

BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS EMPLEANDO
Pseudomonas sp.

ASTRID CAROLINA GÓMEZ MONTIEL

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA

2017

BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS EMPLEANDO
Pseudomonas sp.

ASTRID CAROLINA GÓMEZ MONTIEL

Trabajo de grado presentado para optar por título de Ingeniero Químico

Directora:

VIVIANA SÁNCHEZ TORRES

Ph.D en Ingeniería Química

Codirector:

JORGE ALBERTO ALBARRACÍN ARIAS

Ingeniero Químico

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA

2017

DEDICATORIA

A Dios por darme la vida, por regalarme fortaleza en mis momentos de debilidad y por guiarme para cada día ser mejor persona.

A mi madre Sonia Yasmin Montiel por ser una mujer luchadora y amorosa, por enseñarme todos los valores que se necesitan para ser una gran persona, por entenderme y siempre aconsejarme en los momentos más difíciles.

A mi padre Juan Carlos Gómez por confiar en mí, por su amor, dedicación, esfuerzo, sacrificio y por brindarme la motivación de salir adelante con este proyecto.

Gracias por su apoyo incondicional en todo lo que me he propuesto realizar a lo largo de mi vida, a ustedes les debo lo que soy.

Finalmente, a mis familiares, compañeros y amigos por brindarme el cariño y compañía.

Carolina Gómez Montiel

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Industrial de Santander y principalmente a la Escuela de Ingeniería Química.

A la Facultad de Ingenierías Físicoquímicas por la auxiliatura de Investigación adjudicada para el proyecto.

A mi directora la Dr. Viviana Sánchez Torres por su asesoría, dedicación y guía a lo largo del proyecto.

A la Bióloga Oriana Serna por su apoyo, dirección y conocimientos en el proceso de investigación.

Al grupo de investigación CINBIN por brindarme el espacio y todos los materiales necesarios en el proyecto.

A mis compañeros de laboratorio por todas las experiencias compartidas y por brindarme ánimo en los momentos de dificultad.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	16
1.MARCO TEÓRICO	18
1.1HIDROCARBUROS AROMÁTICOS	18
1.2 <i>PSEUDOMONAS</i>	19
1.3 BIODEGRADACIÓN MICROBIANA DE HIDROCARBUROS	19
1.4 RUTAS METABÓLICAS BACTERIANAS DE DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS	22
1.4.1 Ruta metabólica para la degradación de benceno	22
1.4.2 Ruta metabólica para la degradación de tolueno	22
1.4.3 Ruta metabólica para la degradación de fenol	23
2. METODOLOGÍA	25
2.1 CRECIMIENTO CELULAR DE <i>Pseudomonas sp.</i>	25
2.1.1 Microorganismos y cultivo	25

2.1.2 Prueba de viabilidad	26
2.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD SURFACTANTE	26
2.2.1 Prueba de la gota colapsada	26
2.2.2 Índice de emulsificación	27
2.3 CUANTIFICACIÓN DE LA DEGRADACIÓN	27
2.3.1 Espectrofotometría de absorción	27
2.3.2 Curva de calibración	27
2.3.3 Consumo de hidrocarburo	27
3. RESULTADOS	28
3.1 CRECIMIENTO CELULAR <i>Pseudomonas sp</i>	28
3.1.1 Prueba de viabilidad	31
3.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD SURFACTANTE	33
3.2.1 Prueba de gota colapsada	33
3.2.2 Índice de emulsificación	34
3.3 CUANTIFICACIÓN DE LA DEGRADACIÓN	38

3.3.1 Espectrofotometría de absorción	38
3.3.2 Curvas de calibración	40
3.3.3 Consumo de hidrocarburo	42
4. CONCLUSIONES	45
5. RECOMENDACIONES	46
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
BIBLIOGRAFÍA	53
ANEXOS	58

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Ruta metabólica para la degradación de benceno.	22
Figura 2. Ruta metabólica para la degradación de tolueno.	23
Figura 3. Ruta metabólica para la degradación de fenol.	23
Figura 4. Metodología empleada en el desarrollo del proyecto.	25
Figura 5. Curvas de crecimiento con benceno como única fuente de carbono de a) <i>Pseudomonas stutzeri</i> y b) <i>Pseudomonas putida</i> .	29
Figura 6. Curvas de crecimiento con tolueno como única fuente de carbono de a) <i>Pseudomonas stutzeri</i> y b) <i>Pseudomonas putida</i> .	30
Figura 7. Curvas de crecimiento con fenol como única fuente de carbono de a) <i>Pseudomonas stutzeri</i> y b) <i>Pseudomonas putida</i> .	31
Figura 8. Prueba de viabilidad con fenol como única fuente de carbono de a) <i>Pseudomonas stutzeri</i> y b) <i>Pseudomonas putida</i> .	32
Figura 9. Número estimado de células viables.	33
Figura 10. Gota colapsada con fenol como única fuente de carbono para <i>Pseudomonas putida</i> transcurridos 10 minutos.	34

Figura 11. Prueba del índice de emulsificación (%E24) para <i>Pseudomonas stutzeri</i> con fenol como única fuente de carbono.	35
Figura 12. Índice de emulsificación (%E24) con benceno como única fuente de carbono.	36
Figura 13. Índice de emulsificación (%E24) con tolueno como única fuente de carbono.	36
Figura 14. Índice de emulsificación (%E24) con fenol como única fuente de carbono.	37
Figura 15. Espectro de absorción para benceno.	38
Figura 16. Espectro de absorción para tolueno.	39
Figura 17. Espectro de absorción para fenol.	39
Figura 18. Curvas de calibración de benceno.	40
Figura 19. Curva de calibración de tolueno.	41
Figura 20. Curva de calibración de fenol.	41
Figura 21. Consumo de benceno.	42
Figura 22. Consumo de tolueno.	43
Figura 23. Consumo de fenol.	44

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Características fisicoquímicas, estructurales y toxicidad de los hidrocarburos	58
Anexo B. Medios de cultivo	59
Anexo C. Prueba de viabilidad	60
Anexo D. Gota colapsada	62
Anexo E. Índice de emulsificación	65
Anexo F. Consumo de hidrocarburos	67

LISTA DE ABREVIATURAS

DO	Densidad óptica
E24	Índice de emulsificación
LB	Medio Luria Bertani
M9	Medio mínimo salino
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

RESUMEN

TÍTULO: BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS EMPLEANDO *Pseudomonas sp.**

AUTORES: ASTRID CAROLINA GÓMEZ MONTIEL**

PALABRAS CLAVE: Biodegradación, benceno, tolueno, fenol, *Pseudomonas*

DESCRIPCIÓN:

El benceno, tolueno y fenol son hidrocarburos volátiles monoaromáticos producidos como materia prima de varias industrias y presentes en zonas con altos índices de contaminación como consecuencia de vertidos de combustibles de origen petrogénico, o por la combustión incompleta de combustibles.

En la presente investigación se desea evaluar la factibilidad de degradación de estos hidrocarburos aromáticos con dos cepas de *Pseudomonas sp.* las cuales se inocularon por 72 horas a condiciones de 30°C y 150 rpm con los hidrocarburos como única fuente de carbono en medio salino mínimo (M9). Se realizó un seguimiento en el crecimiento de las cepas, comprobando que metabolizaron el sustrato. Adicionalmente se hicieron pruebas de viabilidad para estimar el número de células viables al finalizar los cultivos y determinar posible toxicidad de la fuente de carbono, los resultados evidencian toxicidad del benceno y tolueno para *Pseudomonas stutzeri*. Por otro lado, el sobrenadante mostró actividad emulsificante razón por la cual se realizaron pruebas de gota colapsada e índice de emulsificación.

Para cuantificar la degradación se usó espectrofotometría UV-Vis y se realizaron los espectros de absorción de los tres hidrocarburos entre 230 y 300 nm y sus respectivas curvas de calibración. Finalmente, se calcularon los porcentajes de consumo obteniendo los mejores resultados con *Pseudomonas putida* para tolueno y fenol con 73,86 y 56,61% respectivamente y *Pseudomonas stutzeri* para benceno con 73,45%.

* Proyecto de grado

** Facultad de Físicoquímicas Escuela de Ingeniería Química Directora: Ph.D. Viviana Sánchez Torres Codirector: Jorge A. Albarracín Arias

ABSTRACT

TITLE: BIODEGRADATION OF AROMATIC HYDROCARBONS USING *Pseudomonas sp.**

AUTHORS: ASTRID CAROLINA GÓMEZ MONTIEL**

KEYWORDS: Biodegradation, benzene, toluene, phenol, *Pseudomonas*

Benzene, toluene and phenol are monoaromatic volatile hydrocarbons produced as raw material of various industries and present in areas with high pollution rates as a result of discharges of petrogenic fuels or by the incomplete combustion of fuels.

This research is intended to evaluate the feasibility of degradation of these aromatic hydrocarbons with two strains of *Pseudomonas sp.* which were inoculated for 72 hours to conditions of 30 °C and 150 rpm with hydrocarbons as the only source of carbon in minimum saline medium (M9). We tracked the growth of the strains, checking that they metabolized the substrate. Additionally, feasibility tests were made to estimate the number of viable cells at the end of the crops and to determine possible toxicity of the carbon source, the results show the toxicity of benzene and toluene for *Pseudomonas Stutzeri*. On the other hand, the supernatant showed emulsifying activity which is why tests were carried out for drop collapsed and index of emulsification.

To quantify degradation, UV-Vis spectrophotometry was used and the absorption spectra of the three hydrocarbons were performed between 230 and 300 nm and their respective calibration curves. Finally, the percentages of consumption were calculated obtaining the best results with *Pseudomonas putida* for toluene and phenol with 73.86 and 56.61% respectively and *Pseudomonas stutzeri* for benzene with 73.45%.

* Project of grade

**Faculty of Engineering Physicochemical School Engineering Chemical Directora: Ph.D. Viviana Sánchez Torres Codirector: Jorge A. Albarracín Arias.

INTRODUCCIÓN

Aproximadamente cincuenta litros de agua limpia son utilizados diariamente por los seres humanos para llevar a cabo todas sus actividades cotidianas [1]. Según el informe de las Naciones Unidas sobre los recursos hídricos de 2015 el mundo tendrá que enfrentarse a un déficit mundial del 40% de agua para el año 2030, motivo por el cual se determinó que la crisis del agua será el riesgo mundial más preocupante para las personas y las economías en los próximos años [2].

La industrialización aunque ha contribuido al bienestar económico y social, también ha ocasionado significativas pérdidas en los ecosistemas acuáticos debido a grandes descargas de residuos industriales e inadecuado tratamiento de aguas residuales, siendo la principal causante de la contaminación del agua. Se estima que para el año 2050 alrededor del 70% de la población mundial afronte una disminución en el suministro de este recurso, como consecuencia de las actividades industriales [1].

Actualmente la contaminación de recursos hídricos abarca uno de los más grandes problemas ambientales en Colombia, debido a la gran cantidad de sustancias tóxicas que son liberadas por un manejo inadecuado de desechos o de forma accidental como fugas y derrames tanto en industrias como en tuberías de transporte de la industria petroquímica. Razón por la cual surge la necesidad de buscar alternativas para el tratamiento de aguas que contengan hidrocarburos.

