que presenta el cultivo mixto 11K se deben a la cepa 11KO, que predomina en el cultivo. Pero en este caso, el comportamiento de la tensión superficial en el medio de cultivo, ya sea Rennie modificado con queroseno o Rennie completo, del cultivo 11K y de la cepa 11KO es diferente. Así también son diferentes los resultados obtenidos con el índice de emulsificación para estos dos cultivos.

El cultivo mixto 12K se encuentra en una fase de degradación a los 3 días de incubación en el medio Rennie modificado, pues se observa un valor bajo de tensión superficial y un valor alto de E24. Posiblemente, durante este primer periodo de degradación, se metabolizan compuestos como el dodecano, hidrocarburo que puede ser utilizado como única fuente de carbono por el cultivo mixto 12K. A los 7 días de incubación se presenta un periodo de adaptación, en el cual sube la tensión superficial y baja el E24. Al final de la incubación se observa nuevamente la producción de biosurfactantes para degradar hidrocarburos más persistentes, como el xileno, que puede también ser utilizado por este cultivo mixto como única fuente de carbono. A los trece días de incubación el cultivo mixto 12K ha degradado 75% de los hidrocarburos.

Los cambios en la tensión superficial durante la incubación de la cepa CB en medio con queroseno, no son muy evidentes. En cambio sí se observa la diferencia en la producción de biosurfactantes con los valores obtenidos de E24. A los tres días de incubación se obtiene un valor alto de E24, indicando una fase de degradación. A los 7 días de incubación se reduce el E24, posiblemente por un periodo de adaptación.

Las características que presenta el cultivo mixto 12K son muy diferentes a las de sus cepas constituyentes; no hay una cepa que predomine. Esto es claro al observar los resultados del E24 (Resultados, Tabla 8 y Gráfica 1), los valores obtenidos para el cultivo mixto son mucho mayores que los que se obtienen para las cepas aisladas. El crecimiento es también mucho más abundante para el cultivo mixto que para las cepas aisladas, así como el porcentaje de remoción de queroseno y la fijación de nitrógeno son mucho mayores. Por estas razones, se podría considerar que el cultivo 12K funciona como un consorcio, donde las cepas constituyentes presentan interacciones benéficas que resultan en un aumento de la degradación de queroseno.

El género *Azotobacter* se caracteriza por presentar un proceso de diferenciación celular: el enquistamiento. Tomando como base esta característica, la cepa 11KO se ha identificado como una especie de este género, y durante el desarrollo de este trabajo se ha estudiado este proceso.

En 1962, Socolofsky y Wyss describen el ensayo de resistencia a la desecación como un método para distinguir entre quistes y células vegetativas de la bacteria *Azotobacter vinelandii*. Este método es ampliamente usado en los estudios del proceso de enquistamiento, que se observa ya sea después del crecimiento exponencial o por inducción con agentes químicos (butanol,  $\beta$ -hidroxibutirato o crotonato). Durante el proceso de diferenciación celular, inducido específicamente por estos compuestos, se observa una secuencia metabólica ordenada, en la que se desactiva el metabolismo de carbohidratos, mientras se activa el de lípidos. (Sadoff, Berke y Loperfido, 1971) (Hitchins y Sadoff, 1973)

Durante el desarrollo de los estudios sobre enquistamiento con la cepa 11KO del género *Azotobacter*, se demostró que el butanol es un inductor de este proceso, que resulta en un cultivo sincrónico de quistes (Figura 15 b y Figura 16 a). En menor grado se obtienen quistes cuando el medio contiene una fuente de carbono convencional, como la sacarosa, pero no se observa un cultivo sincrónico (Figura 15 a). El butanol induce una secuencia metabólica, que resulta en la diferenciación celular de toda la población, es decir la obtención de 100% de quistes maduros, como se observa en la Tabla 14. El queroseno es una mezcla de diferentes tipos de hidrocarburos, contiene una variedad de compuestos orgánicos diferentes. Cuando ciertos compuestos del queroseno son metabolizados, se puede obtener como producto alguno de los inductores antes mencionados; por ejemplo, el butano al ser oxidado produce butanol. Sin embargo estos productos se encuentran en una muy baja proporción, por lo que se observa una notable disminución de la formación de quistes maduros resistentes a la desecación con queroseno como única fuente de carbono, como se muestra en la Tabla 14. Este hecho no es tan aparente si se observa el cultivo al microscopio óptico (Figura 15 c y Figura 16 b). En los frotis teñidos al Gram de este cultivo, se observan células redondas, que se podrían confundir con quistes. Por lo anterior se demuestra en este trabajo la conveniencia de emplear el método de resistencia a la desecación para distinguir con seguridad a los quistes maduros, ya que por medio de la observación microscópica no se puede hacer esta diferenciación con exactitud.

