

**IMPLEMENTACIÓN DE DIFERENTES TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA
DETERMINACIÓN DE BIOMASA BACTERIANA DE CEPAS *Pseudomonas
putida* BIODEGRADADORAS DE FENOL**

LEIDY ROCÍO NIÑO CAMACHO

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

2009

**IMPLEMENTACIÓN DE DIFERENTES TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA
DETERMINACIÓN DE BIOMASA BACTERIANA DE CEPAS *Pseudomonas
putida* BIODEGRADADORAS DE FENOL**

LEIDY ROCÍO NIÑO CAMACHO

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Química

Director

**Dr. Rodrigo Torres
Bioquímico, Ph.D.**

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Grupo de Investigación en Bioquímica e Ingeniería de Proteínas (GIBIP)

2009

DEDICATORIA

A Dios

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Al profesor Rodrigo Torres, por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su dirección y orientación en el desarrollo del trabajo de investigación.

Especiales agradecimientos a la Doctora Claudia Ortiz, por sus valiosos aportes y colaboración en la realización del proyecto.

Al igual que a la Bacterióloga Anyela Yuliana Lozano, por la gran colaboración en la parte experimental del proyecto.

A mis compañeros de laboratorio por el excelente ambiente de trabajo.

A mis amigos y compañeros Sandra, Mayra, Andrea, Juan Carlos y todos los que de alguna forma me brindaron su compañía en esta etapa de vida.

A Asdrubal por su amor y compañía.

TABLA DE CONTENIDO

	Pg.
INTRODUCCIÓN.....	1
1. MARCO TEÓRICO.....	2
1.1 El Fenol.....	2
1.2 Degradación de fenol mediante procesos biológicos.....	4
1.3 <i>Pseudomonas</i>	8
1.4 Cinéticas de crecimiento bacteriano.....	9
1.5 Técnicas para la determinación de concentración celular.....	11
1.5.1 Método directo de conteo de colonias por gota.....	12
1.5.2 Determinación de la concentración proteica celular.....	12
1.5.3 Cuantificación de ATP por bioluminiscencia.....	13
1.5.4 Cuantificación de células bacterianas mediante turbidez.....	14
1.5.5 Determinación de concentración celular por peso seco.....	15
2. METODOLOGÍA.....	16
2.1 Cepas utilizadas.....	16
2.2 Métodos Analíticos para medición de Biomasa.....	17
2.2.1 Recuento de colonias en placa por gota.....	18
2.2.2 Determinación de concentración proteica celular.....	19
2.2.3 Cuantificación de ATP por bioluminiscencia.....	20
2.2.4 Turbidez.....	20
2.2.5 Determinación de concentración celular por peso seco.....	21
2.3 Cinética de crecimiento y biodegradación de fenol.....	21
2.4 Medida de Fenol.....	23
2.5 Identificación preliminar de la vía metabólica de biodegradación de fenol.....	23
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
3.1 Ensayos Preliminares.....	25
3.1.1 Curvas de calibración.....	25
3.1.2 Comparación de los métodos ensayados.....	28

3.1.3 Cinética en Medio Sintético.....	30
3.2. Cinéticas de crecimiento bacteriano y biodegradación de fenol en medio real.....	31
3.3 Evaluación de los diferentes métodos para la determinación de Biomasa.....	35
3.3.1 Método directo de conteo de colonias por gota.....	35
3.3.2 Concentración de proteínas.....	38
3.3.3 Turbidez, Densidad óptica.....	39
3.3.4 Determinación de biomasa por peso seco.....	39
3.4 Ventajas y Desventajas de los Métodos Ensayados.....	40
3.5 Determinación De La Ruta De Biodegradación Del Fenol con <i>Pseudomonas putida</i>	41
4. CONCLUSIONES.....	43
5. RECOMENDACIONES.....	45
6. BIBLIOGRAFÍA.....	46
7. ANEXOS.....	50

LISTA DE FIGURAS

	Pg.
Figura 1. Estructura de fenoles contaminantes.....	3
Figura 2. Rutas metabólicas de biodegradación de la molécula de fenol.....	7
Figura 3. <i>Pseudomonas putida</i>	8
Figura 4. Fases de crecimiento microbiano.....	9
Figura 5. Crecimiento del pool en agar cetrimide exclusivo para <i>Pseudomonas</i> ..	17
Figura 6. Diseño metodológico para la determinación de biomasa bacteriana.....	18
Figura 7. Recuento de colonias en placa por goteo.....	19
Figura 8. Montaje para las cinéticas de biodegradación.....	22
Figura 9. Extracción con Hexano.....	22
Figura 10. Método colorimétrico para medir el sustrato fenol.....	23
Figura 11. Curva de Calibración método Bioluminiscente vs Absorbancia.....	26
Figura 12. Coeficiente de variación porcentual del peso seco determinado por tres técnicas.....	29
Figura 13. Cinética preliminar en medio sintético.....	30
Figura 14. Curva estándar relación entre densidad óptica y unidades formadoras de colonias.....	31
Figura 15. Planta de tratamiento de aguas residuales, tratamiento biológico.....	32
Figura 16. Cinética de crecimiento en medio real.....	34
Figura 17. Correlación LogUFC/ml vs Peso Seco (ppm)	36
Figura 18. Correlación LogUFC/ml vs Proteínas (ppm)	37
Figura 19. Curva relación entre concentración de proteínas y peso seco	38
Figura 20. Correlación lineal entre Turbidez y Peso Seco	39
Figura 21. Medida del metabolito intermediario 2-Hiroximucónico semialdehído (2-HMS) en la biotransformación del fenol mediante <i>P.putida</i>	41

LISTA DE TABLAS

	Pg.
Tabla 1. Propiedades Físicas de algunos compuestos fenólicos contaminantes..	13
Tabla 2. Métodos para cuantificar proteínas.....	13
Tabla 3. Cepas de <i>Pseudomonas putida</i>	16
Tabla 4. Datos de correlación entre URL vs Absorbancia.....	26
Tabla 5. Resultados extracción de proteínas.....	28
Tabla 6. Resultados eliminación de interferencias con membranas.....	32
Tabla 7. Parámetros de crecimiento bacteriano del pool de <i>Pseudomonas putida</i> en el medio real con fenol.....	35
Tabla 8. Ventajas y desventajas de los métodos para la determinación de Biomasa.....	40

LISTA DE ANEXOS

	Pg.
Anexo A 1. Calibración Del Método de Bradford.....	50
Anexo A. 2 Calibración determinación de fenol con el método colorimétrico de la 4-aminoantipiridina.....	50
Anexo B.1 Curva de Calibración Peso Seco con Densidad Óptica.....	51
Anexo B. 2 Curva de calibración concentración de proteínas con densidad óptica.....	51
Anexo C. 1 Resultados de la cinética de biodegradación de fenol en medio sintético.....	52
Anexo C. 2 Resultados de la cinética de biodegradación de fenol en medio real (PTAR).....	52

IMPLEMENTACIÓN DE DIFERENTES TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE BIOMASA BACTERIANA DE CEPAS *Pseudomonas putida* BIODEGRADORAS DE FENOL

Niño Leidy R., Torres Rodrigo*

PALABRAS CLAVES:

Cuantificación de biomasa, Crecimiento microbiano, Degradación de fenol, *Pseudomonas putida*.

RESUMEN

La descarga de residuos contaminantes, producto de la actividad industrial, a los ecosistemas acuáticos ha generado una problemática ambiental, debida a la toxicidad elevada de algunas sustancias. En particular, ha sido encontrado que el fenol, aún a concentraciones bajas, presenta un índice alto de contaminación. Esta situación ha incentivado el desarrollo tecnologías que permiten la eliminación de dicho hidrocarburo y de sus derivados, de los cuerpos de agua. Siendo el tratamiento biológico con cepas especializadas, tales como las *Pseudomonas putida*, es una las técnicas más utilizadas en las plantas de tratamiento de aguas residuales fenólicas.

Este estudio tuvo por objeto la implementación de diversas metodologías, conducentes a la cuantificación de biomasa en unidad de concentración celular de cepas de un pool de *Pseudomonas putida*, empleadas en refinerías de petróleo en Colombia, utilizadas en la biodegradación de fenol. Las técnicas utilizadas para dicho propósitos fueron: Densitometría, cuantificación de proteínas celulares, cuantificación de biomasa seca (peso seco) y ATP por bioluminiscencia. Estas fueron correlacionadas una con otra, y con el método microbiológico de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml). Como resultado, se encontró correlaciones superiores al 98% ($r > 0.98$), que comparadas con el método directo, actualmente empleado en las refinerías de Barrancabermeja y Cartagena de Indias, muestra una eficiencia mayor.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ciencias Básicas. Escuela de Química. Director Rodrigo Torres.

IMPLEMENTATION OF DIFFERENT ANALYTICAL TECHNIQUES FOR DETERMINING BACTERIAL BIOMASS OF STRAINS *Pseudomonas putida* IN THE BIODEGRADATION OF PHENOL*

Niño Leidy R., Torres Rodrigo**

KEYWORDS:

Quantification of biomass, microbial growth, degradation of phenol, *Pseudomonas putida*.

ABSTRACT

The discharge of polluting waste, product of industrial activity, on aquatic ecosystems has generated environmental problems, due to the high toxicity of some substances. In particular, it has been found that phenol, even at low concentrations, has a high rate of contamination. This situation has encouraged the development technologies that allow the removal of that hydrocarbon and its derivatives, of the water's bodies. Being the biological treatment with specialized strains such as *Pseudomonas putida*, is a most commonly used techniques.

This study was aimed at the implementation of different methodologies, leading to the quantification of biomass concentration unit cell of a pool of strains of *Pseudomonas putida*, used in oil refineries in Colombia, used in the biodegradation of phenol. The techniques used for such purposes were: Densitometry quantification of cellular proteins, quantification of dry biomass (dry weight) and ATP bioluminescence. These were correlated with each other, and with the microbiological method of colony forming units per milliliter (CFU / ml). As a result, found over 98% correlation ($r > 0.98$), which compared with the direct method, currently employed at the refinery Barracambermeja and Cartagena de Indias, shows a higher efficiency.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ciencias Básicas. Escuela de Química. Director Rodrigo Torres.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el aumento de la descarga de residuos contaminantes generados por la actividad industrial es uno de los mayores problemas de contaminación ambiental. Existen diversos tipos de compuestos contaminantes, entre los cuales se encuentran los compuestos fenólicos, que por su toxicidad y carga contaminante, generan graves problemas ambientales en los ecosistemas acuáticos. Es por esta razón, que existe la necesidad de tratar estas aguas contaminadas antes de que sean vertidas a los cuerpos de aguas naturales, siendo el tratamiento biológico la forma más económica y eficaz para degradar estos compuestos aromáticos, donde bacterias tales como *Pseudomonas putida*, pueden biotransformarlos y utilizarlos como sustrato para su crecimiento microbiano.

Por otro lado, debido a la gran complejidad de los componentes presentes en las aguas contaminadas, es importante contar con métodos adecuados y prácticos a nivel industrial, que permitan la cuantificación de diversos compuestos, entre ellos, la biomasa celular, que entre otros aspectos, permiten la validación de modelos matemáticos y cinéticos desarrollados para la descripción del crecimiento celular y biodegradación de fenol. Como parte de la etapa de validación de un modelo matemático (Martínez M^a A. et al, 2008) y la implementación de nuevos métodos más prácticos que el método microbiológico usado actualmente, la siguiente investigación tiene el propósito de estudiar la cuantificación de biomasa a partir del ensayo de diferentes métodos, tales como: peso seco, densidad óptica, cuantificación del contenido proteico y la producción metabólica de ATP por bioluminiscencia.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 El fenol

Los fenoles son compuestos aromáticos que contienen grupos hidroxilo ligados directamente al anillo aromático y se clasifican en monohidroxílicos, dihidroxílicos, trihidroxílicos, dependiendo del número de grupos hidroxilo que contenga el anillo. Los fenoles, como los alcoholes, contienen el grupo -OH, teniendo estas familias algunas características semejantes. Sin embargo, tanto en la preparación como en las propiedades, estos compuestos son bastante diferentes, y es necesario clasificarlos en distintas familias. Los fenoles son mucho más ácidos que los alcoholes y la consecuencia práctica de esta acidez es que los fenoles son solubles en hidróxido de sodio acuoso diluido. De este modo, con frecuencia es posible separar un componente fenólico de una mezcla de compuestos por medio de una simple extracción con disolvente acuoso básico y posterior reacidificación. Los fenoles más sencillos son líquidos o sólidos de bajo punto de fusión, pero con puntos de ebullición bastante elevados, debido a la formación de puentes de hidrógeno intermolecular (Silva, 2000).

La presencia de compuestos fenólicos en el medio ambiente es consecuencia, en gran parte, de procesos industriales y agrícolas. El fenol se utiliza principalmente en la producción de resinas fenólicas. También se utiliza en la manufacturación del bisfenol A y la caprolactama; el bisfenol A es usado para producir resinas epóxicas y la caprolactama para la producción de nylon y otras fibras sintéticas. El fenol es muy utilizado en la industria química, farmacéutica y clínica como un potente fungicida, bactericida, antiséptico y desinfectante, así como también para producir agroquímicos y policarbonatos, entre otros (Sullivan y Krieger, 2001). La estructura y abreviatura de los principales fenoles contaminantes se presentan en la figura 1, y las respectivas propiedades físicas se resumen en la tabla 1 (Silva, 2000).