La biorremediación es una tecnología utilizada por el hombre para detoxificar diversos contaminantes en fuentes hídricas y suelos, la cual utiliza los

microorganismos y su potencial degradador para eliminar los contaminantes del medio, mediante su transformación en productos como CO_2 y H_2O . Entre todos los tipos de contaminantes, los hidrocarburos son los que han mostrado mejores resultados en la aplicación de esta tecnología; los hidrocarburos provenientes del procesamiento petrolero pueden funcionar como fuente de carbono y de energía para el crecimiento de diferentes microorganismos que pueden de este modo, colonizar los sitios contaminados y degradar el agente contaminante [3].

En este trabajo se busca estudiar la degradación de tres hidrocarburos aromáticos usando dos cepas de *Pseudomonas*, analizando la capacidad de crecimiento de las cepas con los hidrocarburos como única fuente de carbono y adaptando un método para su respectiva cuantificación.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 HIDROCARBUROS AROMÁTICOS

Un hidrocarburo aromático es un hidrocarburo cíclico insaturado que posee las propiedades asociadas al anillo del benceno en el cual hay seis grupos de carbono-hidrógeno, es insoluble en agua, volátil, no polar y en su gran mayoría líquidos a temperatura ambiente. Sus principales fuentes de obtención son la destilación de la hulla y procesos petroquímicos como la destilación catalítica y la destilación del petróleo crudo [4].

Aunque el benceno puede reaccionar para formar productos de adición, su reacción característica es la sustitución donde el hidrógeno es reemplazado ya sea por un elemento o un grupo, como es el caso del metilbenceno e hidroxibenceno.

El tolueno es el nombre común para el metilbenceno, se obtiene principalmente en el petróleo crudo y es materia prima para la producción de poliuretano, disolvente de aceites, resinas, detergentes, medicamentos y TNT [5]. Puede encontrarse en suelos y aguas como consecuencia de derrames de solventes o productos de petróleo, y fugas de tanques de almacenamiento en gasolineras [6]. El fenol es el nombre tradicional para el hidroxibenceno, es producido por plantas de carbón, refinerías e industrias procesadoras de resinas, colorantes y plásticos, debido a su amplio uso se considera un contaminante de aguas agrícolas, residuales domésticas e industriales [7].

Las características fisicoquímicas, estructurales y toxicidad de los hidrocarburos se encuentran en el Anexo A.

1.2 PSEUDOMONAS

Son bacilos Gram negativos, aerobios, que pertenecen a la familia *Pseudomonaceae*, la cual está compuesta por una gran variedad de especies que poseen versatilidad metabólica, habitan en suelos, aguas estancadas y varias especies de animales. Cuentan con una gran capacidad de producir metabolitos útiles tales como alginato, gelano, biopolímeros, entre otros.

Además actúan como agentes de control biológico, se encuentran en materiales orgánicos en descomposición y tienen un importante papel en la degradación de dicho material [8].

En la industria farmacéutica se destacan por la producción de vitamina B_{12} y B_3 , y la conversión de morfina y codeína, en la industria de plásticos son de gran utilidad en la producción de acrilonitrilo. Adicionalmente participan en procesos de biorremediación como la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos incluyendo naftaleno, hidrocarburos aromáticos como tolueno e hidrocarburos alifáticos como n-alcanos [9].

1.3 BIODEGRADACIÓN MICROBIANA DE HIDROCARBUROS

El principio del proceso de degradación está relacionado con el potencial genético del microorganismo en particular para introducir oxígeno molecular en hidrocarburos y crear los intermedios que posteriormente ingresan a la vía metabólica generadora de energía de la célula [10].

Comúnmente, los organismos individuales degradan únicamente una gama limitada de hidrocarburos [11]. Sin embargo, la necesidad de remover de suelos y aguas compuestos orgánicos tóxicos como los hidrocarburos aromáticos: benceno, tolueno y constituyentes básicos de las gasolinas ha impulsado el desarrollo de

tecnologías de biorremediación que generen productos benéficos para la sociedad y el medio ambiente [12].

El principal obstáculo en la biorremediación de hidrocarburos es su baja solubilidad en agua, ya que limita la eficiencia y la velocidad de degradación. Esta restricción se puede superar mediante la adición de un compuesto tensoactivo al medio de crecimiento, el cual hace que los hidrocarburos sean más solubles en agua o mediante la adición de microorganismos degradantes que producen biosurfactantes [13].

El biotensoactivo está directamente involucrado en la eliminación de hidrocarburos del medio ambiente a través de la biodisponibilidad y por consiguiente de la biodegradación de hidrocarburos por contacto directo de la célula [14], por lo tanto se considera que la producción de biosurfactantes está relacionada con la capacidad de los microorganismos para crecer y degradar los hidrocarburos y combustibles [15].

Los biosurfactantes ayudan a contener el problema emulsionando rápidamente el aceite y aumentando el crecimiento microbiano [16]. Un grupo entre estos biosurfactantes prometedores son los ramnolípidos, los cuales son glicolípidos tensoactivos normalmente sintetizados por las bacterias Gram-negativas *Pseudomonas sp.* que pueden utilizarse potencialmente para la biorremediación de suelos y aguas contaminados mejorando la degradación de los hidrocarburos aumentando su biodisponibilidad a microorganismos degradantes [17].

A continuación, se presenta un resumen de algunos estudios relevantes:

En 2005, Otenio *et al*, evaluaron la actividad de degradación de *Pseudomonas putida* CCMI 852 utilizando un medio líquido que contenía benceno, tolueno, xileno

y algunas mezclas de estos. Los resultados mostraron que *P. putida* CCMI 852 fue capaz de metabolizar tolueno y xileno, pero no benceno [18].

En 2006, Kumar *et al*, aislaron una cepa de *Pseudomonas putida* que fue capaz de utilizar HAP como única fuente de carbono y energía. Se observó actividades tensoactivas y emulsionantes indicando que los biosurfactantes se produjeron durante el crecimiento [19].

En 2006, Viggiani *et al*, investigó la bioconversión fenólica por *Pseudomonas stutzeri* OX1 utilizando células libres o inmovilizadas con el objetivo de buscar condiciones operativas óptimas de un proceso de bioconversión continua. Se obtuvo una conversión de fenol superior al 95% [20].

En 2010, Singh y Fukelar aislaron *Pseudomonas putida* MHF 7109 para la biodegradación de benceno, tolueno y o-xileno en concentraciones de 50, 100, 250 y 500 mg L⁻¹ en medio mínimo salino. Los resultados evidenciaron un alto potencial de la cepa utilizada para degradar hidrocarburos aromáticos en un periodo de 48, 96 y 168 h [21].

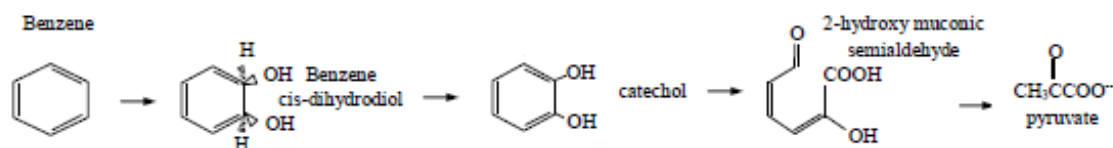
En abril del 2017, Singh y Tiwary aislaron una potente cepa bacteriana degradante de fenantreno y pireno que se identificó como *Pseudomonas stutzeri* y degradó 98% y 92,6% de fenantreno y pireno a una concentración de 1000 mg L⁻¹ y 500 mg L⁻¹ en 7 y 10 días, respectivamente. Adicionalmente la cepa bacteriana produjo biotensoactivo, y el papel del biosurfactante en la degradación de los HAP también se determinó mediante un mayor índice de emulsión y una tensión superficial reducida del medio. Por lo tanto, esta cepa tiene un potencial notable para la aplicación en biorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos [22].

1.4 RUTAS METABÓLICAS BACTERIANAS DE DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS

En la degradación de compuestos aromáticos existen diversos mecanismos, como la hidroxilación, el transporte en la membrana citoplasmática y la escisión del anillo por medio de transformaciones metabólicas. Los aromáticos se oxidan mediante dioxigenasas a cis, cis dihidrodioles que por su inestabilidad pasan a ser rápidamente catecoles [23].

1.4.1 Ruta metabólica para la degradación de benceno. La degradación del benceno es similar a la de los otros aromáticos. El benceno es digerido por las dioxigenasas responsables de la ruptura del núcleo por hidroxilación de manera que la molécula sea químicamente más accesible. Esta reacción se presenta en la Figura 1.

Figura 1. Ruta metabólica para la degradación de benceno.

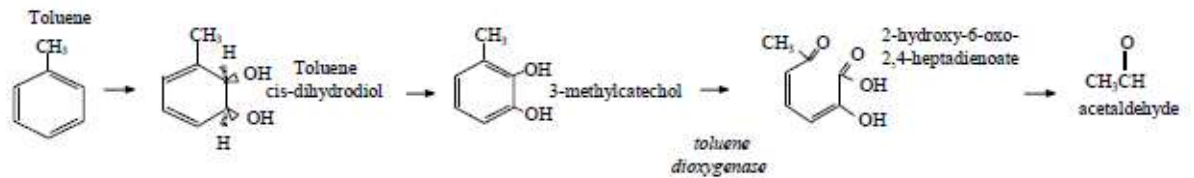


Fuente: [24]

1.4.2 Ruta metabólica para la degradación de tolueno. La degradación del tolueno puede seguir diferentes rutas, como la ruta codificada por el plásmido TOL, donde el tolueno es degradado a alcohol becílico, benzoato y finalmente catecol. En el caso de *Pseudomonas*, se evidencia la ruta realizada por *Pseudomonas putida*

en la cual interviene la enzima dioxigenasa, que consiste en la incorporación de dos grupos hidroxilo en la molécula formando cis- tolueno dihidrodiol, el cual es convertido en 3- metilcatecol [25].

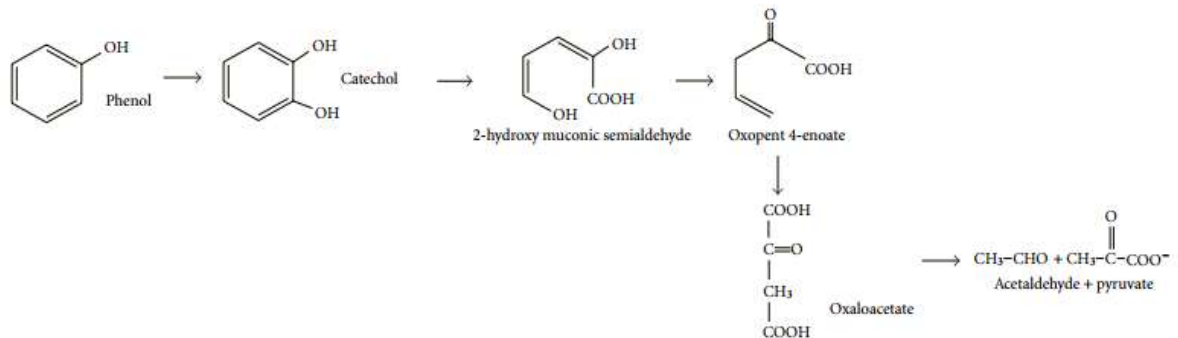
Figura 2. Ruta metabólica para la degradación de tolueno.



Fuente: [24]

1.4.3 Ruta metabólica para la degradación de fenol. La separación del anillo aromático del fenol está dada por diversos mecanismos dependiendo de la posición de su grupo fenilo. Sin embargo, en la Figura 3 se ilustra la ruta más frecuente denominada “meta”.

Figura 3. Ruta metabólica para la degradación de fenol.