Este trabajo está incluido en un proyecto más amplio, cuyo objetivo es conocer los aspectos fisiológicos de las BLFN aisladas de la rizósfera de plantas de frijol para estudiar su posible aplicación en procesos de fitorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos.

Tomando como base la propuesta de Siciliano y Germida (1998) y Onwurah (1999) acerca del uso de bacterias seleccionadas por su actividad degradadora como inóculo en la rizósfera en procesos de fitorremediación, los cultivos estudiados durante este trabajo tienen las siguientes ventajas: son capaces de enriquecer el suelo con compuestos nitrogenados gracias a la fijación de nitrógeno atmosférico, y presentan la capacidad degradadora necesaria para remediar el suelo que contiene hidrocarburos. Una ventaja adicional de varios de los cultivos es la producción de biosurfactantes, que aumentan la biodisponibilidad de compuestos hidrofóbicos.

## CONCLUSIONES

- Todos los cultivos estudiados en este trabajo, cultivos mixtos 11K, 12K y las cepas que los constituyen, pertenecen al grupo de las bacterias libres fijadoras de nitrógeno (BLFN) heterótrofas aerobias obligadas.
- Todos los cultivos son capaces de fijar nitrógeno atmosférico cuando están en presencia de queroseno como única fuente de carbono y energía en condiciones aerobias.
- La producción de materiales emulsificantes es diferente para cada uno de los cultivos estudiados durante este trabajo, como lo indica el ensayo del índice de emulsificación de 24 horas (E24).
- Con el cultivo mixto 12K se observa el mejor resultado para la prueba de E24; los cultivos 11K, 11KO, 11KP y CB presentan un índice medio, y por último los cultivos 11KMT, CS y CA demuestran una pobre producción de biosurfactantes.
- La biomasa presente en cada medio tiene una diferente influencia sobre la producción de biosurfactantes.
- Las variaciones en la tensión superficial de los cultivos permiten observar algunas tendencias de la producción de biosurfactantes durante la incubación.
- Los cultivos mixtos 11K y 12K y las cepas 11KO y CB son capaces de reducir la tensión superficial en ambos medios de cultivo (RC y RM).

- Se observó que existe la producción de biosurfactantes en diferentes grados, pero faltaría estudiar este fenómeno con más detalle para conocer la naturaleza química de estos compuestos tensoactivos y la cinética de producción durante la degradación de los hidrocarburos y cuando se emplea un sustrato soluble.
- La cepa 11KO, como miembro del género *Azotobacter*, lleva a cabo el proceso de enquistamiento inducido por el butanol, para dar lugar a un cultivo sincrónico de quistes maduros.
- Se obtienen quistes maduros en menor grado con sacarosa como fuente de carbono. La formación de quistes maduros es muy pobre cuando se emplea queroseno como fuente de carbono y energía.
- En las observaciones microscópicas de la cepa 11KO se presentan varias formas celulares (pleomorfismo). Se recomienda estudiar con más detalle el ciclo de vida de esta bacteria y las características fisiológicas que se modifican en las diferentes etapas de este ciclo, ya que se encuentran muy pocos reportes en la literatura al respecto.