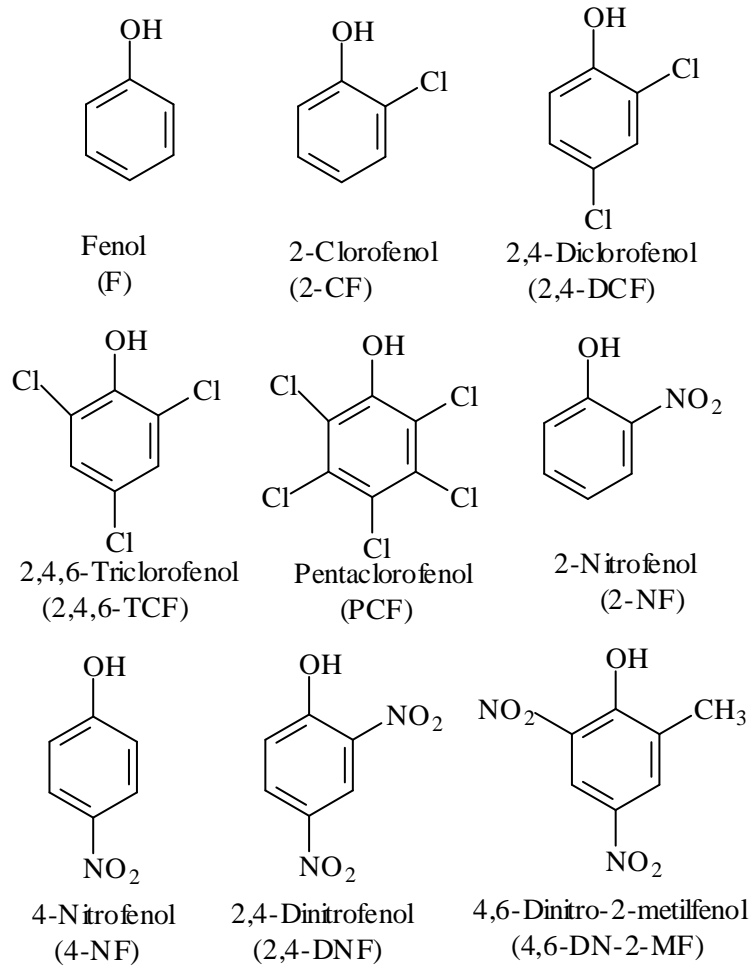


Figura 1. Estructura de fenoles contaminantes.

Las concentraciones naturales de compuestos fenólicos son usualmente inferiores a 0.002 mg/l. En rellenos sanitarios, su concentración total puede ser próxima a los 20 mg/l, pero en aguas industriales provenientes de la refinación del petróleo las concentraciones pueden variar desde (5- 500 ppm) (Monteiro et al, 2000). El fenol no es muy volátil, por lo tanto sus efectos tóxicos se dan comúnmente de forma oral y dérmica. Son considerados contaminantes prioritarios debido a la importancia que tienen en la salud humana, así como su posible presencia en aguas, suelos y alimentos, lo cual hace que las cantidades máximas de fenoles estén reguladas por la legislación de cada país. Debido a esto, la ley de gestión ambiental para la prevención y control de la contaminación ambiental en

Colombia, establece entre los criterios de calidad para la preservación de la flora y fauna en aguas dulces, frías o cálidas, aguas marinas y de estuario, un límite máximo permisible para fenoles de 0.001mg /L y para clorofenoles de 0.5 mg/L (NCA, 1993).

Tabla 1. Propiedades Físicas de compuestos fenólicos contaminantes.

Compuesto	Peso Molecular	Punto de Fusión, °C	Punto de Ebullición, °C	Densidad Relativa	Solubilidad en agua, % (p/p)
F	94,11	43,0	181,7	1,0722(20°C)	6.6
2-CF	128,56	9,0	174,9	1,2634(20°C)	0,1
2,4-DCF	163,00	45,0	210,0	-	P.S.
2,4,6-TCF	197,45	69,5	246,0	1,490(35°C)	P.S.
PCF	266,34	191,0	310,0	1,978(22°C)	20-25 mg/L
2-NF	139,11	45,3-45,7	216,0	1,2942(40°C)	0,108
4-NF	139,11	114,9-115,6	279,0 (S,D)	1,4790(20°C)	1,16
4,6-DN-2MF	198,13	83,0-85,0	-	-	128mg/L

P.S.=Poco soluble

S=Sublima

D=Descompone

1.2 Degradación de fenol mediante procesos biológicos

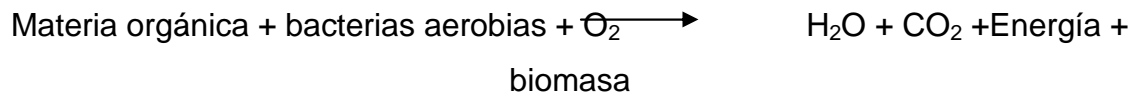
En los últimos años, los procesos biológicos han mostrado mayor utilidad que los procesos físico-químicos para la eliminación de compuestos persistentes en el medio ambiente, debido a que son una forma económica de eliminar los compuestos contaminantes, consumen menos energía, ofrecen posibilidades de reciclaje y son más específicos. En las aguas residuales supone la remoción de contaminantes mediante actividad biológica. Ésta se puede aprovechar para eliminar sustancias orgánicas biodegradables, coloidales o disueltas del agua residual, mediante su conversión en gases que escapan a la atmósfera y en

biomasa extraíble mediante sedimentación. Por lo tanto, puede afirmarse entonces, que la forma más viable para la remoción de fenol es el tratamiento biológico, donde un grupo de microorganismos especializados y en condiciones óptimas es capaz de crecer y utilizar como única fuente de carbono este compuesto aromático.

Existen tres grupos principales de procesos biológicos (Romero, 2004);

- Procesos aerobios: Donde el tratamiento se efectúa en presencia de oxígeno.
- Procesos anóxicos: Se lleva a cabo la remoción de nitrógeno mediante la conversión de nitrato en nitrógeno gaseoso, en ausencia de oxígeno. Es también conocido como desnitrificación anaerobia.
- Procesos anaerobios: Son aquellos en los cuales el tratamiento biológico ocurre a muy bajas concentraciones de oxígeno.

El proceso estudiado en este caso es el aerobio, debido a que las bacterias utilizadas en esta investigación, las *Pseudomonas sp.*, son estrictamente aeróbicas. La oxidación orgánica se lleva a cabo como una remoción de electrones o átomos de hidrógeno de las moléculas orgánicas; en este caso, de la molécula de fenol. En las oxidaciones biológicas, el oxígeno actúa como un aceptor final de electrones y es reducido a agua, mientras que los donantes orgánicos e inorgánicos de electrones son oxidados a CO₂.



Las enzimas implicadas en el metabolismo son principalmente tres: las oxigenasas, que catalizan la incorporación de un átomo de oxígeno a un sustrato, las di-oxigenasas, que catalizan la inserción de dos átomos de oxígeno dentro del sustrato único, y las oxidasas, que transfieren dos electrones desde el compuesto

dador al oxígeno, formándose habitualmente peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Devlin y Dabán, 1999).

Existen dos pasos al inicio de las rutas degradativas en condiciones aerobias que son comunes a todos los compuestos aromáticos. El primer paso es la hidroxilación del anillo aromático. En esta etapa la bacteria emplea una dioxigenasa para catalizar la incorporación simultánea de dos átomos de oxígeno procedentes de una molécula de oxígeno en el anillo aromático. Para el caso de la molécula de fenol que ya contiene un grupo hidroxilo, la enzima que primero actúa es *la fenol hidroxilasa*, la cual es mono-oxigenasa y cataliza la inserción de sólo uno de los átomos del oxígeno molecular en el anillo. El segundo paso es la escisión del anillo bencénico. Se conocen dos tipos de escisión para que estos compuestos aromáticos transformen su estructura cerrada en abierta: la escisión *orto* (fisión intra-diol) ó la escisión *meta* (fisión extra-diol). Los productos finales de ambas rutas son moléculas que pueden entrar en el metabolismo central de la bacteria mediante el ciclo de Krebs (Figura 2) (Glazer y Nikaido, 1998).

Estudios anteriores han demostrado que la degradación de la molécula de fenol se da preferiblemente por la escisión vía meta por la acción de la enzima Catecol-2-hidrogenasa que conduce a la formación del metabolito intermediario semialdehído 2-hidroximucónico que entra fácilmente al ciclo de Krebs para ser oxidado completamente a CO₂ (Suárez, 1993; Sahar, 2006).

La actividad metabólica depende de muchos factores ambientales, es decir, de las condiciones de vida de cada especie. Por esto, es necesario definir factores como; temperatura, pH, nutrientes, y agitación, entre otros, que pueden inhibir el desarrollo metabólico de la especie. Los factores más importantes en la actividad metabólica de las *Pseudomonas putida*, son la concentración de oxígeno disuelto, aproximadamente de 1mg/L, la temperatura de crecimiento óptimo; entre 25-40°C (mesófilas), y el pH del medio; entre 6,5 y 8,5, aproximadamente (Martínez M^a A. et al, 2008).

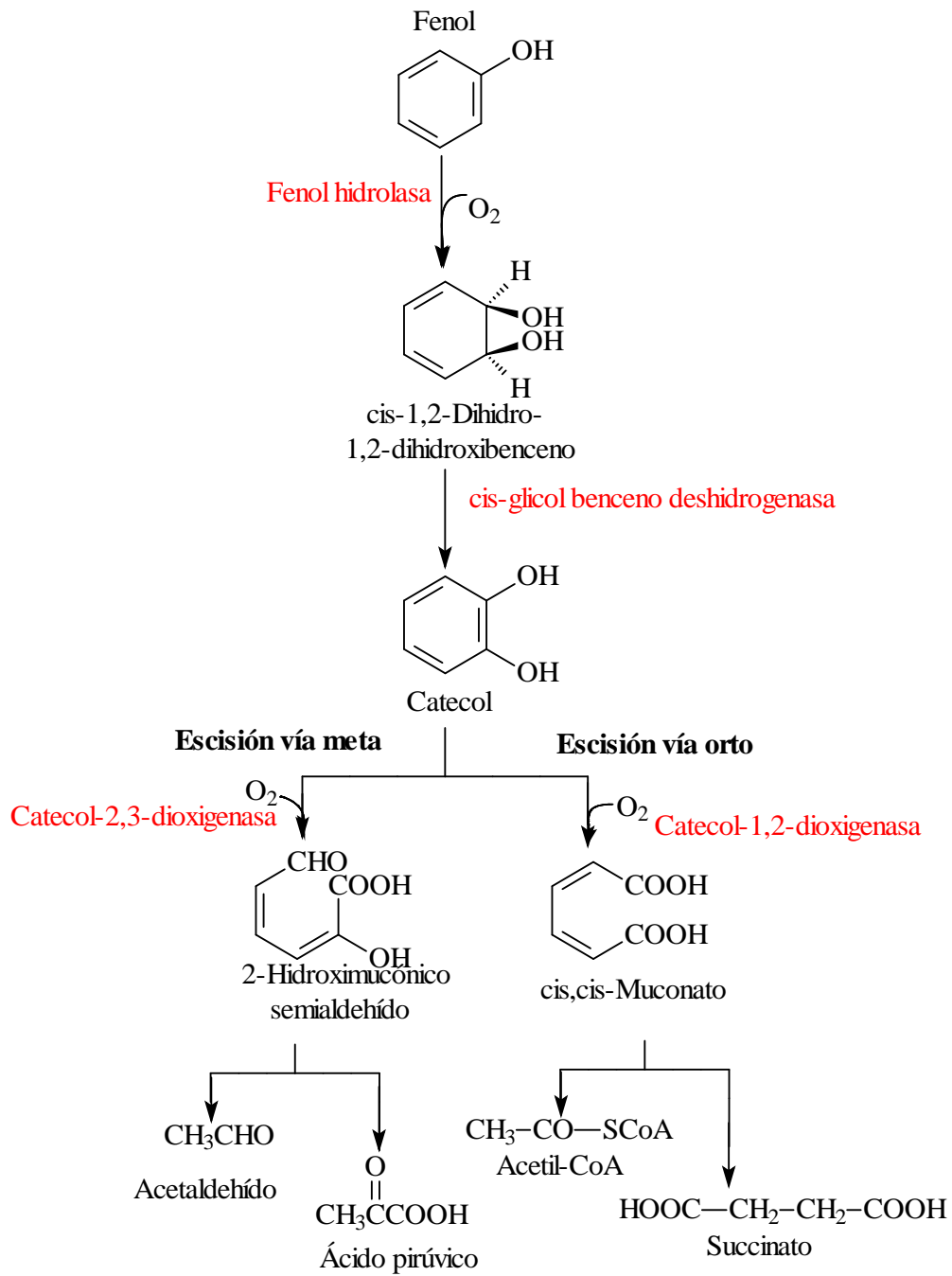


Figura 2. Rutas metabólicas de biodegradación de la molécula de fenol.

1.3 *Pseudomonas*

Las *Pseudomonas* son bacterias en forma de bacilos que presentan versatilidad metabólica en diversos ambientes y en los últimos años han sido objeto de estudio para diferentes campos. Las *Pseudomonas* se dividen en diferentes especies, se encuentran normalmente en el suelo, aunque pueden ser patógenos oportunistas en animales (*Ps. aeruginosa*) y patógenos de plantas (*Ps. syringae*). Cada especie presenta preferencias por compuestos específicos, así por ejemplo, las *Pseudomonas fluorescens*, son altamente especializadas para la remoción de cianuro en presencia de glucosa (Gil y Giraldo, 2005), mientras que las *Pseudomonas putida*, son fácilmente adaptables a ambientes con compuestos de origen aromático. Es por ello que estas bacterias son de gran interés ambiental, debido a la facilidad que presentan al biodegradar diferentes compuestos orgánicos tóxicos (Loh y Cao, 2008).



Figura 3. *Pseudomonas putida**

Las *P.putida* son bacilos Gram Negativos, rectos o curvados sin esporas, móviles con flagelos polares, pertenecientes a la familia *Pseudomonaceae*; son organismos aerobios sin metabolismo fermentativo. Su diámetro se encuentra entre 0.7-0.8 μm y su longitud entre 1-2 μm . Dentro de esta especie, no se conoce ninguna cepa que sea patógena de plantas o animales. Esto hace que actualmente se esté explotando como alternativa para la biodegradación de compuestos contaminantes debido a la facilidad de crecer entre diferentes hidrocarburos aromáticos: benceno, tolueno, fenol, entre otros. Lo anterior convierte a las *P. putida* en una especie fácilmente adaptable para la remoción de

* Figura tomada de: www.nadidem.net

un compuesto orgánico, especialmente cuando este se encuentra como única fuente de carbono en un medio de cultivo (Reardon, Mosteller y Bull, 2000; Kulkarni y Chaudhari, 2006).

1.4 Cinéticas de crecimiento bacteriano

El crecimiento y reproducción de las bacterias ocurre a medida que los nutrientes son procesados e incorporados como nuevo material a la célula. El proceso reproductivo de la célula es mediante la subdivisión en dos células descendientes, proceso conocido como fisión binaria y que es característico del crecimiento bacteriano. Las poblaciones bacterianas pueden alcanzar altas densidades celulares. El crecimiento de una población bacteriana se compone de una serie de fases. En la figura 4 se muestran las cuatro etapas de un crecimiento microbiano típico.