Fuente: [26]

En esta ruta interviene el catecol-2,3-dioxigenasa que se desarrolla independientemente y no converge en ningún intermediario. El intermediario más frecuente en la degradación del fenol es el catecol, el cual por medio de diversas reacciones genera la apertura del anillo aromático permitiendo que sea degradado por alguno de los mecanismos. Los productos de la ruta meta son el acetilacetaldehido y el piruvato [27].

2. METODOLOGÍA

En la Figura 4 se muestra un diagrama con la metodología usada, la cual se dividió en tres etapas.

Figura 4. Metodología empleada en el desarrollo del proyecto.



2.1 CRECIMIENTO CELULAR DE *Pseudomonas sp.*

2.1.1 Microorganismos y cultivo. Se utilizaron las cepas comerciales *Pseudomonas putida* ATCC12633 y *Pseudomonas stutzeri* OX1. Se realizaron precultivos de cada cepa a partir de colonias individuales en 20 mL de medio LB (Anexo B) durante 18 horas. Se usaron 0,2 mL del precultivo para inocular 8 mL de medio mineral M9 (Anexo B) con el hidrocarburo (benceno, tolueno, o fenol) como única fuente de carbono durante 3 días, a 30 °C y 150 rpm.

Se realizaron cultivos con 5 concentraciones diferentes de cada hidrocarburo (20, 50, 125, 250 y 500 mg/L), además de controles sin células y sin hidrocarburo en el

medio M9, todos los experimentos contaban con nutrientes minerales y se realizaron por triplicado. Para seguir el crecimiento, cada 24 horas por 3 días se tomaron muestras de 0,2 mL de los cultivos y controles, y se determinó la densidad óptica (DO) a 600 nm en el espectrofotómetro UV/VIS 1800 (Shimadzu, Japón).

2.1.2 Prueba de viabilidad. Para determinar si las células bacterianas se encontraban vivas al final del cultivo, se tomaron muestras de 500 µL de cada cultivo en tubos de microcentrífuga estériles, para posteriormente con NaCl estéril en una concentración de 0,85 g/L realizar diluciones seriadas en factores de 10⁻¹ hasta 10⁻⁷. En una caja Petri con LB-agar se añadieron 2 µL en serie según el orden de dilución (Anexo C). Las cajas Petri se dejaron reposar por 1 hora antes de ingresarlas a la incubadora a 30 °C, luego de 24 horas la formación de colonias indica la presencia de células viables.

2.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD SURFACTANTE

2.2.1 Prueba de la gota colapsada. Se realizó para determinar si las cepas bacterianas secretan al medio de cultivo sustancias con actividad surfactantes. A las 72 horas de cultivo se tomaron muestras de 1,5 mL en tubos de microcentrífuga, los cuales fueron centrifugados a 10000 g por 10 minutos, en una microcentrífuga (Hermle, Alemania). En una lámina de microscopio se agregaron gotas de 2 µL de aceite de motor y 5 µL de sobrenadante sobre cada gota, se observaron en el estereoscopio en el tiempo 0 y 10 minutos después. La aparición de biosurfactantes logrará con el paso del tiempo que la gota se deforme puesto que la tensión superficial del agua se reduce.

2.2.2 Índice de emulsificación. Se extrajeron 3 mL de los cultivos y se centrifugaron a 10000 g por 10 minutos para obtener el sobrenadante, el cual se mezcló vigorosamente en un vórtex con benceno como fase hidrofóbica. Finalmente se midió la altura de la emulsión con respecto a la altura total del líquido y se reportó el porcentaje de emulsión 24 horas después.

2.3 CUANTIFICACIÓN DE LA DEGRADACIÓN

2.3.1 Espectrofotometría de absorción. Para identificar picos de absorción UV-Vis, se analizaron muestras del medio M9 (Anexo B) con cada hidrocarburo en el rango de 20 mg/L a 500 mg/L. Las muestras se sometieron a un barrido entre 230 y 300 nm empleando el espectrofotómetro UV/VIS 1800 (Shimadzu, Japón).

2.3.2 Curva de calibración. Se extrajeron los datos de absorbancia obtenidos en el espectro de absorción de cada uno de los hidrocarburos y se eligió la longitud de onda correspondiente a los picos. Se realizaron tres curvas de calibración correspondientes a tres picos diferentes de cada hidrocarburo y se eligió la de mejor coeficiente de correlación.

2.3.3 Consumo de hidrocarburo. Se realizó la medición de la absorbancia para cada uno de los cultivos en la longitud de onda correspondiente y se calculó la concentración final de los cultivos para las dos cepas a partir de la curva de calibración. Finalmente se determinó el porcentaje de consumo utilizando la ecuación 1.

$$\%Consumo = \left(\frac{\text{Concentración inicial} - \text{Concentración final}}{\text{Concentración inicial}} \right) * 100 \quad (1)$$

3. RESULTADOS

A continuación se muestra los resultados obtenidos en las pruebas de biodegradación, tanto el comportamiento de la cepa con cada hidrocarburo en sus diferentes concentraciones, como el comportamiento de los controles negativos.

3.1 CRECIMIENTO CELULAR *Pseudomonas sp*

El comportamiento de *Pseudomonas stutzeri* y *Pseudomonas putida* para las cinco concentraciones de benceno, tolueno, fenol y los diferentes controles se muestra en las Figuras 5, 6 y 7 respectivamente. Cada una de las curvas esta nombrada por una letra en mayúscula correspondiente a benceno (B), tolueno (T), fenol (F), y un número correspondiente a la concentración de hidrocarburo (0, 20, 50, 125, 250, 500 mg/L). Los controles sin células están nombrados por la letra (C) y el número de su respectiva concentración, adicionalmente el control sin hidrocarburo se nombró como (C-0).

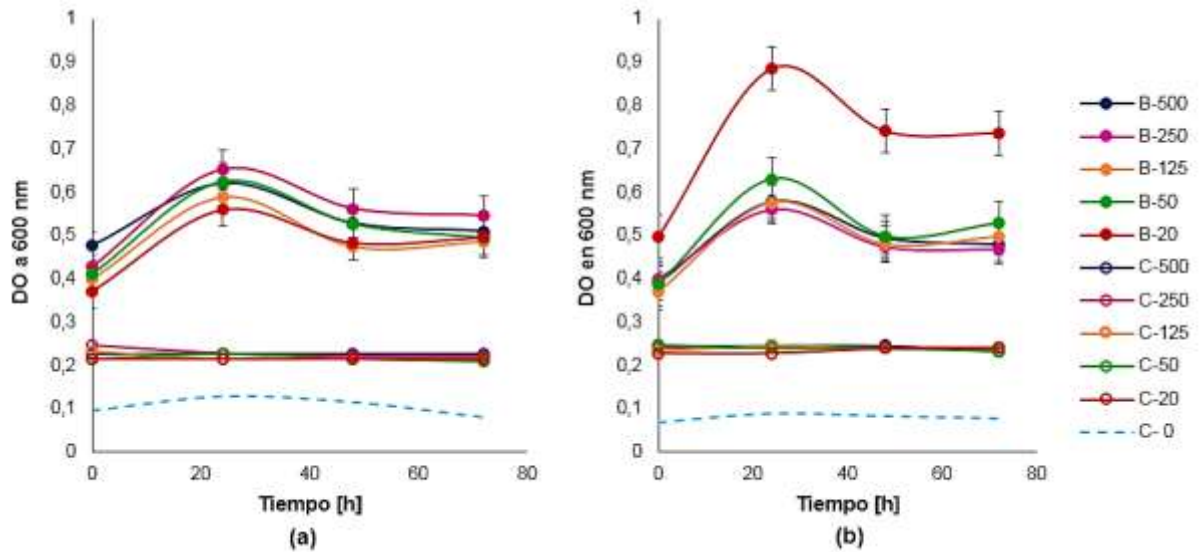
Un incremento en la DO representa un cambio de la turbiedad del medio y por lo tanto un indicador de crecimiento bacteriano. En las Figuras 5, 6 y 7 se puede observar que los controles sin células y sin hidrocarburo mantuvieron su valor de DO constante en el tiempo, lo cual garantiza que no se reportó crecimiento en estos cultivos.

Para las pruebas en presencia de hidrocarburos, se evidencia un alto crecimiento entre las 24 y 40 horas y una fase estacionaria alrededor de las 60 horas; el aumento de la turbidez es atribuido al crecimiento microbiano debido a la metabolización de

los hidrocarburos ya que los microorganismos no disponen de otras fuentes de carbono o energía en este medio.

En la Figura 5 se puede observar que *Pseudomonas putida* alcanzó mayores valores de DO con benceno como fuente de carbono, especialmente en la concentración de 20 mg/L. Contrario a esto *Pseudomonas stutzeri* evidenció una tendencia similar en todas las concentraciones del hidrocarburo.

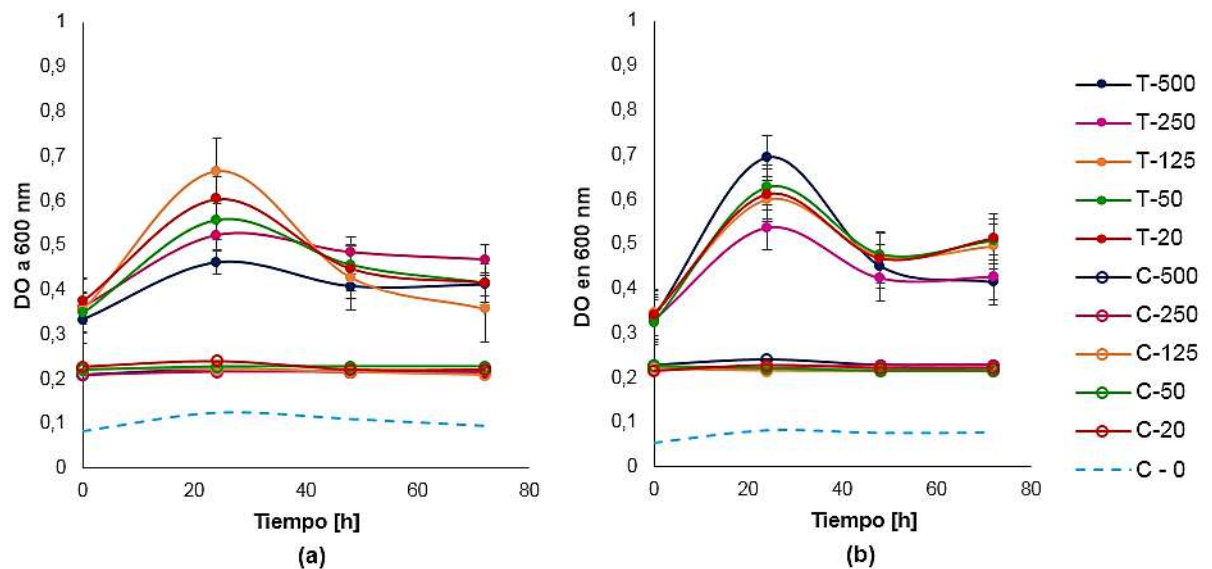
Figura 5. Curvas de crecimiento con benceno como única fuente de carbono de a) *Pseudomonas stutzeri* y b) *Pseudomonas putida*.