---

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Alexander M. (1999) Biodegradation and Bioremediation, Academic Press, 2<sup>o</sup> ed., USA.
2. Anderson T.A., Guthrie E.A., Walton B.T. (1993) Bioremediation in the rhizosphere, *Environ. Sci. Technol.*, **27**: 2630-6.
3. Anderson T.A., Coats J.R. (eds.) (1994) Bioremediation through rhizosphere technology, ACS Symposium Series 563, American Chemical Society, USA.
4. Atlas R., Bartha R. (1997) Microbial Ecology, Fundamentals and Applications, Benjamin/Cummings Publishing Company, 4<sup>o</sup> ed., USA.
5. Baker K.H., Herson D.S. (eds.) (1994) Bioremediation, McGraw Hill, USA.
6. Campos M. E., Martínez-Salazar J.M., Lloret L., Moreno S., Nuñez C., Espín G., Soberón-Chávez G. (1996) Characterization of the Gene Coding for GDP-Mannose Dehydrogenase (*alg D*) from *Azotobacter vinelandii*, *J. Bacteriol.*, **178**(7): 1793-99.
7. Colombo Fleck L, Correa Bicca F., Zachia Ayub M.A. (2000) Physiological aspects of hydrocarbon emulsification, metal resistance and DNA profile of biodegrading bacteria isolated from oil polluted sites, *Biotechnol. Lett.*, **22**: 285-9.
8. Cooper D.G., Goldenberg B.G. (1987) Surface-active agents from two *Bacillus* species, *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**(2): 224-9.
9. Cork D.J., Krueger J.P. (1991) Microbial transformations of herbicides and pesticides, *Adv. Appl. Microbiol.*, **36**: 1-65.
10. Desai J.D., Banat I.M. (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential, *Microb. Mol. Biol. Rev.*, **61**(1): 47-64.
11. Döbereiner, Burns, Hollaender (1978) Limitations and Potentials for Biological Nitrogen Fixation in the Tropics, Plenum Press, USA
12. Ferguson S.J. (1998) Nitrogen cycle enzymology, *Curr. Opinion Chem. Biol.*, **2**: 182-193.
13. Ferrera Cerrato R., Pérez Moreno J. (eds.) (1995) Agromicrobiología, elemento útil en la agricultura sustentable, Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Montecillo, Edo. De Mexico.
14. García Esquivel G. (2001) Características fisiológicas y bioquímicas de la biodegradación de queroseno y fijación de nitrógeno por un cultivo aislado de la rizósfera, Tesis Maestría en Ciencias, CINVESTAV.
15. Haahtela K., Kari K., Sundman V. (1983) Nitrogenase activity (Acetylene Reduction) of Root-Associated, Cold Climate *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Klebsiella* and *Pseudomonas* Species During Growth on Various Carbon Sources and at Various

---

Partial Pressures of Oxygen, *Appl. Environ. Microbiol.* **45**(2): 563-70.

16. Hernández Acosta E. (1997) Influencia de un complejo de hidrocarburos en poblaciones rizosféricas y en el crecimiento del frijol variedad Michoacan 12-A3, Tesis Maestría en Ciencias, Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas.
  17. Hitchins V.M., Sadoff H.L. (1973) Sequential metabolic events during encystment of *Azotobacter vinelandii*, *J. Bacteriol.* **113**: 1273-9.
  18. Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T. (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9° ed., Williams & Wilkins, USA.
  19. Iqbal S., Khalid Z.M., Malik K.A. (1995), Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*, *Lett. Appl. Microbiol.*, **21**: 176-179
  20. Kosaric N. (ed.) (1993) *Biosurfactants: production, properties, applications*, Marcel Dekker Inc., USA.
  21. Legocki, A., Bothe, H., Pühler, A. (eds.) (1997) *Biological fixation of nitrogen for ecology and sustainable agriculture*, NATO ASI Series Vol. G39, Springer Verlag, Alemania.
  22. Lin L.P., Sadoff H.L. (1969) Chemical composition of *Azotobacter vinelandii* cysts, *J. Bacteriol.* **100**: 480-6.
  23. Lin S.C. (1996) Biosurfactants: Recent Advances, *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **66**: 109-20
  24. Lynch J.M. (ed.) (1990) *The rhizosphere*, John Wiley & Sons, England.
  25. Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. (1999) *Brock Biología de los microorganismos*, Prentice Hall Iberia, 8° ed. revisada, España.
  26. Margaritis A., Zajic J. E., Gerson D. F. (1979) Production and surface-active properties of microbial surfactants, *Biotechnol. Bioeng.* **21**: 1151-1162.
  27. Núñez C., Moreno S., Soberón Chávez G., Espín G. (1999) The *Azotobacter vinelandii* response regulator AlgR is essential for cyst formation, *J. Bacteriol.* **181**: 141-8
  28. Oberbremer A., Müller-Hurtig R. (1989) Aerobic stepwise hydrocarbon degradation and formation of biosurfactants by an original soil population in a stirred reactor, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 582-586.
  29. Onwurah I.N.E. (1999) Role of diazotrophic bacteria in the bioremediation of crude oil-polluted soil, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **74**: 957-64.
  30. Pérez Vargas J. (2001) Degradación microbiana de queroseno, Tesis Doctorado en Ciencias, CINVESTAV.
-