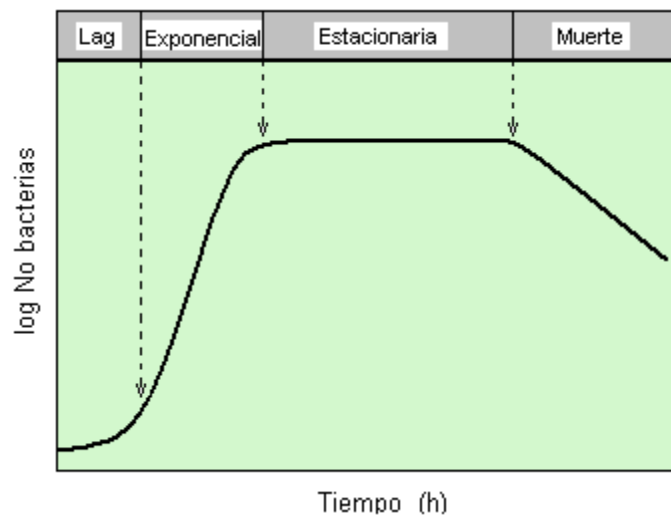


Figura 4. Fases de crecimiento microbiano

Durante la primera de ellas, la fase Lag, de adaptación o latencia, las células se ajustan a su nuevo ambiente. Ellas pueden tener deficiencias en ciertas enzimas y coenzimas por lo que durante esta etapa se produce la síntesis de estos materiales. Al final de esta etapa se entra a la fase exponencial, en la cual la población se duplica a intervalos regulares. Este es el período de más rápido crecimiento bajo condiciones óptimas. Cuando el número de células que son

producidas iguala al número de células que mueren, se establece un equilibrio dinámico en el cual no existe un mayor crecimiento. Esta etapa se denomina fase estacionaria y se debe a un agotamiento de algún nutriente. La fase de muerte se alcanza cuando la tasa de destrucción supera la tasa de crecimiento. (Madigan, Martinko, Brock, 2003).

En la fase exponencial se presenta un período de balance durante el cual la velocidad específica de crecimiento es constante. Durante la fase exponencial es posible calcular la velocidad específica de crecimiento (μ), la cual es una constante de proporcionalidad que relaciona la velocidad de crecimiento de cualquier componente celular determinado con la cantidad de ese componente en crecimiento celular. Además, las células individuales se duplican a una tasa característica para cada organismo. Este intervalo de tiempo se conoce como el tiempo de generación y está relacionado directamente con la velocidad de crecimiento exponencial.

Velocidad de aumento de las células = K (número de individuos ó masa de células)

$$\frac{dN}{dt} = kN \quad \frac{dX}{dt} = kX \quad \frac{dZ}{dt} = kZ \quad (1)$$

N= Número de Individuos, X= Biomasa, Z= Cantidad de cualquier componente celular

Mediante la integración de las ecuaciones diferenciales antes mencionadas, se obtienen formas más útiles en la práctica:

$$\ln Z - \ln Z_0 = \mu(t - t_0) \quad (2)$$

$$\log Z - \log Z_0 = \frac{\mu}{2,303}(t - t_0) \quad (3)$$

$$\frac{\mu}{2,303} = \frac{\log Z - \log Z_0}{t - t_0} \quad (4)$$

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu} \quad (5)$$

El valor de la velocidad de crecimiento máxima ($\mu_{m\acute{a}x}$) se obtiene a partir de la pendiente máxima de la curva de crecimiento del microorganismo, la biomasa bacteriana al final (X_f) es la obtenida al terminar la fase logarítmica, y el tiempo de duplicación promedio o de generación, igual al tiempo necesario para que todos los componentes del cultivo aumenten en un factor de 2, se determina mediante la ecuación 5 (Stanier, 1996).

La biodegradación del fenol y algunos de sus derivados mediante diferentes tipos de microorganismos, han sido objeto de estudio durante los últimos años. Diferentes autores han descrito el comportamiento cinético bajo diferentes condiciones de variables de proceso, mostrando que la cinética de crecimiento es esencial para entender la capacidad de biodegradación de los microorganismos en las condiciones de operación adecuadas (Martínez et al, 2008; Kulkarni y Chaudhari, 2006; Kumar A. et al, 2005; Ojumu et al, 2004; Monteiro et al, 2000).

1.5 Técnicas para la determinación de concentración celular

La medición de la concentración de biomasa es factor importante en procesos biotecnológicos donde se produce un crecimiento poblacional de microorganismos. Los procesos más estudiados son la fermentación y la biodegradación de sustancias tóxicas (Sinclair y Kristiansen, 1987). Para la determinación del crecimiento de una población microbiana existen diferentes métodos, los cuales se clasifican como métodos directos y métodos indirectos. En cualquiera de las circunstancias se evalúa que los componentes aumenten en una misma proporción por unidad de tiempo. Entre los primeros, los más conocidos son el recuento directo del número de células al microscopio y el recuento de unidades formadoras de colonias en placa (UFC), siendo este último el más usado a nivel de laboratorio de microbiología, y por lo tanto, escogido como método directo para desarrollar la comparación con los métodos indirectos o de medición directa de la masa del cultivo ensayados.

1.5.1 Método directo de conteo de colonias por gota

El recuento de microorganismos aerobios se basa en el conteo de células viables en una muestra, capaces de formar colonias sobre un medio sólido adecuado. En este procedimiento se supone que cada célula viable puede formar una colonia. El recuento de unidades formadoras de colonias en placa (UFC/ml) tiene algunas ventajas frente al método convencional de recuento en placa, tales como la optimización del medio de cultivo, gasto menor de reactivos y tiempo en su realización, buena distribución de muestras en la gota, conteo de colonias más rápido y preciso (Madigan, Martinko, Brock, 2003). Es importante que el número de colonias que aparezcan en la placa no sea demasiado grande, pues algunas colonias se podrían fusionar dando estimaciones erróneas. También es importante que el número de colonias no sea bajo para que el cálculo sea estadísticamente significativo. En la práctica, el número de colonias oscila entre 10 y 30. Para obtener el número apropiado de colonias se emplea una serie de diluciones seriadas de la muestra (MPT, 2007).

Sin embargo, el análisis microbiológico presenta varias limitaciones. Algunas de ellas son: el tiempo necesario para la obtención de resultados, la necesidad de utilizar medios selectivos y las unidades no aplicables a las ecuaciones de modelos matemáticos. Tales limitaciones han impulsado el desarrollo de métodos más rápidos que permitan la obtención de resultados en menores tiempos (Agatángelo, 2007).

1.5.2 Determinación de la concentración proteica celular

Entre las técnicas indirectas para medir biomasa, se encuentra la determinación de un componente característico que esté asociado con la concentración celular del cultivo, como es la determinación de peptidoglicano, ADN, ARN o proteínas. Suele usarse en bacterias que forman grumos no dispersables, aquellas que crecen en filamentos o presentan otras dificultades para su conteo o medición como la determinación en ambientes naturales.

La cuantificación de proteínas se realiza de forma práctica con métodos colorimétricos, algunos de los más usados son: el método de Biuret, Lowry y Bradford. En la tabla 2 se describen algunas características de cada uno de ellos (Okutucu et al, 2007). Debido a la baja sensibilidad de Biuret y a la interferencia que presenta con el fenol el método de Lowry, no son recomendados para realizar esta determinación. Por lo tanto, el método de Bradford pareciera ser el más adecuado para la cuantificación de proteínas como concentración celular (Bradford, 1976).

Tabla 2. Métodos para cuantificar proteínas

Biuret	Bradford	Lowry
550 nm	595nm	500nm
Pocas interferencias	Pocas interferencias	Muchas interferencias
Baja sensibilidad 0.25-200mg	Alta sensibilidad, 10-100µg	Mediana sensibilidad, 0.001-1mg

La cuantificación de proteínas ha sido usada como medida de crecimiento microbiano durante fermentaciones en estado sólido con *Aspergillus niger* con el método de Lowry, mostrando buena correlación con el peso seco de los hongos (Abd et al, 2008). Carrillo y colaboradores (2004) usaron la concentración de proteínas como medida indirecta de biomasa en la biodegradación de DDT por una mezcla de cepas de los géneros de *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Moxarella* y *Acinetobacter*.

1.5.3 Cuantificación de ATP por bioluminiscencia

El Adenosín Trifosfato (ATP) es una sustancia que está contenida típicamente en la biomasa de origen animal, vegetal y microbiano. La cuantificación específica del ATP mediante bioluminiscencia, determina directamente la presencia de material biológico en superficies, en líquidos u otras muestras. Por lo tanto, puede ser usado como indicativo directo de la cantidad de un microorganismo específico en estudios de crecimiento bacteriano. Esta técnica consiste en la reacción del

ATP con la luciferina en presencia de la enzima luciferasa, presente en las luciérnagas (Román, 2006).



Se puede determinar exactamente la cantidad de ATP presente en una muestra biológica mediante la medición precisa de la luz producida en esta reacción, permitiendo la detección rápida, sensible y específica, comparado al método de recuento en placa que depende de la producción de biomasa visible.

La cantidad de ATP puede ser usada como control microbiológico en las industrias de alimentos, como indicador de la cantidad de material biológico sobre las superficies en contacto con los alimentos y como controles de higiene en otros campos donde sea primordial proporcionar una medida del estado de limpieza y de la eficiencia de los procesos de higiene (Burgos et al, 2002; Larson^a et al, 2003).

1.5.4 Cuantificación de células bacterianas mediante la medida indirecta de turbidez

La turbidez se presenta en una muestra porque las células presentes allí dispersan la luz que atraviesa la solución. A mayor número de células presentes, habrá mayor dispersión de la luz y por lo tanto habrá un aumento de la turbidez. La turbidez puede medirse con un fotómetro (nefelómetro), o con un espectrofotómetro, siendo sus unidades fotométricas, el Klett y la densidad óptica (DO), respectivamente. Los métodos de dispersión de la luz son las técnicas más utilizadas para monitorear el crecimiento de los cultivos bacterianos. Son herramientas útiles y poderosas, pero presentan respuesta lineal solo en intervalos cortos (Aquiahuatl y Pérez, 2004; Madigan, 2003).

La absorbancia se define como el logaritmo decimal del cociente entre la intensidad de la luz incidente sobre la suspensión (I_0) y la luz transmitida por la suspensión (I) (Agatángelo, 2007).

$$A = \frac{\log(I_0)}{(I)}$$

El crecimiento bacteriano puede relacionarse con la turbidimetría por el aumento de la turbidez del medio. Algunos autores enfatizaron las limitaciones de este método, debido a que solo puede usarse como método comparativo y no para predecir recuentos viables. Para estimar el número de microorganismos totales o el número de microorganismos viables de una suspensión bacteriana debe realizarse una curva de calibración con cada tipo de microorganismo, sólo de esta forma es posible relacionar absorbancia (Densidad Óptica) con el número de microorganismos totales o con UFC/ml (Begot et al, 1996).

1.5.5 Determinación de concentración celular por peso seco

La determinación de peso seco es una medida directa de crecimiento microbiano y suele representar el 20% de los valores de peso húmedo, este porcentaje es aceptado como estándar para la mayoría de bacterias. Sin embargo, en 1984 Bratbak y Dundas encontraron que el contenido de materia seca en las bacterias puede ser dos veces mayor que el valor estándar. Estas diferencias se deben principalmente a que no se hacen las correcciones adecuadas para el contenido de agua intercelular. Usaron tres diferentes cepas bacterianas y determinaron que el peso seco de las células varía entre el 31 y el 57%. Para las *Pseudomonas sp*, el peso seco de las células es aproximadamente el 48% del contenido total del pellet inicial (Bratbak y Dundas, 1984). Lo cual sugiere que la norma no es tan aceptable ya que varía mucho para cada microorganismo.

El peso seco de las células bacterianas que se encuentran en una suspensión se obtiene por el secado de un volumen a una determinada temperatura hasta peso constante. Esta técnica es útil para grandes volúmenes de muestra, debido a que diferencias del orden de los miligramos representan el peso de un gran número de bacterias.

La desventaja de este método es que componentes volátiles de la célula pueden perderse por el secado. Además, la muestra seca puede recobrar humedad durante el pesado, principalmente si el ambiente tiene una humedad relativamente alta (Madigan, 2003).

2. METODOLOGÍA

2.1 Cepas utilizadas

Los estudios se llevaron a cabo utilizando una mezcla de tres cepas diferentes de *P. putida*, adaptadas sin modificación genética. La mezcla de las cepas en el medio de cultivo fue aportada por el grupo ambiental del ICP-ECOPETROL.

Las especificaciones de cada cepa se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Cepas de *Pseudomonas putida*

<i>P. putida</i>	Especificaciones
ICP-16	<i>P. putida</i> Biotipo B1. Aislada en 1993
	Piocianina (-) Fluoresceína (+)
	Medio de Conservación: Nitrógeno Líquido liofilizado, a -80°C.
	Cocobacilos Gram (-), colonia grande en agar cetrímide amarillo verdosa
	Degradación Fenol: 100 %
ICP-18	<i>P. putida</i> Biotipo B2. Aislada en 1991
	Piocianina (-) Fluoresceína (+)
	Medio de Conservación: Nitrógeno Líquido liofilizado, a -80°C.
	Colonias puntiuniformes en agar cetrímide
	Degradación Fenol: 99,8 %
ICP-21	<i>P. putida</i> Biotipo A1. Aislada en 1998
	Piocianina (-) Fluoresceína (+)
	Medio de Conservación: Nitrógeno Líquido liofilizado, a -80°C.
	Colonia pequeña amarillo verdosa
	Degradación Fenol: 98,6 %

El medio de cultivo líquido utilizado para su crecimiento es un Medio Basal Salino (MBS), compuesto por: NaCl, 0.3 g/L; (NH₄)₂SO₄, 0.6 g/L; K₂HPO₄, 0.75 g/L; KH₂PO₄, 0.25 g/L; MgSO₄, 0.15 g/L; KNO₃, 0.6 g/L, y Fenol 0.1% (1 mg/l) (MPT, 2001).