Las curvas de crecimiento para las dos cepas con tolueno como fuente de carbono se encuentran en la Figura 6 donde la tendencia de las diferentes concentraciones es similar en las dos cepas, es importante resaltar que con una concentración de 500 mg/L *Pseudomonas putida* mostró el mayor crecimiento bacteriano, contrario a *Pseudomonas stutzeri* que reportó el mayor crecimiento a una concentración de 125

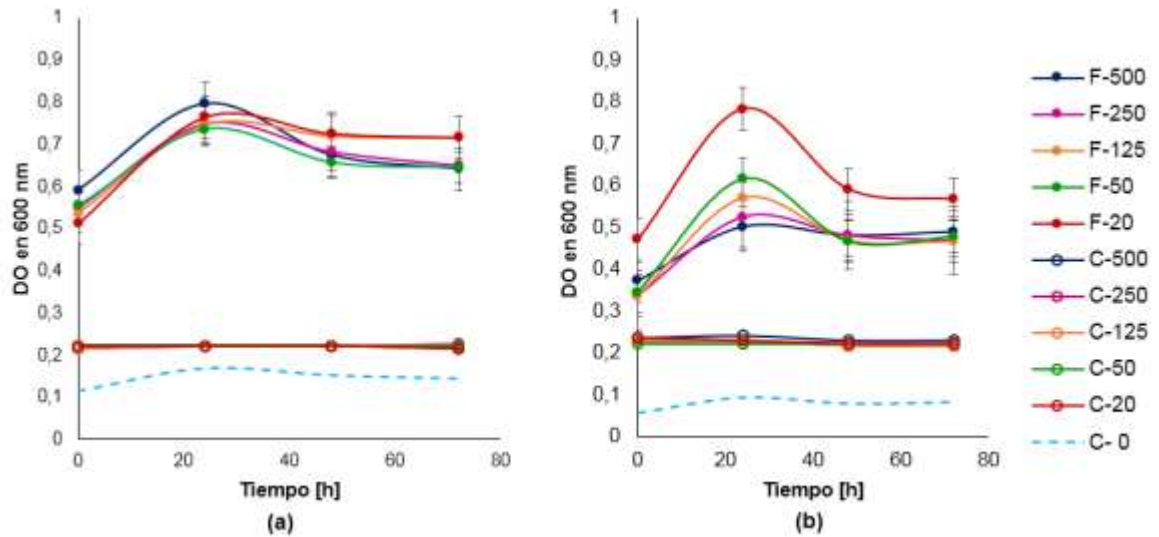
mg/L y por encima de este valor disminuyó el crecimiento a medida que se aumentaba la concentración de hidrocarburo lo cual sugiere un efecto tóxico.

Figura 6. Curvas de crecimiento con tolueno como única fuente de carbono de a) *Pseudomonas stutzeri* y b) *Pseudomonas putida*.



En la Figura 7 se observa que *Pseudomonas stutzeri* presenta valores de DO elevados en todas las concentraciones, cabe mencionar que el valor más alto se reporta en 500 mg/L. Por el contrario, *Pseudomonas putida* mostró crecimiento bacteriano alto para 20 mg/L y progresivamente inferior a medida que aumentaba la concentración de fenol, posiblemente se debe a que el fenol es un sustrato tóxico e inhibitorio por encima de 20 mg/L.

Figura 7. Curvas de crecimiento con fenol como única fuente de carbono de a) *Pseudomonas stutzeri* y b) *Pseudomonas putida*.

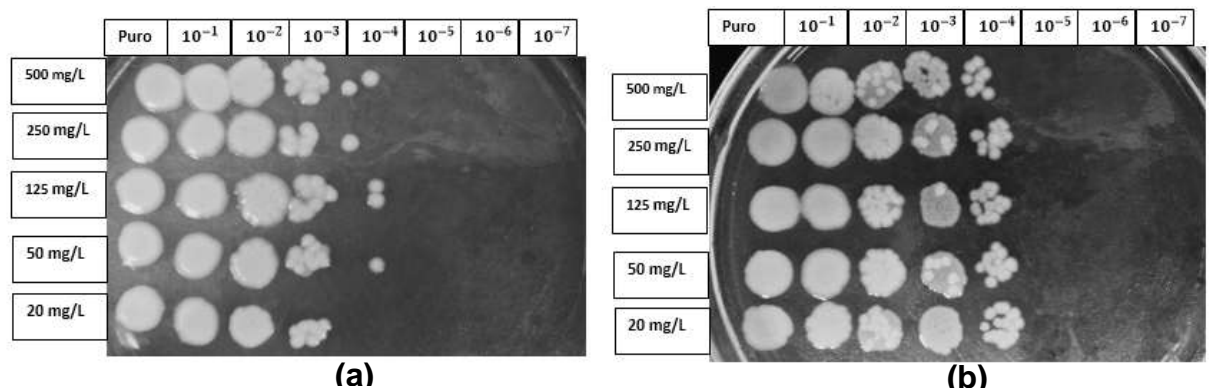


3.1.1 Prueba de viabilidad. La medida de la viabilidad es necesaria para determinar si al final del cultivo las células seguían metabólicamente activas, ratificando la habilidad de las cepas de metabolizar los hidrocarburos o determinando si hubo toxicidad de la fuente de carbono. Por esta razón la medición de DO se complementa con diluciones seriadas para verificar el orden de magnitud de células viables pasadas 72 horas de cultivo.

Adicionalmente se estimó el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en las cajas de Petri con el propósito de comparar entre los hidrocarburos posibles diferencias en el orden de magnitud.

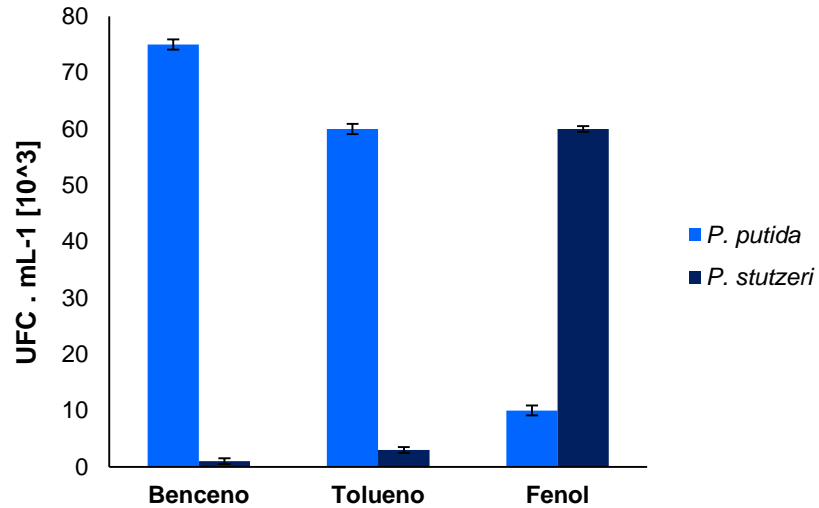
El crecimiento observado en las cajas de Petri de la Figura 8 llegó hasta diluciones de 10^{-4} comprobando que las cepas *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas stutzeri* con fenol como fuente de carbono se mantuvieron vivas luego de 72 horas de cultivo. En presencia de los diferentes hidrocarburos como única fuente de carbono, se mantuvieron aproximadamente el mismo número de células vivas en todas las concentraciones. Los registros fotográficos obtenidos con benceno y tolueno se encuentran en el Anexo C.

Figura 8. Prueba de viabilidad con fenol como única fuente de carbono de a) *Pseudomonas stutzeri* y b) *Pseudomonas putida*.



En la Figura 9 se muestra una gran aceptación del benceno y tolueno por parte de *Pseudomonas putida* contrario al comportamiento de *Pseudomonas stutzeri* que sugiere toxicidad de la fuente de carbono. En el caso del fenol, *Pseudomonas stutzeri* mostró alrededor de diez veces más células viables que *Pseudomonas putida*.

Figura 9. Número estimado de células viables.



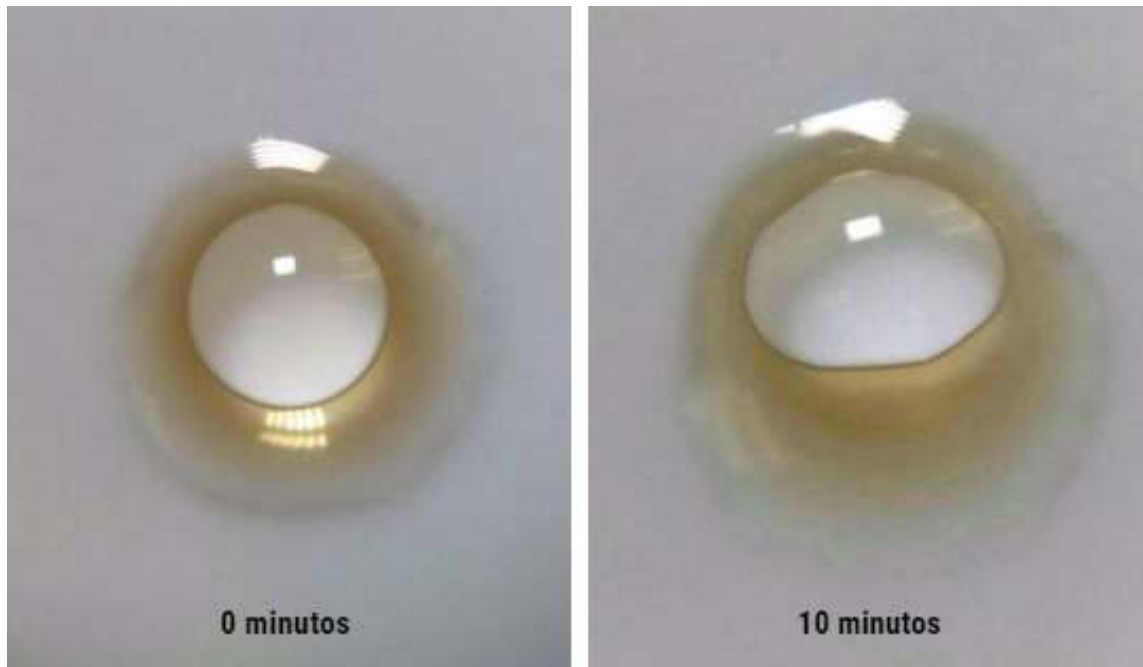
3.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD SURFACTANTE

Se observó actividad emulsificante en el sobrenadante, lo que sugiere una liberación de metabolitos con actividad surfactante en el medio por parte de las cepas. Lo cual facilitaría la toma del hidrocarburo como única fuente de carbono.

3.2.1 Prueba de gota colapsada. En la Figura 10, se ilustra el cambio en el área que generan los biosurfactantes transcurridos 10 minutos.

Pseudomonas stutzeri no reportó cambios en el área de la gota en ninguna de las concentraciones de los hidrocarburos estudiados, ya que las gotas de sobrenadante que tienen concentraciones muy bajas de tensoactivos permanecen estables. Es importante mencionar que la estabilidad de las gotas depende de la concentración de biosurfactante y se correlaciona con la tensión superficial pero no con la actividad emulsionante [28].

Figura 10. Gota colapsada con fenol como única fuente de carbono para *Pseudomonas putida* transcurridos 10 minutos.

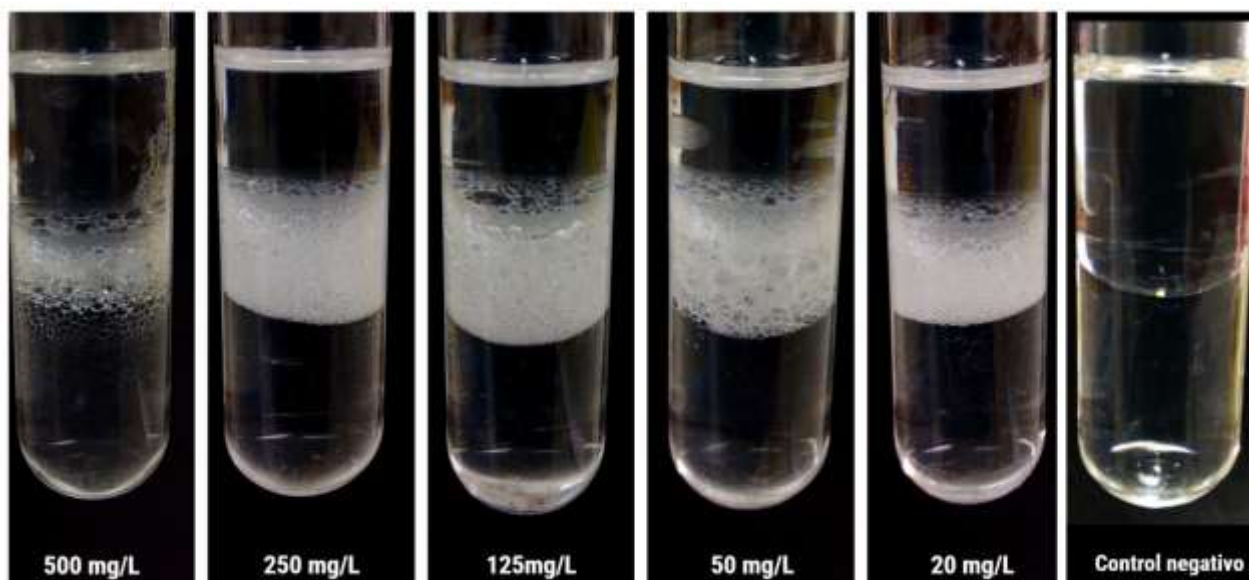


El registro fotográfico de la prueba permitió establecer una mayor producción con benceno en una concentración de 50 mg/L para *Pseudomonas putida*. En el Anexo D se encuentran los resultados obtenidos para los cultivos de *Pseudomonas putida* con todos los hidrocarburos evaluados.

3.2.2 Índice de emulsificación. En la Figura 11, se ilustran las emulsiones obtenidas después de 24 horas.

Para realizar esta prueba se utilizó benceno como fase hidrofóbica, teniendo en cuenta que Lovaglio *et al*, obtuvo alrededor de 56,1% de actividad de emulsificación para *Pseudomonas aeruginosa* con el mismo solvente [29].

Figura 11. Prueba del índice de emulsificación (%E24) para *Pseudomonas stutzeri* con fenol como única fuente de carbono.



La cepa *Pseudomonas putida* con benceno como única fuente de carbono no reportó emulsiones en ninguna de las concentraciones estudiadas, probablemente se debe a que los metabolitos con actividad surfactante encontrados en el medio no son buenos emulsionantes. Con respecto a la cepa *Pseudomonas stutzeri* el mayor índice de emulsificación fue de 41,67% obtenido en los cultivos con una concentración de 500 mg/L de benceno como se ilustra en la Figura 12.

Adicionalmente, en la Figura 13 se pueden observar mejores resultados para *Pseudomonas stutzeri* con tolueno como única fuente de carbono, ya que se obtuvieron índices entre 19,8 y 26,9% con respecto a los obtenidos por *Pseudomonas putida* que no superan el 14,04%.

Figura 12. Índice de emulsificación (%E24) con benceno como única fuente de carbono.

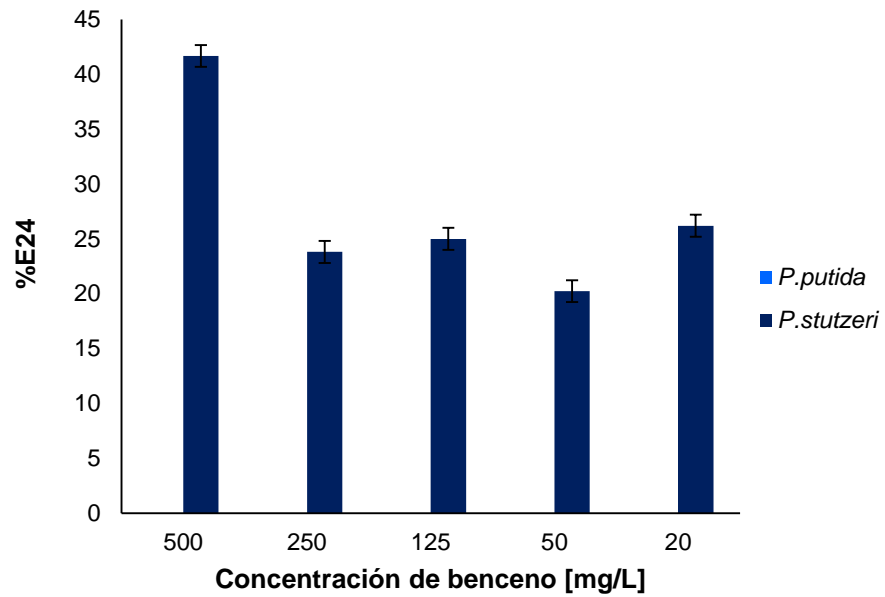
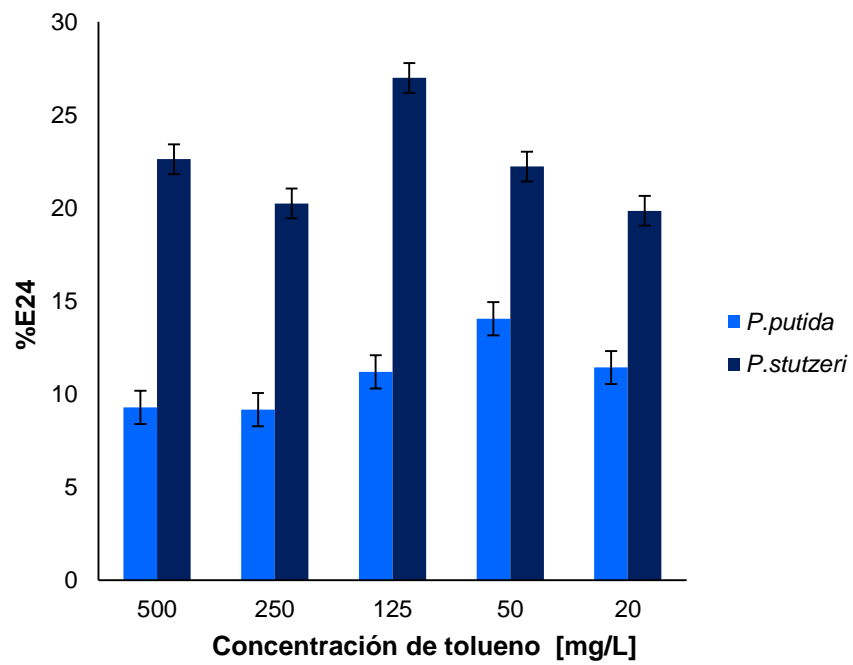
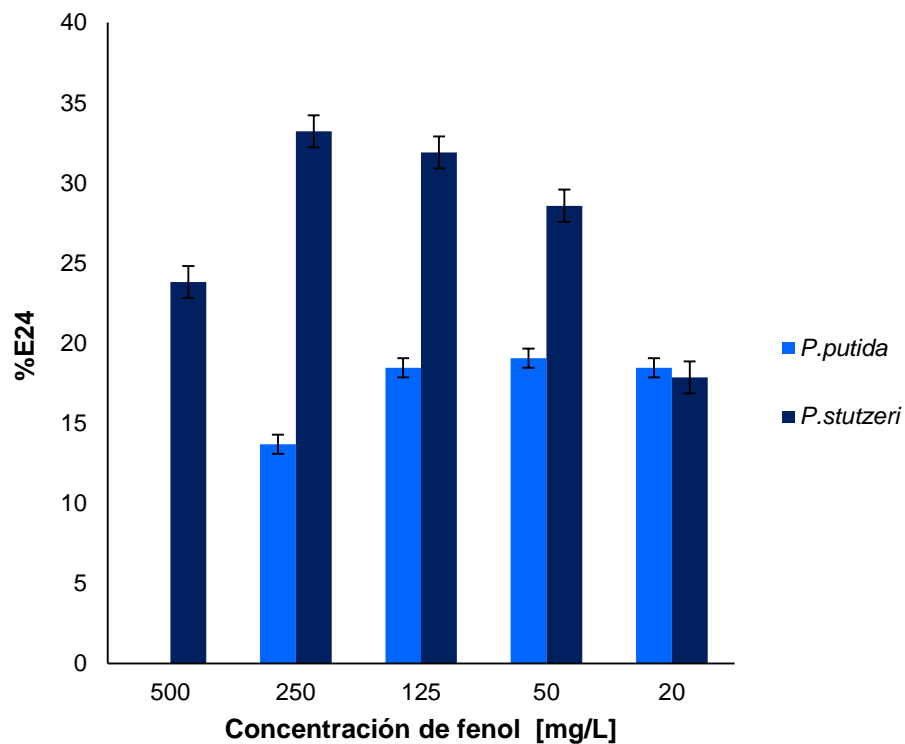


Figura 13. Índice de emulsificación (%E24) con tolueno como única fuente de carbono.



Pseudomonas stutzeri alcanzó índices de emulsificación superiores a los obtenidos por *Pseudomonas putida* con fenol como única fuente de carbono, exceptuando la concentración de 20 mg/L como se ilustra en la Figura 14. Adicionalmente *Pseudomonas putida* no presentó emulsión para el sobrenadante de los cultivos con concentración de 500 mg/L, posiblemente se debe a que dicha concentración resultó tóxica para la cepa. El registro fotográfico de esta prueba se encuentra en el Anexo E.

Figura 14. Índice de emulsificación (%E24) con fenol como única fuente de carbono.



3.3 CUANTIFICACIÓN DE LA DEGRADACIÓN

3.3.1 Espectrofotometría de absorción. La espectrofotometría es una técnica analítica muy utilizada debido a que sus mediciones espectroscópicas son bastante sensibles y demanda pequeñas muestras de material, se fundamenta en la relación existente entre la absorbancia de un soluto y su concentración, por este motivo esta técnica es ideal en mediciones cuantitativas.

Al realizar mediciones de la absorción de luz en función de la longitud de onda se obtiene un espectro de absorción. Para los residuos aromáticos solo hay absorción en un rango de 240 a 300 nm, esta región es llamada “ultravioleta cercano” o región aromática [30]. En las Figuras 15,16 y 17 se presentan los espectros de absorción obtenidos según el protocolo de la sección 2.3.1.

Figura 15. Espectro de absorción para benceno.

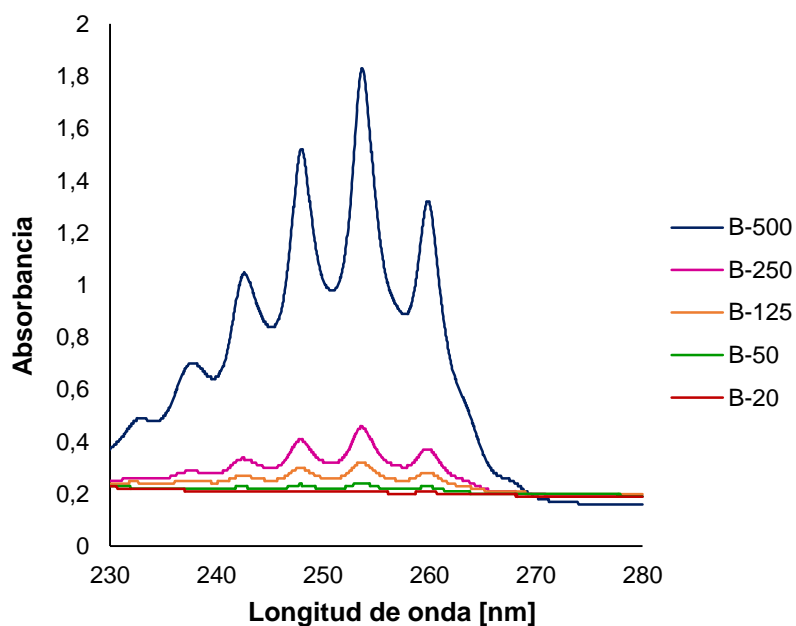


Figura 16. Espectro de absorción para tolueno.