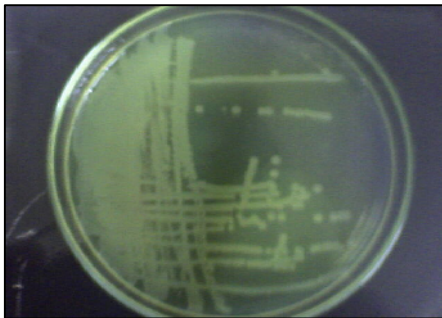


Figura 5. Crecimiento del pool en agar cetrímide exclusivo para *Pseudomonas*.

2.2 Métodos analíticos para medición de Biomasa

La determinación de biomasa bacteriana se inició con la elaboración de curvas de calibración con cada uno de los métodos analíticos ensayados. Los métodos fueron probados en cinéticas de biodegradación de fenol en medio sintético y en ambiente real con agua de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) de ECOPETROL-Barrancabermeja. Para realizar las pruebas con el agua de la PTAR fue necesario eliminar interferencias persistentes después de tratamientos primarios, como restos de hidrocarburos; con este propósito, se realizaron tratamientos previos a la muestra mediante técnicas de filtración con dos membranas de tamaño de poro diferente, donde una membrana de tamaño de poro 12 μm actuaba como prefiltro y otra de menor tamaño de poro de 5 μm eliminaría las interferencias menores. Por otro lado, se ensayó la separación de interferencias con solventes, con n-Hexano y con diclorometano. Luego de algunos ensayos se escogió la extracción por solventes como la técnica adecuada para la preparación de la muestra.

La determinación de biomasa en las cinéticas se realizó mediante el esquema de la Figura 6.

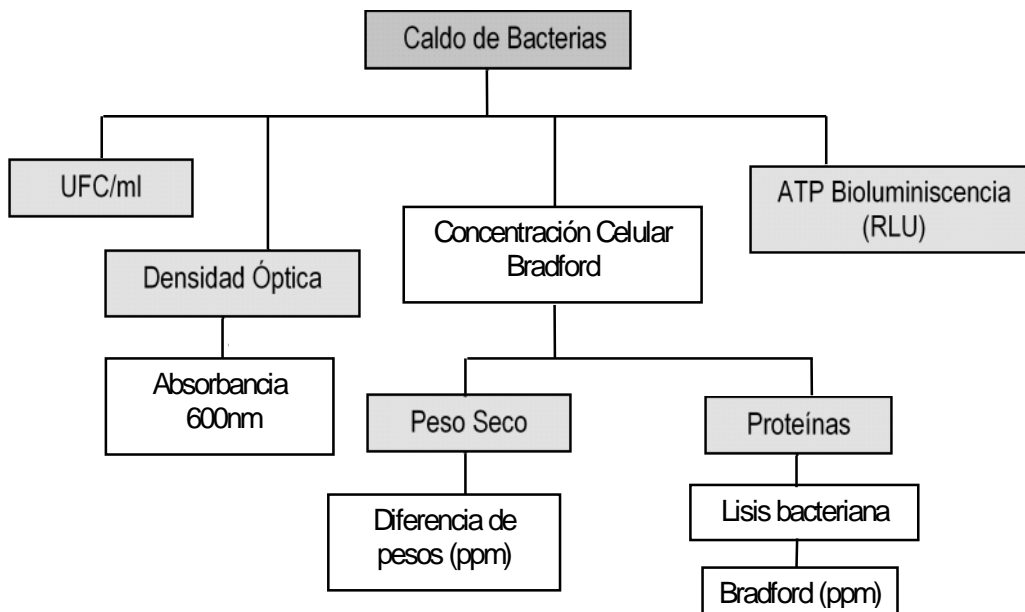


Figura 6. Diseño metodológico para la determinación de biomasa bacteriana

2.2.1 Recuento de colonias en placa por goteo

En la microbiología, la esterilización juega un papel muy importante en la eliminación de microorganismos presentes en el ambiente, que pueden competir con el microorganismo en estudio y contaminar la muestra. Por tanto, es necesario previamente esterilizar los medios de cultivo a 15 libras de presión por 15 minutos y todos los materiales con que se trabajará en los cultivos: solución de agar, tubos eppendorf, agua, puntas de micropipetas, etc.

Para el recuento de colonias se siguió el procedimiento que realiza actualmente el ICP (MPT, 2001). Éste método consiste en tomar 1 ml de la muestra original, de la cual se hacen diluciones de 1 ml de 10^1 hasta 10^6 o 10^7 dependiendo de la concentración inicial del caldo. A cada tubo se le agregan 900 μ l de agua y se pasan 100 μ l de la muestra previamente agitada al primer tubo, obteniendo una dilución de 10^1 . Este procedimiento se repite hasta la dilución 10^6 (Figura 7). De cada dilución se toman 20 μ l y se

siembran en agar Cetrimide selectivo para *Pseudomonas*, por triplicado. Luego se incuban a 32°C por 24 horas en una estufa de cultivo. Finalmente, se cuentan las colonias presentes en las gotas, multiplicando por el factor de dilución, con el fin de obtener el recuento de unidades formadoras de colonias en 1ml de muestra (UFC/ml).

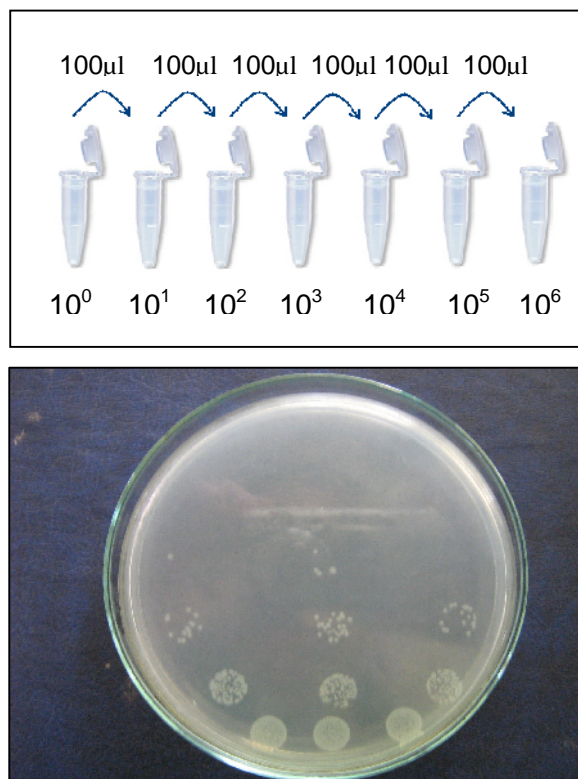


Figura 7. Recuento de colonias en placa por goteo.

2.2.2 Determinación de concentración proteica

Para la obtención de proteínas celulares en solución fue necesario un método de rompimiento o lisis celular. La lisis se realizó mediante tres técnicas diferentes: sonicación, rompimiento celular con un buffer de lisis (Tris base 40 mM, Urea 7M, Tiourea 2M, CHAPS 4% P/V, PMSF 1 mM) e hidrólisis básica (20% NaOH). Entre las anteriores, se seleccionó la forma más eficaz y económica para la extracción de proteínas: La obtención de las proteínas se realizó mediante hidrólisis básica (Stickland, 1951), en donde se toman 500µL de muestra en un tubo de ensayo y se adicionan 90µL de NaOH al 20%. A continuación, se coloca en un baño de ebullición durante 5 minutos y después de estar a temperatura ambiente se lleva a centrifugación a 6000 rpm por 10 minutos.

El *método de Bradford* (1976) consiste en la unión de un colorante, el azul de Comassie G-250 a las proteínas. El colorante en solución ácida existe en dos formas, una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar

un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre.

La curva de calibración se elaboró a partir de una solución patrón de albúmina de 1 mg/ml mediante una serie de diluciones con diferentes concentraciones (0.01-1 mg/ml). De cada una se tomaron 50 µl que se mezclaron con 2.5 ml del reactivo Bradford. Después de 3 minutos, se midió la absorbancia de la mezcla a una longitud de onda de 595nm.

Ahora bien, para la determinación de proteínas fue necesaria la concentración celular de un cultivo cargado de bacterias (10^8 bacterias). Para ello, se procedió de la siguiente forma: inicialmente, se tomó 30 mL de cultivo de *Pseudomonas putida* en tubos tipo Falcón 45 cónico, se centrifugó a 10000 rpm durante 20 minutos en centrífuga *Thermo IEC CL31R*. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se lavaron los sedimentos celulares con agua destilada. Por último, los sólidos celulares fueron resuspendidos en agua destilada hasta un volumen final de 5mL; de éstos, se destinaron 4mL para realizar el peso seco y 500µL para determinar la concentración de proteínas. Finalmente, los valores obtenidos son multiplicados por el factor de concentración y así se halla la cantidad de proteínas en la muestra inicial.

2.2.3 Cuantificación de ATP por bioluminiscencia asociado a la biomasa

La medida de ATP se realiza directamente del equipo HY-LITE 2 en unidades relativas de luz (URL), la radiación bioluminiscente proveniente de los esferos de reacción. La cantidad de ATP proporciona una estimación del número de bacterias presentes en la muestra. Usando un reactivo estándar analítico se realiza la calibración correspondiente al equipo (Manual HyLite², 2004).

2.2.4 Turbidez

La densidad óptica del medio se midió en un espectrofotómetro Spectronic® 20 GenesysTM a 600 nm. En la cinética de medio real se logró monitorear el proceso por la absorbancia de la muestra después de realizar la extracción con hexano. Como blanco se tomó el agua real sin inóculo y con extracción con hexano.

2.2.5 Determinación de concentración celular por peso seco

La determinación se realizó en diferentes cajas de aluminio debidamente marcadas. Mediante la diferencia de pesos de las cajas vacías y calcinadas a 150°C por 12 horas y los pesos después de la resuspensión bacteriana de 4 ml del cultivo concentrado y secadas a la misma temperatura y tiempo. Los resultados son multiplicados por un factor de concentración para obtener el valor en la muestra inicial.

2.3 Cinética de crecimiento y biodegradación de fenol

Las cinéticas en medio sintético y medio real se realizaron en sistemas discontinuos (batch), teniendo en cuenta las variables óptimas de operación encontradas en campo (Martínez, 2008); las *Pseudomonas* son mesófilas y tiene un crecimiento óptimo entre 25-40°C, por lo tanto se trabajó a temperatura ambiente. El rango de pH adecuado puede variar entre 6,5 y 8,5 el cual se controló con buffer fosfato de pH 7. En la cinética de medio sintético, se trabajó con fenol reactivo con concentración inicial de fenol de 50 ppm. Posteriormente, se inoculó al 10 % (v/v) con la mezcla de cepas bacterianas de *P. putida* (10^8 bacterias) y se trabajó con un flujo de oxígeno en exceso para asegurar la máxima biodegradación (Figura 8).

Se partió de un volumen de 400 ml y se tomaron medidas cada dos horas de los parámetros del proceso: concentración de fenol, pH, UFC y densidad óptica a 600nm, durante una corrida de 14 horas.

Las muestras de agua para la cinética en medio real fueron aportadas por ECOPETROL. El muestreo se realizó al inicio del bio-reactor (BA-4008) y las muestras fueron almacenadas con ácido sulfúrico a pH igual a 2. En primer lugar, se midió la concentración de fenol presente en las aguas y se realizó la dilución necesaria para iniciar la cinética con concentraciones menores a 100 ppm.

La cinética de biodegradación en medio real se realizó en un tiempo de corrida de 18 horas, inóculo inicial de 8%, concentración inicial de fenol de 63 ppm. Se midieron los mismos parámetros tomados en la cinética sintética cada dos horas, pero en este caso también se tomaron muestras para ensayar los métodos de

cuantificación de biomasa en cada punto, por lo cual se inició con un mayor volumen al tener en cuenta la cantidad necesaria para cada método, partiendo de 700 ml de caldo de cultivo.



Figura 8. Montaje para las cinéticas de Biodegradación.

Para el análisis de las aguas reales se realizó una extracción previa del hidrocarburo que permanece después de tratamientos primarios con n-hexano, el cual es un solvente que no afecta la cantidad de células viables, tal como se observa en la Figura 9.

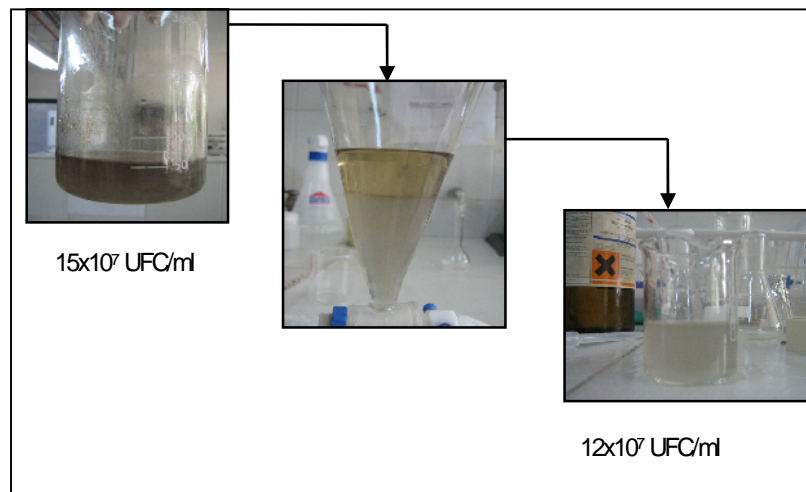


Figura 9. Extracción con Hexano

2.4 Medida de fenol

El consumo del sustrato fue medido con una técnica estándar para la determinación de Fenoles. (APHA, 1995). Este método colorimétrico consiste en la reacción del fenol con la 4-aminoantipirina en presencia de ferricianuro de potasio. Los reactivos cambian de color amarillo a naranja al reaccionar con la molécula de fenol. La intensidad del color aumenta con la concentración.

Para la determinación de fenoles se realizó una curva de calibración de fenol (Anexo A.2), se prepararon diferentes diluciones del compuesto entre 10 y 400 ppm. Tanto las diluciones como la muestra deben estar en un rango de pH de $7,9 \pm 0,01$ antes de agregar los reactivos a la dilución.

La curva se realiza tomando como blanco agua destilada, la cual se procesa de la misma forma que el fenol.



Figura 10. Método colorimétrico para medir el sustrato fenol

2.5 Identificación preliminar de la vía metabólica de degradación de fenol

La identificación preliminar de la ruta metabólica mediante la cual las cepas de *Pseudomonas* en estudio realizan la degradación del fenol, fue analizada mediante el respectivo incremento y disminución de absorbancia a 375 y 268 nm, indicando la formación del 2-hidroximucónico semialdehído como resultado de la escisión vía meta al anillo aromático del catecol, formado después de la hidroxilación de la molécula de fenol (Sayed, 2003).