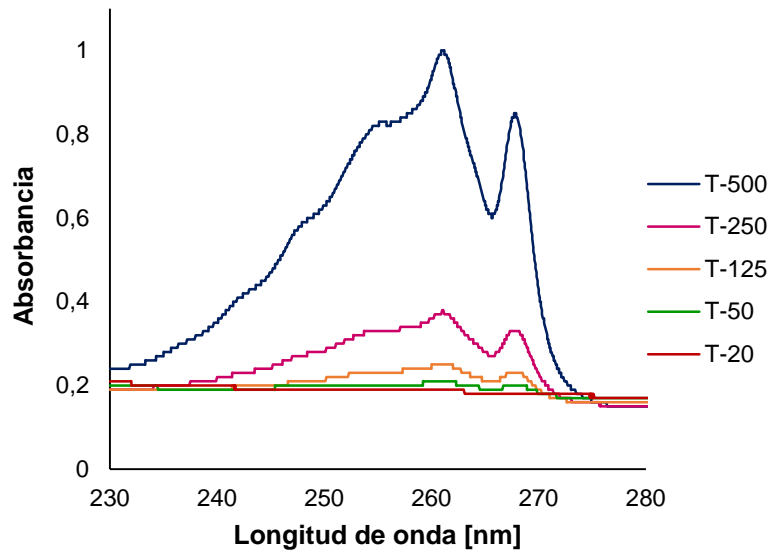
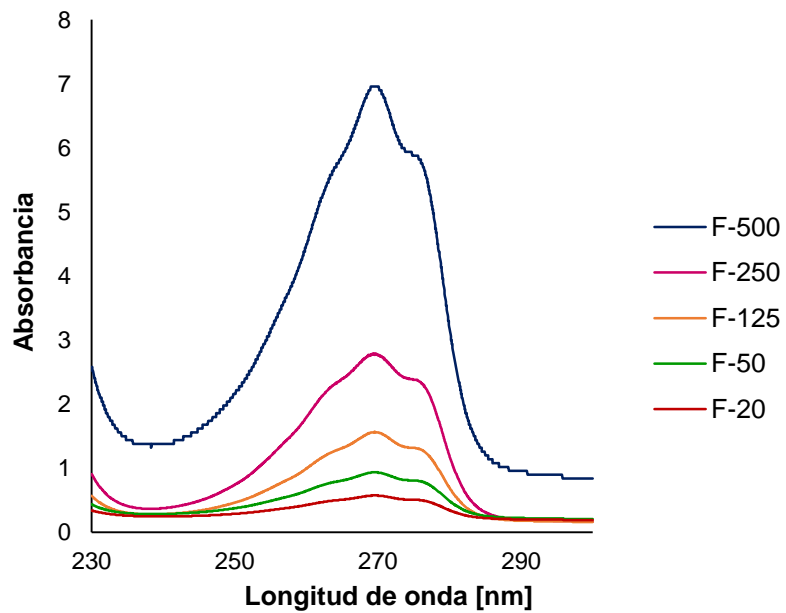


Figura 17. Espectro de absorción para fenol.



3.3.2 Curvas de calibración. Después de realizar tres curvas de calibración a diferentes longitudes de onda se eligió la que arrojó el coeficiente de correlación (R^2) más cercano a 1.

Las longitudes de onda establecidas fueron de 252,8 nm para benceno, 257,3 nm para tolueno y 267 nm para fenol.

Como se ilustra en las Figuras 18, 19 y 20, el valor de R^2 se acercó mucho al valor ideal el cual es 1, lo cual indica que las curvas de calibración se aproximan con una línea recta, evidenciando alta correlación entre las variables.

Figura 18. Curvas de calibración de benceno.

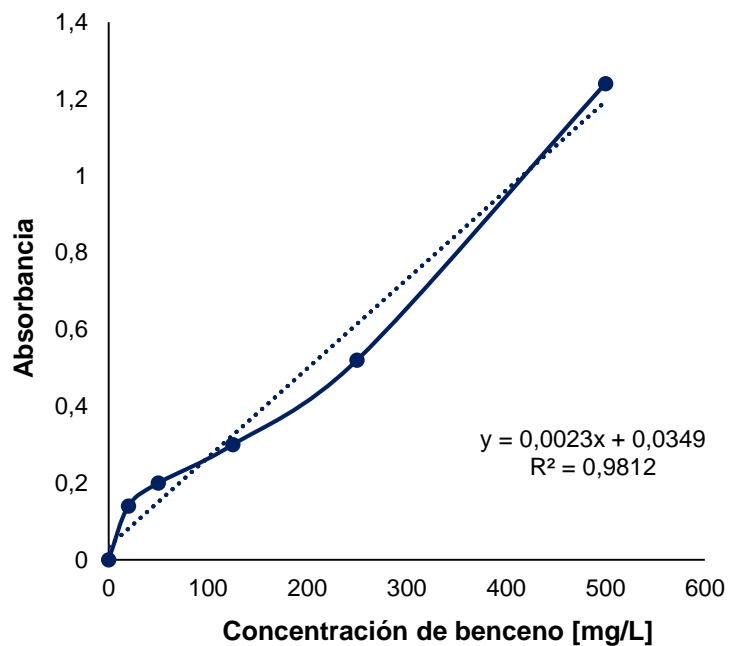


Figura 19. Curva de calibración de tolueno.

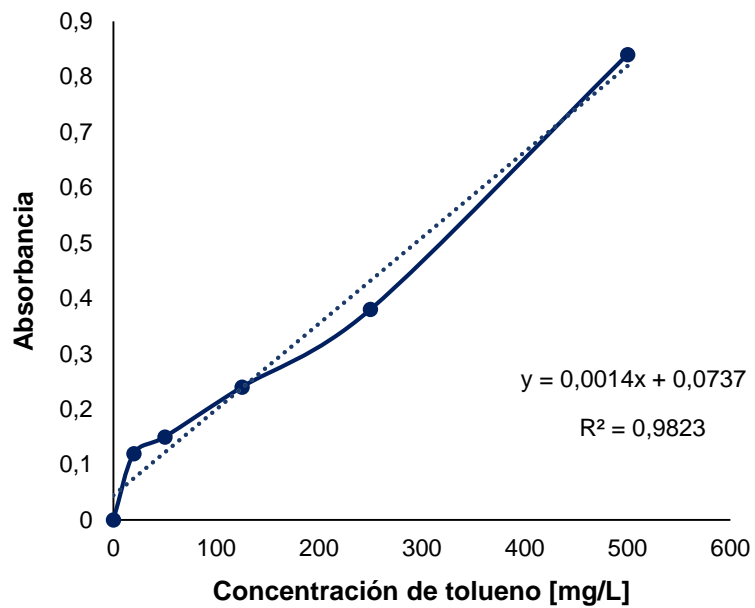
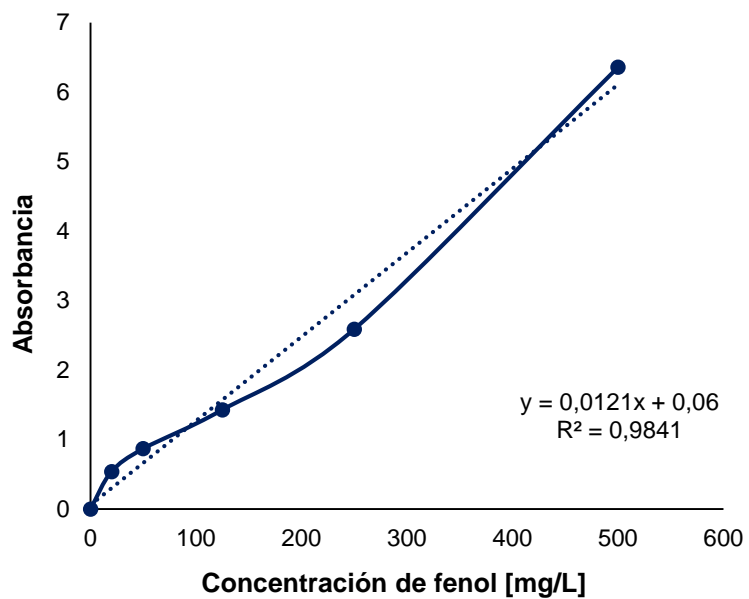


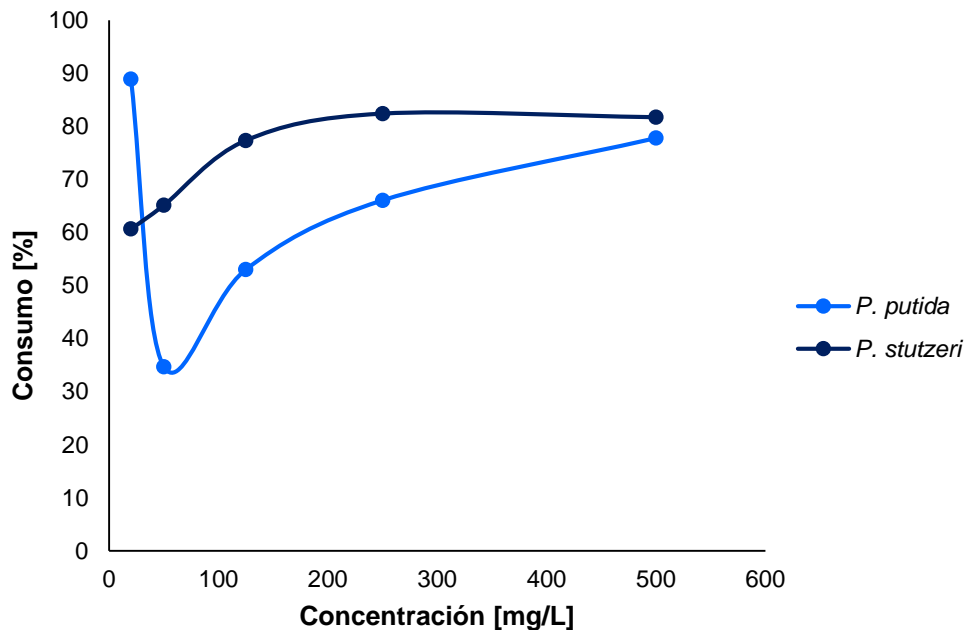
Figura 20. Curva de calibración de fenol.



3.3.3 Consumo de hidrocarburo. El benceno mostró aceptación por parte de *Pseudomonas stutzeri*, ya que se obtuvo un 73,45% de consumo con respecto al 64,1% obtenido con *Pseudomonas putida*. En el caso del tolueno los mejores resultados se obtuvieron con *Pseudomonas putida*, ya que reporto un 73,86% de consumo. De igual manera, *Pseudomonas stutzeri* evidencio un 69,75% de consumo del mismo hidrocarburo. Finalmente, el fenol obtuvo un 56,61% de consumo por parte de *Pseudomonas putida*, contrario a *Pseudomonas stutzeri* que presento el más bajo consumo con un 15,47%.