Cada hora se tomaron muestras del pool de bacterias en crecimiento, con fenol como única fuente de carbono. Cada muestra se centrifugó a 10000 rpm por 15 min para eliminar las células, se tomó el sobrenadante y se midió la absorbancia

de la solución a 375 nm. Se hicieron los espectros de las muestras de 0 horas, de las 12 horas y de las 25 horas de degradación en el espectrómetro Shimadzu UV-2401 PC.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Ensayos Preliminares

3.1.1 Curvas de calibración

En los ensayos preliminares se elaboraron curvas de calibración de los diferentes métodos de cuantificación de la biomasa celular, mediante la preparación de diluciones del cultivo bacteriano. Se realizó una cinética de crecimiento en medio de cultivo sintético, con fenol como única fuente de carbono, donde se ensayaron los métodos para la determinación de biomasa por peso seco y proteínas por Bradford. Ambos métodos se correlacionaron con la medida de turbidez, obteniéndose ecuaciones lineales con buenas correlaciones cerca de 1 ($r^2 > 0,99$), lo cual indica que las ecuaciones representan exactamente los datos experimentales obtenidos. Las regresiones lineales fueron las siguientes: Peso Seco vs Absorbancia ($Abs = 0,0021[PS] + 0,0005$), Proteína vs Absorbancia ($Abs = 0,0088[Prot.] + 0,0005$) (Anexo B).

Cuantificación de ATP por bioluminiscencia:

La determinación de un metabolito como el ATP mediante bioluminiscencia indica la presencia de material biológico. Al realizar la curva de calibración entre las unidades relativas de luz y la absorbancia del medio, se encontró que a concentraciones altas de bacterias el instrumento no realiza la medición, reportando sobrecarga de luz a partir de una absorbancia de 0.043 ($4,6 \times 10^6$ ufc/ml) por lo cual no fue posible realizar ésta medición. En la Figura 11 se muestra la regresión lineal de la curva de calibración con una baja correlación de $r^2 = 0,8997$.

Tabla 4. Datos de correlación entre URL vs Absorbancia.

RLU	Absorbancia
3000	0,003
15000	0,010
23000	0,012
28000	0,015
71000	0,022
Sobrecarga luz	0,043
Sobrecarga luz	0,084

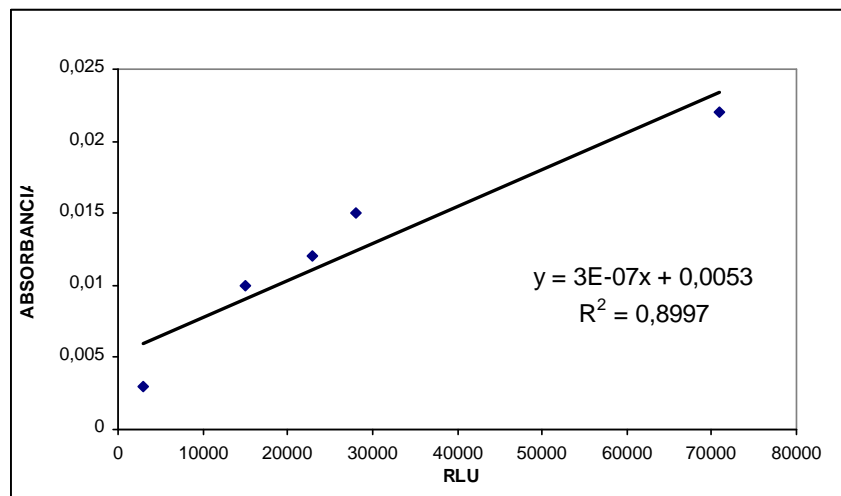


Figura 11. Curva de Calibración método Bioluminiscente vs Absorbancia.

La bioluminiscencia es un método generalmente usado como medida de control higiénico-sanitario en las industrias de alimentos, farmacia y entidades de salud pública (Román, 2006). Este método ha sido implementado en las industrias como sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) principalmente para la protección de alimentos, garantizando su inocuidad. (Aycicek et al, 2006; Costa et al, 2006)

La detección de ATP presenta la ventaja de realizar exámenes rápidos, contrario a los métodos microbiológicos clásicos que son demasiado lentos para la toma de decisiones en el instante de un proceso dado.

Sin embargo, el método de bioluminiscencia presentó grandes fluctuaciones y baja reproducibilidad. Otros autores como Larson y colaboradores (2003) llegaron a la conclusión que el método puede usarse para evaluaciones rápidas, pero no reemplaza los métodos clásicos microbiológicos de cuantificación, debido a que no discrimina los diferentes tipos de organismos. Román (2006) logró una buena correlación en el laboratorio entre el método de recuento en placa de aerobios (UFC) y las Unidades Relativas de Luz (URL), pero no a nivel industrial lo cual se debe a los diversos factores presentes en la planta como son insectos voladores, ambientes húmedos, óxido y contaminación.

Comparando los altos valores de URL obtenidos en las diluciones para la calibración (3000- 71000 URL) con los valores de URL que se manejan en los sistemas de control de higiene y calidad, donde las mediciones inferiores a 150 URL se consideraron limpios, de 151 a 300 URL se consideraron poco confiables, y valores superiores a 301 URL se consideraron inadecuadas condiciones de higiene (Costa et al, 2006). Se considera que el método de determinación de ATP por bioluminiscencia no es apropiado como medida de concentración bacteriana en procesos de biodegradación, donde se manejan altas concentraciones bacterianas.

Determinación de proteínas solubles por Bradford

La determinación de proteínas requiere de una curva de calibración, la cual se realiza a partir de una solución estándar 1mg/ml de Albúmina de suero de bovino (BSA) (Anexo A.1).

Teniendo en cuenta que para la cuantificación de proteínas es necesario extraerlas, fue necesario realizar algunas técnicas de rompimiento o lisis celular. Para ello se usó un buffer de lisis y una hidrólisis básica. Con ambas técnicas de rompimiento se obtuvieron altas concentraciones de proteínas, sin embargo, con la hidrólisis básica se observaron ventajas en el costo y en la manipulación. Por lo tanto, se seleccionó la hidrólisis básica como método de extracción para las

proteínas. En la tabla 5 se muestra la concentración de proteínas extraídas con ambas hidrólisis en una muestra que contenía $64,5 \pm 2,1$ ppm en peso seco.

Tabla 5. Resultados extracción de proteínas

Método	Buffer de lisis	NaOH
Concentración Proteínas	$21,43 \pm 1,66$ mg/L	$15,84 \pm 0,86$ mg/L
% Proteínas respecto al Peso Seco.	33,22 %	24,56 %

3.1.2 Comparación de los métodos ensayados

Se realizó una comparación entre los métodos empleados para la determinación de biomasa. Se determinó cuatro veces cada método, el peso seco directamente, la concentración de proteínas y la densidad óptica, utilizando un cultivo sintético del pool de *Pseudomonas putida* con $2,18 \times 10^8$ UFC/ml.

La determinación del peso seco directamente presentó un valor de 32,00 ppm con un desvío estándar de 0,82 ppm y un coeficiente de variación (CV) del 2,6 %; el peso seco mediante la aplicación de la curva de calibración con la densidad óptica, obtuvo un valor de 32,52 ppm con un desvío estándar de 2,03 ppm y un CV del 6 %. Por último, la determinación del peso seco mediante la cuantificación de proteínas mostró un valor de 33,29 ppm con un desvío estándar de 2,18 ppm y un CV de 7 %. (Figura 12).

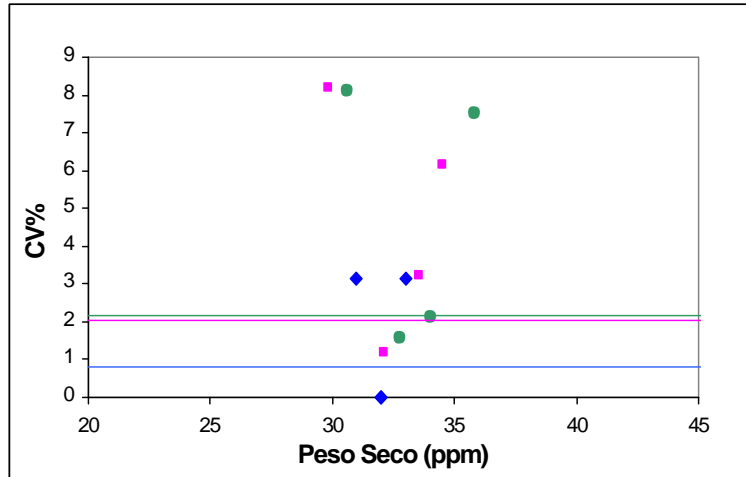
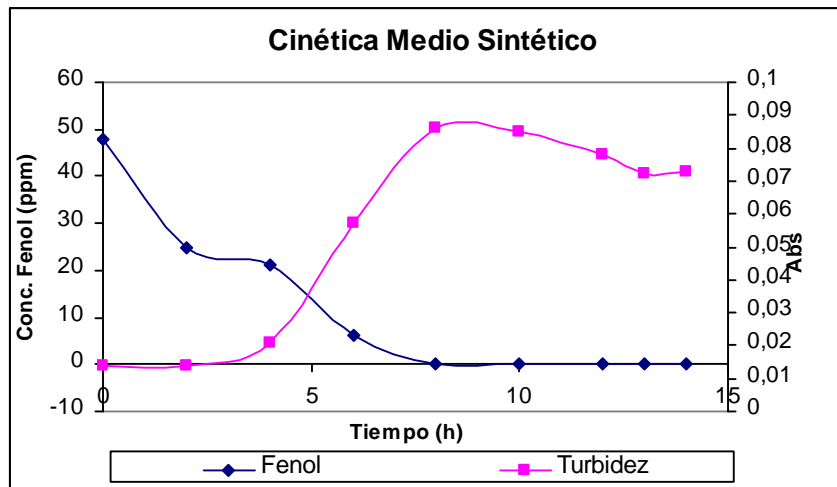


Figura 12. Coeficiente de variación porcentual del peso seco determinado por tres técnicas:

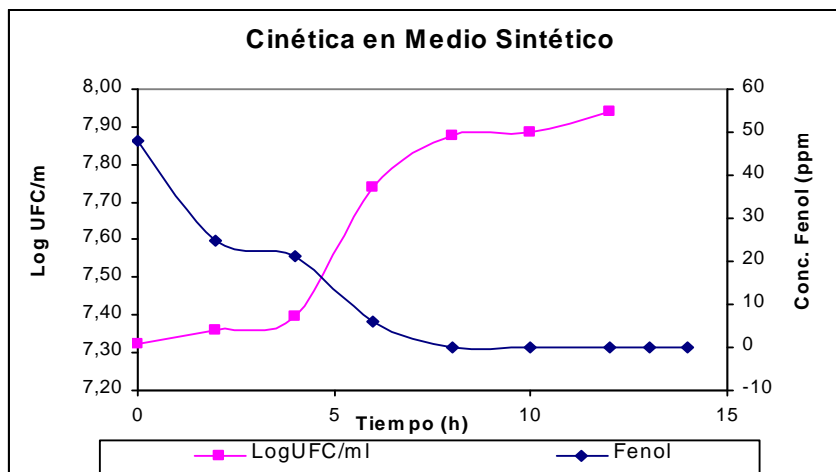
a) Peso Seco directo (◆) b) turbidez (■) c) Proteínas (●)

3.1.3 Cinética de crecimiento de *Pseudomonas putida* en medio sintético

En la figura 13 se muestra la cinética de crecimiento en medio sintético para *Pseudomonas putida*. La determinación de la concentración de biomasa en la Figura (13.a) se realizó por el método de turbidimetría (DO) y en la Figura (13.b) por Unidades Formadoras de Colonias.



a) Cuantificación de Biomasa por densidad óptica (Abs)



b) Cuantificación de Biomasa por UFC

Figura 13. Cinética preliminar de crecimiento de *P. putida* en medio sintético

La cinética de crecimiento bacteriano en medio sintético muestra un tiempo de latencia de aproximadamente cuatro horas, mientras que la fase de crecimiento exponencial se da entre las cuatro y ocho horas, y a partir de las ocho horas se presenta la fase estacionaria. Con la medida de la turbidez se puede observar la fase de muerte, debido a la ausencia de sustrato el cual se consume por completo a la octava hora.

Los valores de los parámetros cinéticos obtenidos para el pool de *Pseudomonas putida* en el medio sintético con fenol como única fuente de carbono fueron la constante específica de crecimiento (μ) igual a $0,2747 \text{ h}^{-1}$, tiempo de duplicación (t_d) de 2,52 h y la biomasa al final de la fase estacionaria (X_f) de 40,71 mg/l.

Con la medida indirecta de la turbidez se obtienen resultados rápidos que muestran al instante el avance de la cinética y las fases de crecimiento. Con las unidades formadoras de colonias se observa la tendencia creciente de biomasa, midiendo sólo las células viables. Sin embargo, los resultados son lentos (18 a 24 horas) y no permiten una visualización inmediata del crecimiento.

A fin de poder utilizar la absorbancia como una medida rápida y sencilla de la concentración de biomasa, se aprovechan los puntos de la fase de crecimiento exponencial para elaborar una curva estándar que relacione las medidas indirectas de densidad óptica (absorbancia) con las medidas directas de recuento en placa (UFC/ml). En la Figura 14, se muestra la curva estándar para la medición de biomasa de las *Pseudomonas putida*.

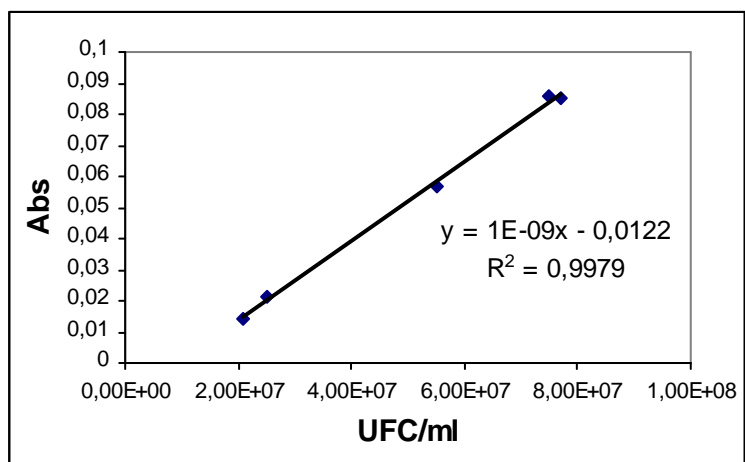


Figura 14. Curva estándar relación entre UFC/ml y Turbidez (Abs).

3.2. Cinéticas de degradación y biodegradación de fenol en medio real

Para evaluar los métodos empleados como determinación de biomasa en el medio real, se determinó la concentración de fenol en las aguas residuales provenientes de la PTAR de la refinería de petróleo en Barrancabermeja. Debido a las interferencias presentes en el medio, fue necesaria una previa destilación de la muestra según el método estándar para la determinación de fenol (APHA, 1995). La muestra se tomó a la entrada de la etapa de tratamiento biológico.



Figura 15. Planta de tratamiento de aguas residuales, tratamiento biológico.

La concentración de fenol en las muestras fue de 286,5 ppm. Las cinéticas en el laboratorio se realizaron con concentraciones iniciales de fenol menores a 100 ppm, debido al largo tiempo necesario para la remoción de concentraciones tan altas.

Para eliminar el hidrocarburo persistente se filtró el agua con filtros y membranas de diferente diámetro de poro. Se intentó eliminar las interferencias grandes con papel filtro y una membrana de poro más fino, pero superior al diámetro de las células, lo cual permitiría eliminar otras interferencias menores (papel micro fibra de vidrio Whatman, poro 5 μm). Sin embargo, las pruebas mostraron resultados diferentes: se midieron las UFC/ml antes y después de la separación, con sólo el filtro inicial se perdieron grandes cantidades de bacterias y con la membrana, el número de bacterias se redujo considerablemente (Tabla 6).

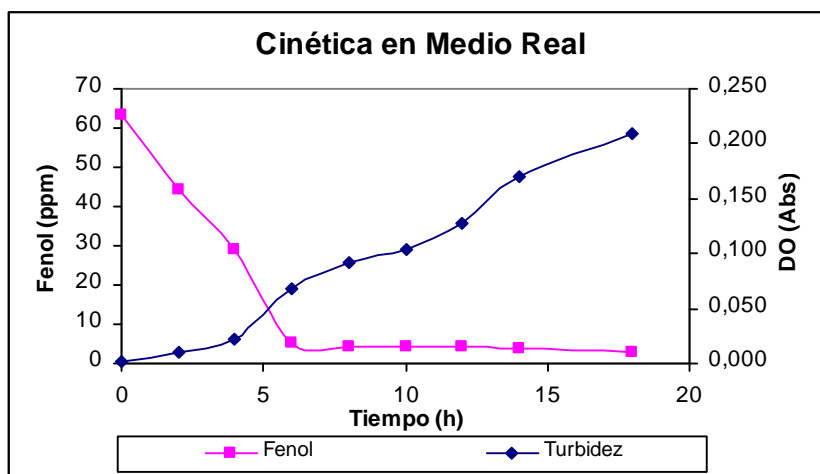
Tabla 6. Resultados eliminación de interferencias con membranas.

Filtro	Antes UFC/ml	Después UFC/ml
Cuantitativo	15×10^7	6×10^5
Membrana	15×10^7	$1,3 \times 10^4$

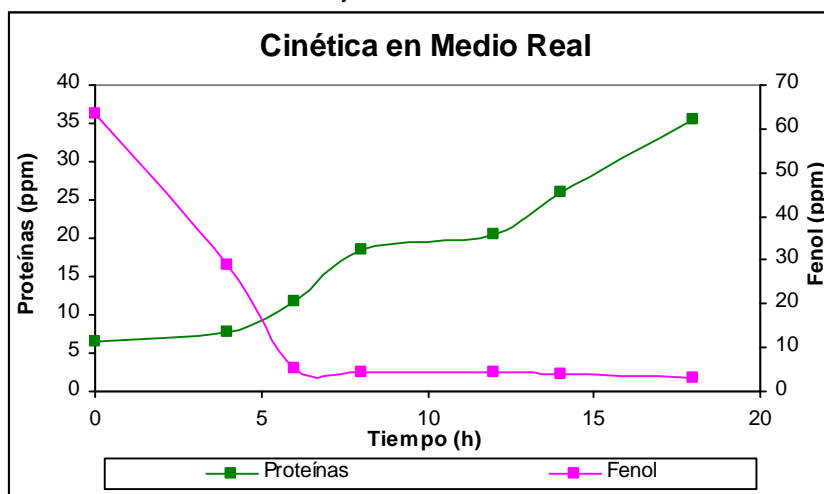
Por otro lado, también se hicieron pruebas para separar el hidrocarburo mediante la extracción con solventes: Con el diclorometano las bacterias murieron, mientras que con el n-hexano se obtuvieron resultados positivos al eliminar el hidrocarburo

y no variar significativamente el número de células después de la extracción. Por consiguiente, se implemento la extracción con hexano como tratamiento previo a la medición de concentración bacteriana por los diferentes métodos.

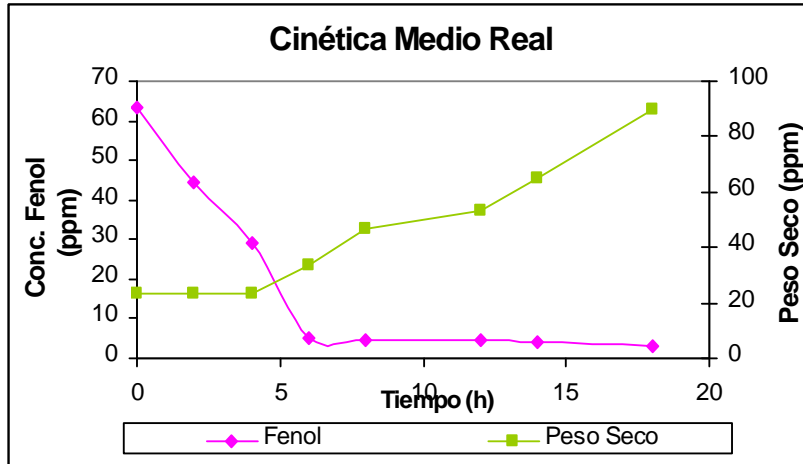
La Figura 16 muestra la cinética de crecimiento en medio real (ver Figura16.a). En este caso, la biomasa fue medida como la turbidez (OD) del medio después de realizar la extracción con hexano. En la Figura 16.b se muestra la evolución de la biomasa en el cultivo en relación con la concentración de proteínas solubles. En la Figura 16.c, se muestra la variación de biomasa en el tiempo mediante la medida directa del peso seco, y en la 16.d con el método microbiológico de unidades formadoras de colonias.



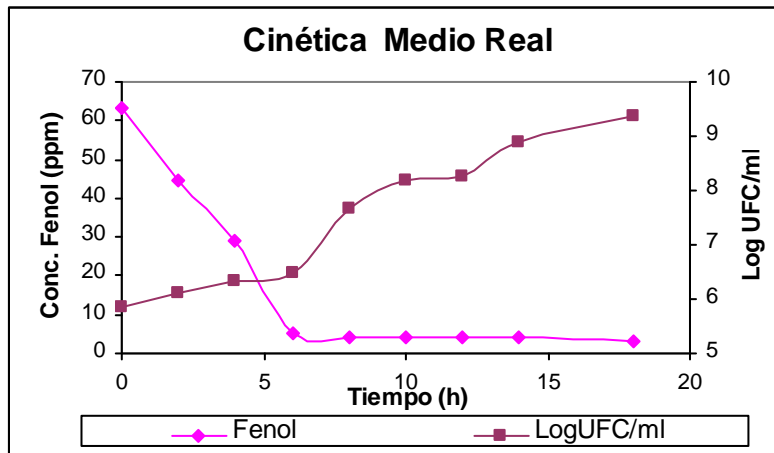
a) Turbidez OD



b) Concentración proteica



c) Peso Seco



d) Log UFC/ml

Figura 16. Cinética de crecimiento de *Pseudomonas* en medio real.

El crecimiento bacteriano muestra una fase de latencia de cuatro horas, a partir de esta hora se observa el crecimiento exponencial hasta las 18 horas. La fase estacionaria no se alcanzó a observar antes de las 18 horas. El mayor tiempo necesario para alcanzar la fase estacionaria, aunque se hubiese consumido el fenol a las seis horas, es debido a que en este tipo de aguas existen otros tipos de hidrocarburos que pueden servir como sustrato para las *Pseudomonas putida*, a diferencia de la cinética en medio sintético donde el crecimiento está delimitado sólo por el fenol reactivo agregado al medio.

Los parámetros de crecimiento evaluados se resumen en la tabla 7. La velocidad de crecimiento determinada mediante la técnica de recuento en placa, es mayor que la velocidad determinada mediante el peso seco y la concentración de proteínas. Esto es debido a que se necesita mayor tiempo para la duplicación (t_d) del peso, debido a que la diferencia de peso en las células es marcada con grandes cantidades de bacterias, mientras que con el recuento en placa es posible determinar el tiempo de duplicación en función del número de individuos.

Tabla 7. Parámetros de crecimiento bacteriano del pool de *Pseudomonas putida* en el medio real con fenol.

Técnica	Velocidad de Crecimiento (μ)	Tiempo de duplicación (t_d)	Biomasa final (X_f)
Recuento de colonias	$0,510 \times h^{-1}$	1,35 h	$2,33 \times 10^9$ UFC/ml
Peso Seco	$0,093 \times h^{-1}$	7,45 h	90,0 ppm
Proteínas	$0,099 \times h^{-1}$	7,00 h	35,4 ppm

3.3 Evaluación de los diferentes métodos para la determinación de biomasa

En cada punto de la cinética anterior, se midieron paralelamente los métodos ensayados como alternativas para la determinación de biomasa. Se realizaron comparaciones y se encontraron diferentes factores de conversión con buenas correlaciones entre ellos.

3.3.1 Método directo de conteo de colonias por gota

Uno de los propósitos de este trabajo es encontrar un método que reemplace el método de conteo de colonias por uno más práctico, que arroje unidades de masa del cultivo y en menores tiempos de trabajo. Sin embargo, el recuento en placa se midió junto con los otros métodos ensayados, con el fin de correlacionarlos con

una medida directa que indique el número individuos vivos. Esta técnica tiene la ventaja de mostrar un cambio representativo en cada una de las muestras tomadas en el tiempo. A diferencia del peso seco que es poco significativo entre mediciones.

Se debe tener en cuenta que una UFC puede estar compuesta por más de un individuo, lo cual se debe a que ciertas bacterias forman agrupaciones de 2 o más células. Entonces el recuento no se refiere a las células viables reales, si no a unidades formadoras de colonias, que puede corresponder a dos o más individuos que estaban juntos al ser sembrados en la placa.

La correlación entre Log UFC/ml y Peso Seco (Ver Figura 17), permite convertir los datos del método microbiológico, en unidades de masa del cultivo que si pueden incluirse en las ecuaciones cinéticas que describen el proceso. La relación encontrada funciona para concentraciones de bacterias altas.

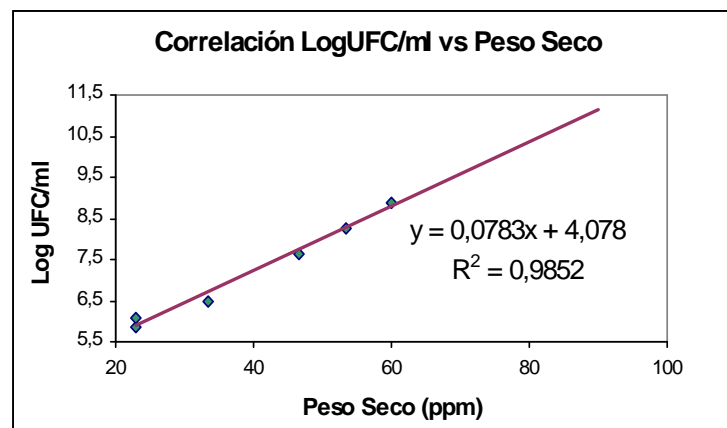


Figura 17. Correlación LogUFC/ml vs Peso Seco (ppm)

La relación que se muestra a continuación entre el Log UFC/ml y la concentración de proteína, muestra una buena correlación con el método directo, indicando la confiabilidad de los parámetros medidos. (Figura 18)

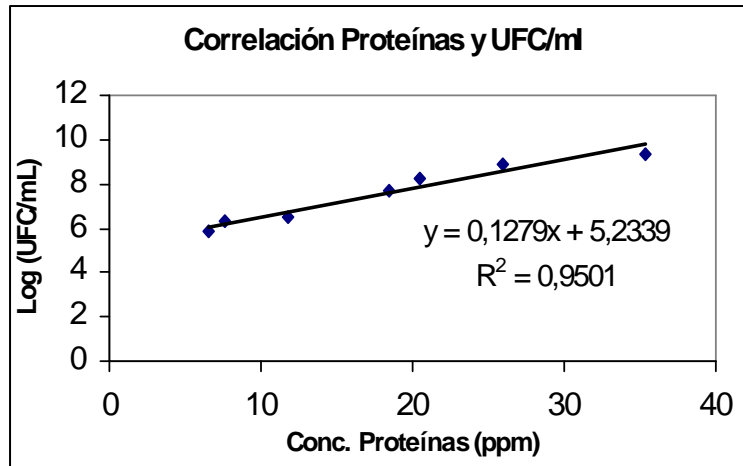


Figura 18. Correlación LogUFC/ml vs Proteínas (ppm)

3.3.2 Concentración de proteínas

La proporcionalidad entre la absorbancia y la concentración de proteína presente en las células mostró ser bastante sensible, con resultados prácticos y rápidos como medida del crecimiento bacteriano en ambientes naturales (Ver Figura 16 b). Para aumentar la sensibilidad del método se realizaron concentraciones de la muestra y seguidamente se realizó la extracción de las proteínas. Los valores obtenidos de absorbancia a 595 nm se interpolaron en la curva de calibración con solución estándar de ovoalbúmina (Ver Anexo A.1). Teniendo en cuenta que el contenido de proteína obtenido no corresponde al total de biomasa, fue necesaria la correlación entre la concentración de proteínas y el peso seco de un volumen conocido de muestra. Los resultados muestran que el contenido de proteínas corresponde al 30% en peso seco. En la figura 19 se muestra esta relación y la buena correlación lineal que presenta ($r^2 = 0,996$).