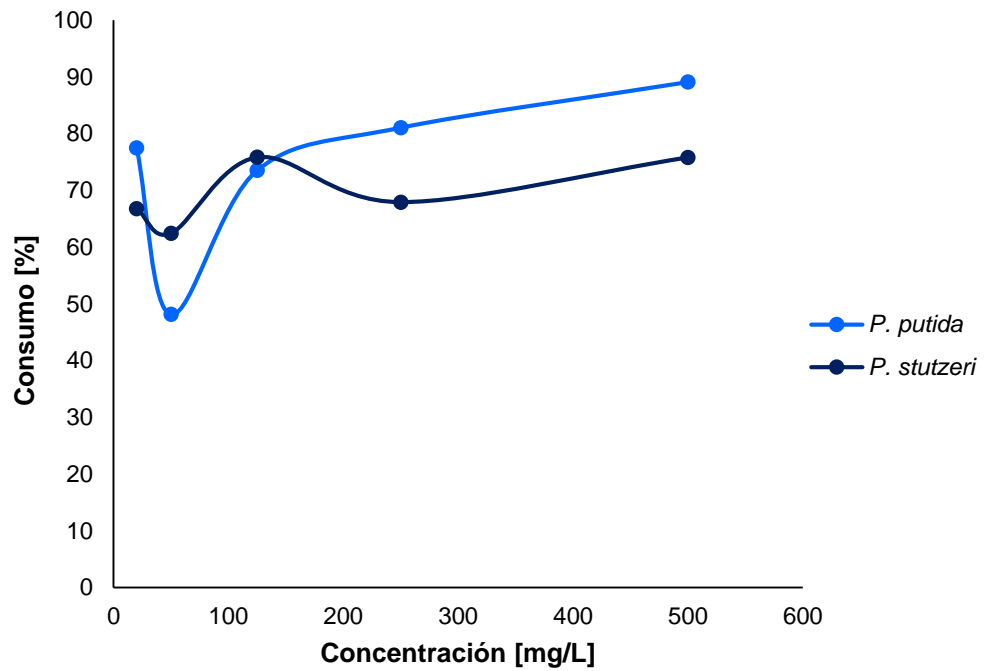
En la Figura 21 se puede observar que *Pseudomonas stutzeri* presento un mayor consumo de benceno entre 500 y 50 mg/L, exceptuando 20 mg/L donde *Pseudomonas putida* mostró mayor consumo.

Figura 21. Consumo de benceno.



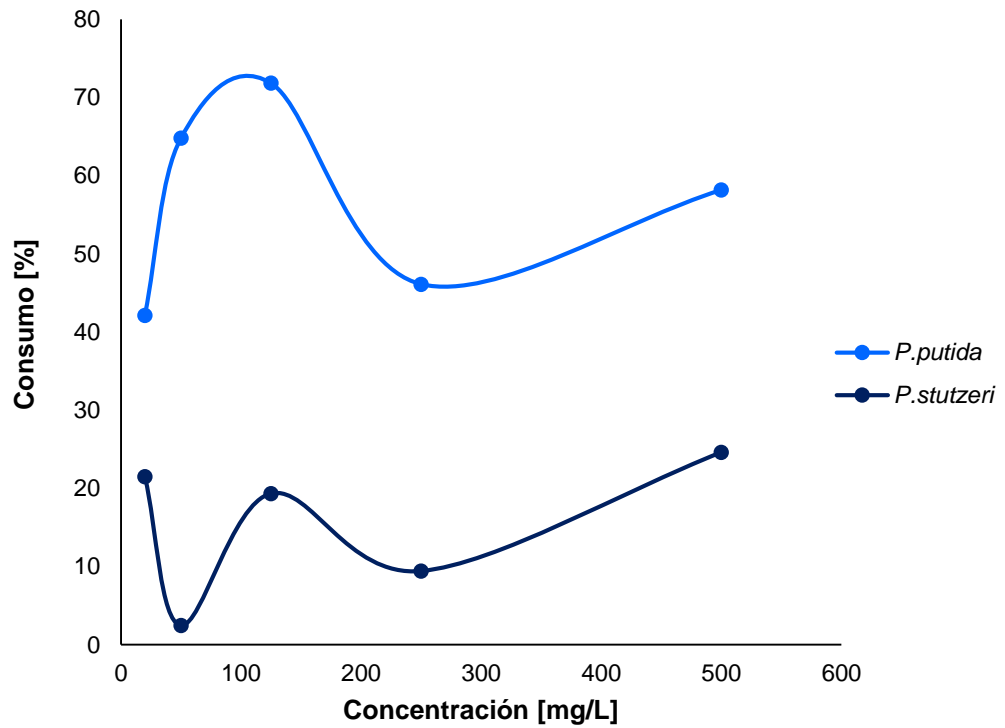
En la Figura 22, se puede observar que todas las concentraciones tuvieron un consumo similar para las dos cepas.

Figura 22. Consumo de tolueno.



El consumo de fenol fue menor para *Pseudomonas stutzeri* ya que está entre 2,47 y 24,62% en comparación al realizado por *Pseudomonas putida* que se encuentra alrededor del 42,15 y 71,83% como se ilustra en la Figura 23.

Figura 23. Consumo de fenol.



En las tablas de las concentraciones finales de los cultivos de cada uno de los tres hidrocarburos estudiados del Anexo F, se puede ver la disminución de la concentración del HPA debido a la transformación que sufre por la acción biológica de las cepas.

4. CONCLUSIONES

Los factores que favorecen el crecimiento de *Pseudomonas putida* son las bajas concentraciones de hidrocarburos como el benceno y fenol; por otro lado, *Pseudomonas stutzeri* toleró concentraciones superiores a 125 mg/L a excepción del tolueno que sugiere un efecto tóxico.

Los sobrenadantes obtenidos de los cultivos mostraron actividad emulsificante evidenciando una liberación de metabolitos con actividad surfactante en el medio por parte de las cepas.

Los más altos porcentajes de consumo se obtuvieron con *Pseudomonas putida* confirmando que la cepa es potencialmente degradadora de hidrocarburos aromáticos.

5. RECOMENDACIONES

Para aprovechar el potencial degradador de las dos cepas, sería interesante plantear experimentos en conjunto o con otras cepas capaces de metabolizar hidrocarburos para evaluar un posible aumento en el consumo de los contaminantes.

Se recomienda utilizar otros compuestos recalcitrantes con el propósito de evaluar el potencial de las cepas en la biorremediación.

Se recomienda realizar análisis para identificar el compuesto con actividad surfactante, establecer sus propiedades y estudiar su aplicabilidad en diferentes campos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ROBLEDO ZACARÍAS, Víctor Hugo. Identificación y cuantificación de contaminantes emergentes en aguas residuales en la ciudad de Morelia Michoacán. Tesis de Magíster en Ciencias. Michoacán: Instituto Politécnico Nacional. Facultad de Ciencias, 2014, p.15-17.

- [2] PROGRAMA MUNDIAL DE EVALUACIÓN DE LOS RECURSOS HIDRICOS. Informe de las Naciones Unidas sobre los recursos hídricos en el mundo. UNESCO, 2015.p.1-12.

- [3] THOMASSIN-LACROIX, E.J.M, *et al.* Biostimulation for on-site treatment of weathered diesel fuel in Arctic soil. En: Applied Microbiology Biotechnology. Noviembre, 2002, Vol.59, p. 551- 556.

- [4] STELLMAN, Jeanne Mager. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. Madrid: Ministerio de Trabajo y asuntos sociales, 2001.p.282-283. ISBN: 84-8417-047-0

- [5] INSTITUTO NACIONAL DE SEGURIDAD E HIGIENE EN EL TRABAJO. Documentación toxicológica para el establecimiento del límite de exposición profesional del tolueno. Madrid: DLEP, 2007.p.1-3.

- [6] Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toluene. Atlanta: Division of Toxicology and Human Health Sciences, 2016.
- [7] GARCÍA MELO, José Alberto. Biodegradación de fenol en reactor discontinuo de alimentación secuenciada. Tesis pregrado en Licenciatura. Hidalgo: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Centro de Investigaciones Químicas, 2007, p.2-5.
- [8] LLOP HERNÁNDEZ, Alina; DAPENA VIVANCO, Ma. Margarita y ZUAZO SILVA, Jorge Luis. Microbiología y Parasitología Médicas. La Habana: Editorial Ciencias Médicas, 2001.p.303.
- [9] ALANIS GARCÍA, Ernesto y GUERERO LEGARRETA, Isabel. Pseudomonas en Biotecnología. En: Biotecnología. 2004, Vol.9, No.1, p.26-27.
- [10] THAPA, Bijay; KC, Ajay Kumar y GHIMIRE, Anish. A Review on bioremediation on hydrocarbon contaminants in soil. En: Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology. Febrero, 2012, Vol.8, No.1, p.164-170.
- [11] OBAYPRI, O.S; SALAM, Lateef y OGUNWUMI, O.S. Biodegradation of Fresh and Used Engine Oils by Pseudomonas aeruginosa LP5. En: Journal of Bioremediation and Biodegradation. Enero, 2014, Vol.5, p.1-7.

- [12] DEYTA, Ana Laura y SAVAL, Susana. Biodegradación de hidrocarburos monoaromáticos volátiles (BTX) a nivel microcosmos en suelos contaminados con gasolina. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Ingeniería, 2013, p.1-2
- [13] SILVA, Rita de Cássia, *et al.* Applications of Biosurfactants in the Petroleum Industry and the Remediation of Oil Spills. En: International Journal of Molecular Sciences. Julio, 2014, Vol.15, p.12524-12541.
- [14] MONTERO RODRIGUEZ, Dayana. Bioremediation of Petroleum Derivative Using Biosurfactant Produced by *Serratia marcescens* UCP/WFCC 1549 in Low-Cost Medium. En: International Journal of current microbiology and applied sciences. Julio, 2015, Vol.4, No.7, p.550-562.
- [15] PACWA-PLOCINICZAK, Magdalena, *et al.* Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. P-1 strain as a potential tool for bioremediation of petroleum-contaminated soil. En: Environmental Science and Pollution Research International. Abril, 2014, Vol.21, p.9385–9395.
- [16] THAVASI, Rengathavasi; JAYALAKSHMI, Singaram y BANAT, Ibrahim. Application of biosurfactant produced from peanut oil cake by *Lactobacillus delbrueckii* in biodegradation of crude oil. En: Bioresource Technology. Febrero, 2011, Vol.102, p.3366-3372.

- [17] ABBASI, Habib, *et al.* Biosurfactant-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples: Physicochemical and structural characteristics of isolated biosurfactant. En: *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Febrero, 2012, Vol.113, No.2, p. 211–219.
- [18] OTENIO, Marcelo, *et al.* Benzene, Toluene and Xylene Biodegradation by *Pseudomonas Putida* CCMI 852. En: *Brazilian Journal of Microbiology*. Septiembre, 2005, Vol.36, No.3, p. 258- 261.
- [19] KUMAR, Manoj, *et al.* Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation by Biosurfactant-Producing *Pseudomonas* sp. IR1. En: *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*. Noviembre, 2006, p. 203-212.
- [20] VIGGIANI, A, *et al.* An airlift biofilm reactor for the biodegradation of phenol by *Pseudomonas stutzeri* OX1. En: *Journal of Biotechnology*. Febrero, 2006, Vol.123, p. 464-477
- [21] SINGH, Dipty y FULEKAR, Madhusudan H. Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons by *Pseudomonas putida* Strain MHF7109. En: *Clean Soil Air Water*. Agosto, 2010, Vol.38, No.8, p. 781–786
- [22] SINGH, Pallavi y TIWARY, Bhupendra. N. Optimization of conditions for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation by *Pseudomonas stutzeri* P2 isolated from Chirimiri coal mines. En: *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Abril, 2017, Vol.10, p. 20-29.