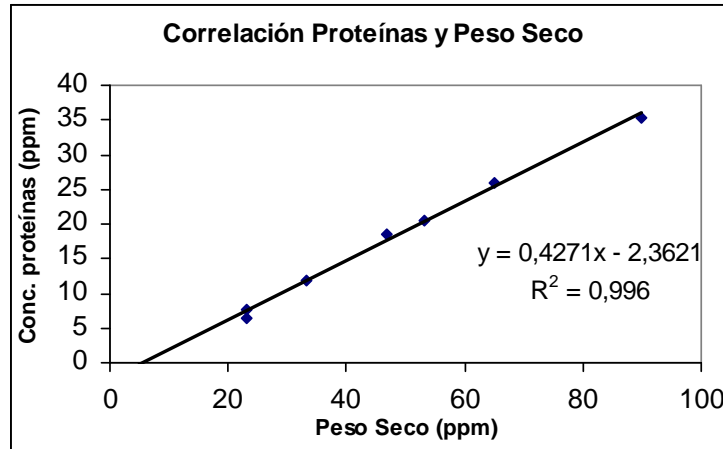


Figura 19. Curva relación entre concentración de proteínas y peso seco.

3.3.3 Turbidez, Densidad óptica

La turbidez mide la opacidad del líquido del cultivo bacteriano, como una estimación del total de bacterias, vivas y muertas. A medida que la concentración celular aumenta, el cultivo se hace más turbio y se reduce la cantidad de luz transmitida debido a la difracción de la luz por parte de las células (Agatángelo, 2007). La relación entre la turbidez y las UFC difieren para cada organismo. Por lo tanto, es necesario elaborar curvas para cada tipo de bacterias (Figura 14). Dicha turbidez es una medida indirecta del número de células y su incremento es una indicación del crecimiento bacteriano. Estas suspensiones no deben tener una absorbancia mayor a 0.3 ya que valores mayores producen desviaciones de la ley de Beer. La absorbancia se correlacionó linealmente con el peso seco como se muestra en la Figura 20.

El método es simple y no destructivo, pero la sensibilidad está limitada aproximadamente a 10^7 UFC por mililitro.

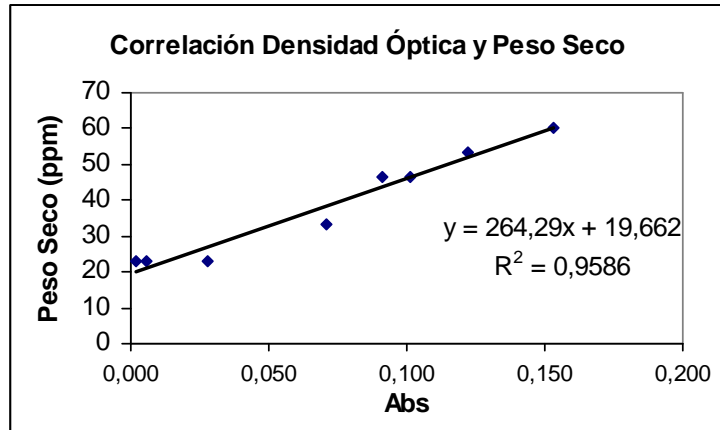


Figura 20. Correlación lineal entre Turbidez y Peso Seco

3.3.4 Determinación de biomasa por peso seco

Esta técnica de medida directa tiene la desventaja de ser confiable solo para grandes concentraciones de células, como sensibilización del método, se realiza una concentración previa de la muestra aumentando así la cantidad de bacterias en los mililitros de la solución. Esto es necesario debido a que diferencias del orden de los miligramos representan el peso de un gran número de bacterias.

Es importante hacer curvas de calibración con otros métodos que sean más rápidos y más sensibles, por que la variación de biomasa en miligramos es poco significativa entre una medición y otra.

3.4 Ventajas y desventajas de los métodos ensayados

En la tabla 8 se resumen las ventajas y desventajas que presenta cada método analizado.

Tabla 8. Ventajas y Desventajas de los métodos para la determinación de Biomasa.

Método	Ventaja	Desventaja
Conc. Proteínas (ppm)	Sensible, rápido, práctico, económico, Unidades de masa.	Se debe concentrar y hacer un pretratamiento a la muestra.
Densidad Óptica (Abs)	Muy rápido, económico y sencillo.	Indirecto, funciona solo en suspensiones diluidas.
Peso Seco (ppm)	Económico, sencillo, medidas directas en masa.	Lento, No es sensible, Variación poco significativa.
ATP Bioluminiscencia (URL)	Muy rápido, sensible, mide células vivas.	Indirecto, Resultados Fluctuantes, No sirve para concentraciones altas de bacterias, muy costoso.
Recuento en Placa (UFC/ml)	Medidas directas, cambios notables, mide células viables.	Muy lento, Fluctuante, relativamente costoso, No aplicable en ecuaciones por las unidades.

3.5 Determinación de la ruta probable de biodegradación del fenol mediante *Pseudomonas putida*

Como medida integral del trabajo de investigación y el desarrollo de tecnologías efectivas en la biodegradación de compuestos contaminantes, es importante conocer y entender los aspectos metabólicos involucrados en la biotransformación de esta clase de compuestos. En este caso, el mecanismo de conversión aeróbica del fenol mediante el ataque de enzimas especializadas que tienen las *Pseudomonas putida*.

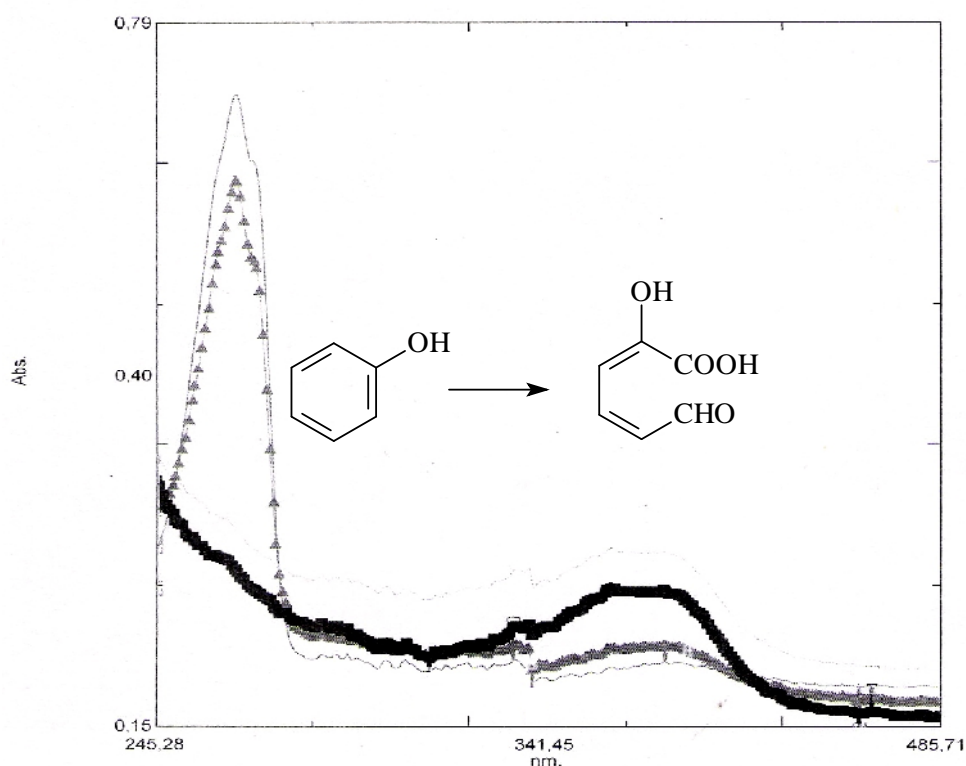


Figura 21. Medida del metabolito intermediario 2-Hiroximucónico semialdehído (2-HMS) en la biotransformación del fenol mediante *P.putida*.

En la figura 21 se observa el espectro obtenido como seguimiento de la biodegradación a diferentes tiempos, la línea continua (—) indica las 0 horas, la línea con triángulos (---) representa las 12 horas y la línea gruesa () indica las 25 horas.

Al igual que otros investigadores se determinó que la biodegradación de fenol se realiza vía meta, por acción de la enzima Catecol-2,3-dioxigenasa (Sayed et al, 2003; Sahar, 2006; Schmidt et al, 1983). La bioconversión de fenol al intermediario 2- hidroximucónico semialdehído fue medida como el aumento de absorción a 375 nm y la disminución de absorción del fenol a 298 nm a diferentes tiempos (Sayed et al, 2003) (Figura 21). Sin embargo, existen excepciones donde la escisión vía meta para algunos mono-clorofenoles como el 2- y 3-clorofenol da lugar a un callejón sin salida por la desactivación de la enzima catecol-2,3-dioxigenasa, lo cual se evidencia por la acumulación del 3-clorocatecol, demostrando la necesidad de la orto-escisión para el éxito de la degradación completa. A diferencia del 4-clorofenol que sí logra una biotransformación vía meta en 5-cloro-2-hidroximucónico semialdehído, compuesto que puede ingresar al ciclo metabólico de la bacteria y mineralizarse completamente (Farrell y Quilty, 1999).

4. CONCLUSIONES

- Se evaluó e implementó a nivel de laboratorio técnicas alternativas al método microbiológico de conteo de colonias. La concentración de proteínas y la turbidez del medio, constituyen herramientas rápidas que permiten el seguimiento del proceso en tiempos reales y favorecen la toma de decisiones.
- Se encontró una técnica sencilla para eliminar el hidrocarburo persistente en las aguas de la Planta de tratamiento de la refinería de Petróleo, el cual interfería en la determinación de la concentración bacteriana. Se implementó la extracción con n-hexano como tratamiento previo a la cuantificación de biomasa, el cual es un solvente que no altera la viabilidad de las bacterias.
- Para la determinación del peso seco y la concentración de proteínas es necesario una concentración previa de las células que aumente la sensibilidad de los métodos. Los dos mostraron una buena reproducibilidad y fácil manejo de las muestras.
- La estimación de biomasa mediante la determinación de ATP por bioluminiscencia no mostró buenos resultados como medida de crecimiento bacteriano en la biodegradación de fenol, debido a que la luz producida supera el límite máximo de detección del equipo utilizado HY LITE®. En consecuencia, no se recomienda este método, ya que es generalmente usado como medida de higiene en la industria de alimentos y de salud donde se manejan concentraciones bajas de microorganismos, comparadas a las altas concentraciones que se alcanzan en los procesos de biodegradación de compuestos contaminantes.
- De las correlaciones obtenidas se encontró una ecuación que relacionará el método directo de UFC/ml con el método directo del peso seco, la cual es

útil para convertir las unidades del método directo en unidades de masa (ppm), unidades adecuadas para ser incluidas en el modelo matemático desarrollado.

- Se encontró una buena correlación entre la concentración de proteínas solubles determinadas por el método Bradford y el peso seco. Con esta correlación se podría implementar una nueva forma para la cuantificación de biomasa mediante el método de Bradford, aplicable a ambientes naturales, más práctico, rápido y sensible. Además se encontró que el contenido de proteínas con respecto al peso seco corresponde a un 33,22 % extracción con buffer de lisis y un 24,56 % de proteínas extracción básica.
- El estudio de la ruta probable de biodegradación del fenol es útil como guía para investigaciones posteriores que se especialicen en el estudio del metabolismo de las bacterias y en las enzimas involucradas en el catabolismo de los compuestos fenólicos. Se encontró que la mezcla de cepas de *Pseudomonas Putida ICP 16, ICP18 y ICP 21*, degradarían los compuestos fenólicos vía meta, mediante la acción de la enzima Catecol-2,3 dioxigenasa, las cuales convierten el metabolito intermediario del Catecol en 2-Hidroximucónico semi-aldehído, el cual fue determinado cualitativamente por espectrofotometría UV-visible.

5. RECOMENDACIONES

En la presente investigación se propone una posible ruta de biodegradación del fenol mediante las cepas *Pseudomonas putida* especializadas en el proceso, la cual se llevaría a cabo vía meta por la acción de la enzima Catecol-2-hidrogenasa, se propone un estudio de la actividad enzimática de dicha enzima y el análisis proteómico mediante electroforesis en una y dos dimensiones. Además se recomienda complementar el estudio metabólico mediante el análisis de metabolitos en el tiempo mediante Cromatografía líquida de alta eficacia HPLC.

6. BIBLIOGRAFÍA

Abd, S., Hung, G., Hassan, M., Abdul, M., Samat, N., (2008) Indirect Method for quantification of cell biomass during solid-state fermentation of palm kernel cake based on protein content, *Asian Journal of Scientific Research* 1 (4): 385-393.

Agatángelo Joaquin. (2007). Estudio del comportamiento cinético de microorganismos de interés en seguridad alimentaria con modelos matemáticos, Universidad autónoma de Barcelona, Facultad de Veterinaria, Barcelona, España.

APHA, Standard methods for the examination of water and wastewater, 16th ed. Washington, ED, USA: American Public Health Association/American Water Works Association: 1995.

Aquihuatl María de los Angeles, Pérez María. (2004) Manual de prácticas del Laboratorio de Microbiología, Universidad Autónoma de México, Primera Edición, p. 63-65.

Aycicek, H., Oguz, U., Karci, K., (2006) Comparison of results of ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing methods for the determination of surface cleanliness at a hospital kitchen, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 209, p. 203–206

Begot C., Desnier I., Daudin J.D, Labadie J.C., Lebert A. (1996). Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements, *Journal of Microbiological Methods*, 25, 225-232.

Bradford M., (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry* 72, 248-254

Bratbak, G., Dundas I., (1984) Bacterial Dry Matter Content and Biomass Estimations, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 48, No. 4, p. 755-757.

Burgos, C., Murillo, L., Gutiérrez, I., Arias, J. (2002) Comparación de los Métodos de Bioluminiscencia y Recuento en Placa como control de calidad en producto terminado de bebida de malta y refrescos pasteurizados en una empresa de Bogotá D.C. *Revista de la facultad de farmacia Vol. 43, 2002, 25- 28.*

Carrillo, E., Ruiz, A., Yeomans, H. (2004) Aislamiento, Identificación y Evaluación de un cultivo mixto de microorganismos con capacidad para degradar DDT, *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, Vol. 20, No. 002, México, p. 69-75.

Costa, P.D; Andrade N.J.; Cardoso S.C; Vieira F.J.; Ferreira N.F., (2006) ATP-bioluminescence assay as an alternative for hygiene-monitoring procedures of stainless steel milk contact surfaces. *Brazilian Journal of Microbiolgy*. vol. 37 p. 345-349.

Devlin Thomas M., Dabán Montserrat. (1999) Bioquímica: Libro de texto con aplicaciones clínicas, Tercera Edición, Reverte, Vol. 1, p. 129-130.

Farrell, A., Quilty, B., (1999) Degradation of mono-chlorophenols by a mixed microbial community via a meta- cleavage pathway, *Biodegradation* 10: 353–362.

Glazer Alexander, Nikaido Hiroshi, (1998). *Microbial biotechnology, Fundamentals of Applied Microbiology*, University of California, Berkeley, Freeman and Company, New York, p. 590- 596.

Gil P., Giraldo C. (2005) Proceso “acoplado” Físico-Químico y Biotecnológico para el Tratamiento De Aguas Residuales Contaminadas Con Cianuro, Universidad EAFIT, Medellín.

ICP, MSC1 2001. Manual de procedimientos técnicos. Laboratorio de biotecnología ICP, Piedecuesta, Santander.

Kulkarni Meenal, Chaudhari Ambalal. (2006) Biodegradation of p-nitrophenol by *P.putida*, *Bioresource Technology*, 97, 982-988.

Kumar A., Kumar S., Kumar. Surendra. (2005) Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *pseudomonas putida* MTCC 1194. *Biochemical Engineering Journal* 22, 151-159.

Larson^a E., Aiello A. E., Gomez C., Lin S., Lee L., Della P., Lindhardt C. (2003) Bioluminescence ATP monitoring as a surrogate marker for microbial load on hands and surfaces in the home, *Food Microbiology* 20, 735–739

Loh Kai-Chee, Cao Bin. (2008) Paradigm in biodegradation using *Pseudomonas putida*- A review of proteomics studies, *Enzyme and Microbial Technology*.

Madigan, M.T, J.M., Martinko, J., Parker. Brock. (2003) *Biología de los Microorganismos*. 10^a edición. Prentice-Hall Iberia, Madrid. p 138-158

Manual de procedimientos técnicos (MPT). (2007), MSC12001. Laboratorio de biotecnología ICP. Piedecuesta. Santander.

Manual, Procedimiento para el uso, manejo y monitoreo de limpieza por el sistema Hy Lite 2 , Merck, Bogotá, 2004.

Martínez M^a. A., Barajas C.A, Ortiz C.C, Ramírez N.E, Blanco C., Torres R. (2008) Desarrollo de un modelo matemático y de simulación del proceso de biotransformación de fenol en aguas residuales industriales, que permita identificar oportunidades de mejoramiento en el bioproceso de remoción de fenol de las refinerías de Barrancabermeja (GCB) y de Cartagena (GRC). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.

Monteiro Á., Boaventura R., Rodrigues A. E. (2000) Phenol biodegradation by *Pseudomonas putida* DSM 548 in a batch reactor *Biochemical Engineering Journal* 6, 45–49.

Norma de calidad ambiental y de descarga de Efluentes: Recurso Agua, (1993), República de Colombia.

Reardon K. F., Mosteller D. C., Bull J. D. (2000) Biodegradation Kinetics of Benzene, Toluene, and Phenol as Single and Mixed Substrates for *Pseudomonas putida* F1, *Biotechnology and Bioengineering*, vol 69 N° 4, 2000. 385-400.

Román Rivera E.U. (2006) The Effectiveness of the firefly rapid method in determining sanitation procedures at a tuna processing plant, University of Puerto Rico, Mayagüez campus.

Romero Rojas, Jairo A. (2004). Tratamiento de Aguas residuales, teoría y principios de diseño. Colombia. Editorial Escuela Colombiana de Ingeniería, p. 226-232.

Ojumu, T.V., Bello, O., Sonibare, J.A., Solomon, B.O. (2005) Evaluation of microbial systems for bioremediation of petroleum refinery effluents in Nigeria *African Journal of Biotechnology* Vol. 4(1), 31-35.

Okutucu B., Dýnçer A., Habib O., Zýhnyýoglu F. (2007). Comparison of five methods for determination of total plasma protein concentration, *J. Biochem. Biophys. Methods* 70, 709–711

Potter, N.N., Hotchkiss, J. H (1999) *Ciencia de los alimentos*, editorial Acribia, Zaragoza, España.

Sahar S., (2006) Detection of meta- and ortho-cleavage dioxygenases in bacterial phenol degraders, *Journal of Applied Sciences & Environmental Management*, Vol. 10, No. 3, p. 75-81.

Sayed W., Ibrahim M., Abu M., Beih F., Ohmura N., Saiki H., Ando A. (2003), Isolation and characterization of phenol- catabolizing Bacteria from a Coking Plant, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67 (9), 2026-2029.

Schmidt, E.,¹ Hellwig, M., Knackmussl, H. J. (1983) Degradation of Chlorophenols by a Defined Mixed Microbial Community, *Applied And Environmental Microbiology*, Vol. 46, No. 5, p. 1038-1044.

Silva Vargas, M. E., (2000) Preconcentración Selectiva de Fenoles Contaminantes Prioritarios y Determinación por Espectrofotometría Ultravioleta-Visible, Cromatografía Líquida De Alta Eficacia Y Cromatografía de Gases y espectrometría De Masas, Tesis doctoral, Universidad Complutense De Madrid Madrid, 2000.

Sinclair C.G., Kristiansen B. (1987) *Fermentation kinetics and modeling*. Ed. J.D. Bu'Lock. Open University Press.

Stanier Roger Y., Villanueva Julio R., Guerrero Ricardo, (1996) *Microbiología*, Edición 2, Editorial Reverté S.A, p. 196-198.

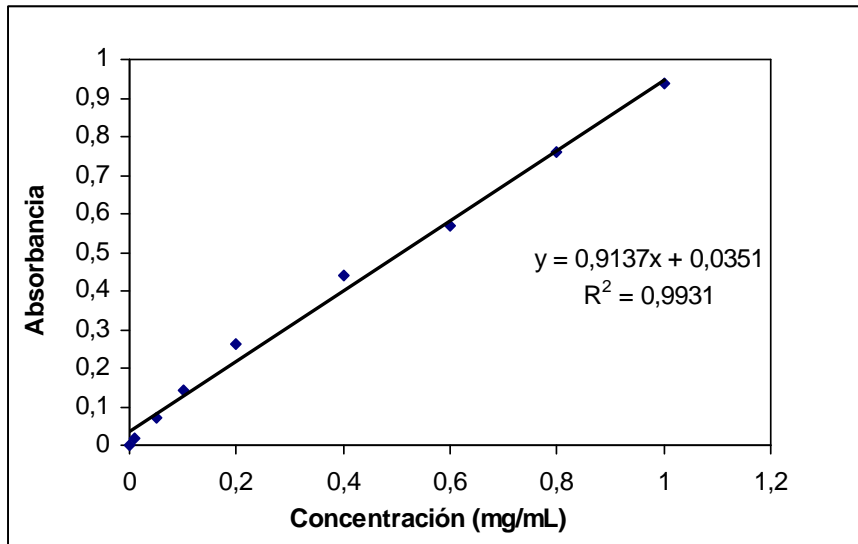
Stickland Lh, J. *Gen Microbiol.* 5(4), 698-703, Oct 1951.

Suárez Rodríguez Mónica. (1993). Degradación de los ácidos 3- y 4- Hidroxibenzoico en *Klebsiella pneumoniae*: Purificación, caracterización y propiedades de las hidroxilasas. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

Sullivan J.B., Krieger G. (2001). Clinical environmental health and toxic, second Edition, illustrated, Lippincott Williams & Wilkins, p. 1248-1250

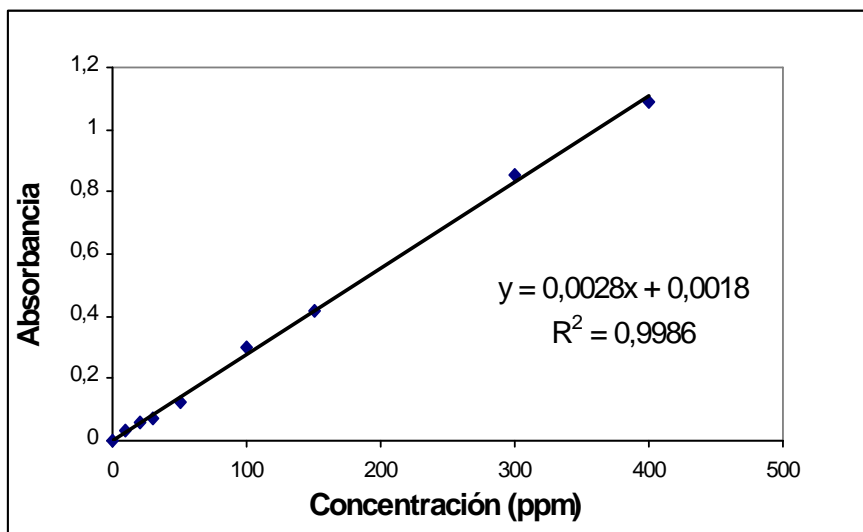
ANEXO A

Anexo A. 1 Calibración Del Método de Bradford



Conc. mg/ml	Abs
0	0
0,01	0,018
0,05	0,072
0,1	0,143
0,2	0,263
0,4	0,442
0,6	0,571
0,8	0,758
1	0,936

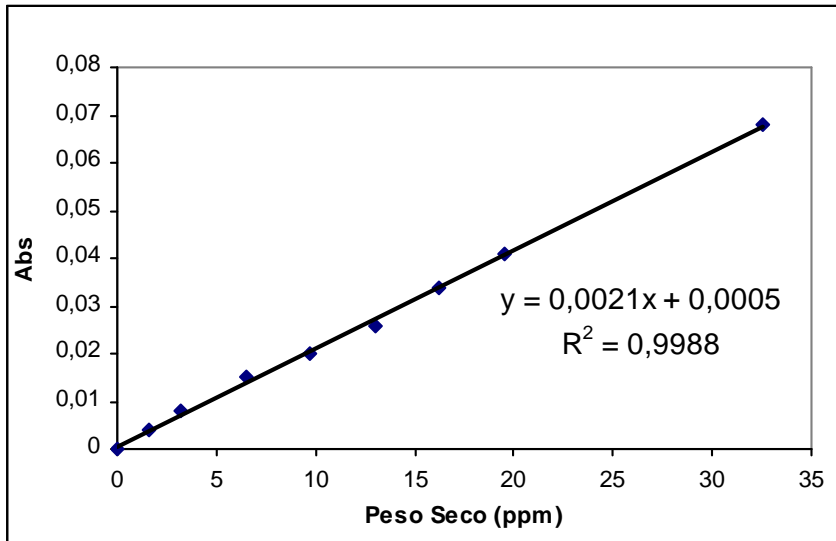
Anexo A. 2 Calibración determinación de fenol con el método colorimétrico de la 4-aminoantipiridina.



Fenol ppm	Abs
0	0
10	0,031
20	0,061
30	0,074
50	0,123
100	0,3
150	0,419
300	0,854
400	1,091

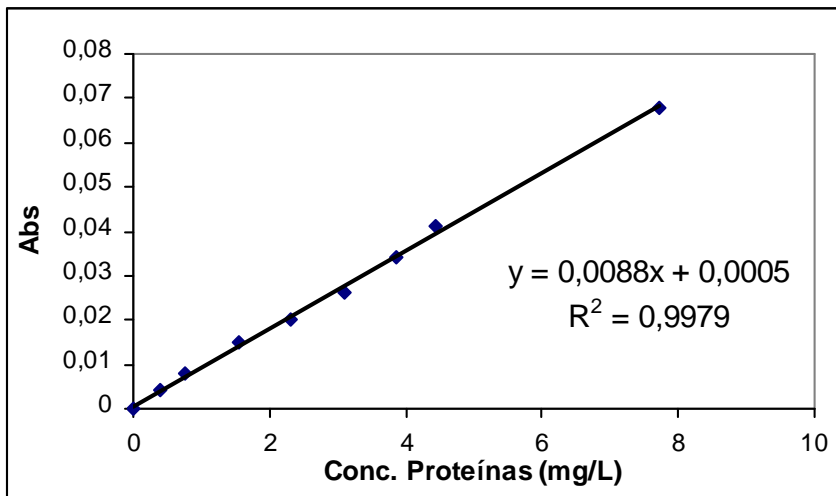
ANEXO B

Anexo B.1 Curva de Calibración Peso Seco con Densidad Óptica



P. Seco ppm	Abs
0	0
32,5	0,068
19,5	0,041
16,25	0,034
13	0,026
9,75	0,02
6,5	0,015
3,25	0,008
1,625	0,004

Anexo B. 2 Curva de calibración Concentración de Proteínas con Densidad Óptica



Conc. Proteínas ppm	Abs
0	0
7,73	0,068
4,438	0,041
3,865	0,034
3,092	0,026
2,319	0,02
1,546	0,015
0,773	0,008
0,3865	0,004

ANEXO C

Anexo C. 1 Resultados de la cinética de biodegradación de fenol en medio sintético

Tiempo	pH	Fenol ppm	DO (abs)	UFC/mL
0	6,91	48	0,014	21000000
2	6,89	24,7	0,014	-
4	6,9	21,1	0,021	25000000
6	6,79	6	0,057	-
8	6,78	0	0,086	75000000
10	6,65	0	0,085	77000000
12	6,75	0	0,078	87000000
13	6,75	0	0,072	147000000
14	6,75	0	0,073	157000000

Anexo C. 2 Resultados de la cinética de biodegradación de fenol en medio real (PTAR)

Tiempo (h)	DO (Abs)	Fenol Abs	Fenol (ppm)	Log UFC/mL	Proteínas	Peso seco
0	0,002	0,179	63,3	5,84	7,3	23
2	0,006	0,126	44,4	6,1		23
4	0,028	0,083	29	6,32	8,6	23
6	0,071	0,016	5,1	6,47	13,1	33,3
8	0,091	0,014	4,4	7,65	20,6	46,7
10	0,101	0,014	4,4	8,19		46,7
12	0,122	0,014	4,4	8,4	22,8	53,3
14	0,153	0,013	4	8,88	28,8	60
18	0,170	0,01	3	9,37	39,4	90