- [23] ATLAS, Ronald. Y BARTHA, Richard. Ecología Microbiana y Microbiología ambiental. España: Pearson Education S.A, 2001. p.620. ISBN 9788478290390.
- [24] MODENÉS, A.N; RAVAGNANI, M.A.S.S y TRIGUEROS, D.E.G. Biodegradation kinetics of benzene and toluene as single and mixed substrate: estimation of biokinetics parameters by applying particle swarm optimization. En: Latin American applied research. Julio, 2010, Vol.40, No.3, p.219-226.
- [25] ALANIS GARCÍA, Ernesto y GUERERO LEGARRETA, Isabel. Pseudomonas en Biotecnología. En: Biotecnología. 2004, Vol.9, No.1, p.30.
- [26] MAHIUDDIN, Md; FAKHRUDDIN, A.N.M y AL-MAHIN, Abdullah. Degradation of phenol via Meta Cleavage Pathway by Pseudomonas fluorescens PU1. En: ISRN Microbiology. Enero, 2012, p. 2-3.
- [27] AHUMADA, Melba. Y GÓMEZ, Rayza. Evaluación y selección de bacterias degradadoras de fenol por respirometría. Tesis pregrado. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias, 2009, p.13-14.
- [28] JAIN, D.K, *et al.* A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. En: Journal of Microbiological Methods. Agosto, 1991, Vol.13, No.4, p.271-279.

- [29] LOVAGLIO, Roberta B, *et al.* Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. En: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Julio, 2011, Vol.85, No.2, p.301-305.
- [30] ARENAS, Iván y LÓPEZ, José Luis. *Espectrofotometría de absorción*. Cuernavaca: Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biotecnología, 2004, p.7-26.

BIBLIOGRAFÍA

ABBASI, Habib, *et al.* Biosurfactant-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples: Physicochemical and structural characteristics of isolated biosurfactant. En: *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Febrero, 2012, Vol.113, No.2, p. 211–219.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toluene. Atlanta: Division of Toxicology and Human Health Sciences, 2016.

AHUMADA, Melba. Y GÓMEZ, Rayza. Evaluación y selección de bacterias degradadoras de fenol por respirometría. Tesis pregrado. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias, 2009, p.13-14.

ALANIS GARCÍA, Ernesto y GUERERO LEGARRETA, Isabel. *Pseudomonas* en Biotecnología. En: *Biotecnología*. 2004, Vol.9, No.1, p.26-27.

----- En: *Biotecnología*. 2004, Vol.9, No.1, p.30.

ARENAS, Iván y LÓPEZ, José Luis. Espectrofotometría de absorción. Cuernavaca: Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biotecnología, 2004, p.7-26.

ATLAS, Ronald. Y BARTHA, Richard. Ecología Microbiana y Microbiología ambiental. España: Pearson Education S.A, 2001. p.620.ISBN 9788478290390.

DEYTA, Ana Laura y SAVAL, Susana. Biodegradación de hidrocarburos monoaromáticos volátiles (BTX) a nivel microcosmos en suelos contaminados con gasolina. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Ingeniería, 2013, p.1-2

GARCÍA MELO, José Alberto. Biodegradación de fenol en reactor discontinuo de alimentación secuenciada. Tesis pregrado en Licenciatura. Hidalgo: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Centro de Investigaciones Químicas, 2007, p.2-5.

INSTITUTO NACIONAL DE SEGURIDAD E HIGIENE EN EL TRABAJO. Documentación toxicológica para el establecimiento del límite de exposición profesional del tolueno. Madrid: DLEP, 2007.p.1-3.

JAIN, D.K, *et al.* A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. En: Journal of Microbiological Methods. Agosto, 1991, Vol.13, No.4, p.271-279.

KUMAR, Manoj, *et al.* Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation by Biosurfactant-Producing Pseudomonas sp. IR1. En: Verlag der Zeitschrift für Naturforschung. Noviembre, 2006, p. 203-212.

LLOP HERNÁNDEZ, Alina; DAPENA VIVANCO, Ma. Margarita y ZUAZO SILVA, Jorge Luis. Microbiología y Parasitología Médicas. La Habana: Editorial Ciencias Médicas, 2001.p.303.

LOVAGLIO, Roberta B, *et al.* Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. En: Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. Julio, 2011, Vol.85, No.2, p.301-305.

MAHIUDDIN, Md; FAKHRUDDIN, A.N.M y AL-MAHIN, Abdullah. Degradation of phenol via Meta Cleavage Pathway by Pseudomonas fluorescens PU1.En: ISRN Microbiology. Enero, 2012, p. 2-3.

MODENÉS, A.N; RAVAGNANI, M.A.S.S y TRIGUEROS, D.E.G. Biodegradation kinetics of benzene and toluene as single and mixed substrate: estimation of biokinetics parameters by applying particle swarm optimization. En: Latin American applied research. Julio, 2010, Vol.40, No.3, p.219-226.

MONTERO RODRIGUEZ, Dayana. Bioremediation of Petroleum Derivative Using Biosurfactant Produced by Serratia marcescens UCP/WFCC 1549 in Low-Cost Medium. En: International Journal of current microbiology and applied sciences. Julio, 2015, Vol.4, No.7, p.550-562.

OBAYPRI, O.S; SALAM, Lateef y OGUNWUMI, O.S. Biodegradation of Fresh and Used Engine Oils by Pseudomonas aeruginosa LP5. En: Journal of Bioremediation and Biodegradation. Enero, 2014, Vol.5, p.1-7.

OTENIO, Marcelo, *et al.* Benzene, Toluene and Xylene Biodegradation by *Pseudomonas Putida* CCMI 852. En: Brazilian Journal of Microbiology. Septiembre, 2005, Vol.36, No.3, p. 258- 261.

PACWA-PLOCINICZAK, Magdalena, *et al.* Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. P-1 strain as a potential tool for bioremediation of petroleum-contaminated soil. En: Environmental Science and Pollution Research International. Abril, 2014, Vol.21, p.9385–9395.

PROGRAMA MUNDIAL DE EVALUACIÓN DE LOS RECURSOS HIDRICOS. Informe de las Naciones Unidas sobre los recursos hídricos en el mundo. UNESCO, 2015.p.1-12.

ROBLEDO ZACARÍAS, Víctor Hugo. Identificación y cuantificación de contaminantes emergentes en aguas residuales en la ciudad de Morelia Michoacán. Tesis de Magíster en Ciencias. Michoacán: Instituto Politécnico Nacional. Facultad de Ciencias, 2014, p.15-17.

SILVA, Rita de Cássia, *et al.* Applications of Biosurfactants in the Petroleum Industry and the Remediation of Oil Spills. En: International Journal of Molecular Sciences. Julio, 2014, Vol.15, p.12524-12541.

SINGH, Dipty y FULEKAR, Madhusudan H. Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons by *Pseudomonas putida* Strain MHF7109. En: Clean Soil Air Water. Agosto, 2010, Vol.38, No.8, p. 781–786

SINGH, Pallavi y TIWARY, Bhupendra. N. Optimization of conditions for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation by *Pseudomonas stutzeri* P2 isolated from Chirimiri coal mines. En: *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Abril, 2017, Vol.10, p. 20-29.

STELLMAN, Jeanne Mager. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. Madrid: Ministerio de Trabajo y asuntos sociales, 2001, p.282-283. ISBN: 84-8417-047-0

THAPA, Bijay; KC, Ajay Kumar y GHIMIRE, Anish. A Review on bioremediation on hydrocarbon contaminants in soil. En: *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology*. Febrero, 2012, Vol.8, No.1, p.164-170.


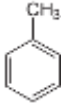
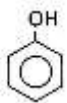
THAVASI, Rengathavasi; JAYALAKSHMI, Singaram y BANAT, Ibrahim. Application of biosurfactant produced from peanut oil cake by *Lactobacillus delbrueckii* in biodegradation of crude oil. En: *Bioresource Technology*. Febrero, 2011, Vol.102, p.3366-3372.

THOMASSIN-LACROIX, E.J.M, *et al.* Biostimulation for on-site treatment of weathered diesel fuel in Arctic soil. En: *Applied Microbiology Biotechnology*. Noviembre, 2002, Vol.59, p. 551- 556.

VIGGIANI, A, *et al.* An airlift biofilm reactor for the biodegradation of phenol by *Pseudomonas stutzeri* OX1. En: *Journal of Biotechnology*. Febrero, 2006, Vol.123, p. 464-477.

ANEXOS

Anexo A. Características fisicoquímicas, estructurales y toxicidad de los hidrocarburos

Propiedad fisicoquímica	HIDROCARBUROS AROMÁTICOS		
	Benceno	Tolueno	Fenol
Nombre común	Benceno	Metilbenceno	Hidroxibenceno
Estructura semidesarrollada			
Fórmula molecular	C ₆ H ₆	C ₇ H ₈	C ₆ H ₆ O
Punto de ebullición (°C)	80	111	182
Punto de fusión (°C)	6	-95	43
Punto de inflamación (°C c.c)	-11	4	79
Densidad (g/cm ³)	0,88	0,87	1,07
Densidad relativa de vapor (aire=1)	2,7	1,06	3,2
Densidad relativa de la mezcla vapor/aire a 20°C (aire=1)	1,2	1,01	1,001
Solubilidad en agua g/mL	0,0018	0,00047	0,083
Temperatura de autoignición (°C)	498	480	715
Límite de explosividad, % en volumen en el aire	1,2 – 8,0	1,1 – 7,1	1,36 - 10
Coefficiente de reparto octanol/agua como log Pow	2,13	2,69	1,46

Anexo B. Medios de cultivo

NOMBRE	COMPONENTE	CANTIDAD (1 Litro)
Luria Bertani (LB)	NaCl	10 gramos
	Extracto de levadura	5 gramos
	Triptona	10 gramos
Medio mineral (M9)	KH_2PO_4	0,83 gramos
	K_2HPO_4	0,73 gramos
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,48 gramos
	NaCl	0,058 gramos
	CaCl_2	0,079 gramos
	MgSO_4	0,15 gramos
	$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$	0,0086 gramos

Anexo C. Prueba de viabilidad

Figura C.1 Diagrama de las diluciones seriadas

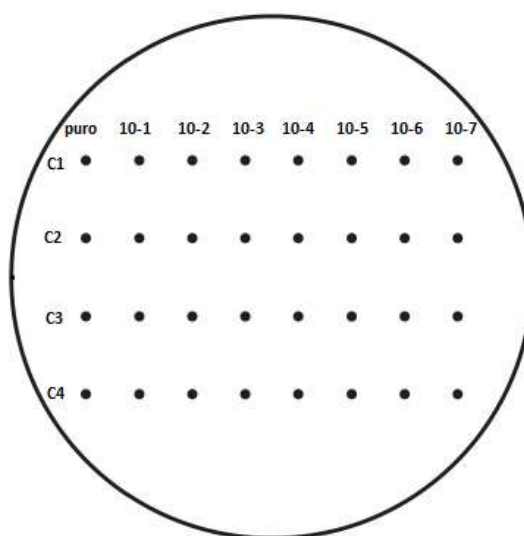


Figura C.2 Prueba de viabilidad con benceno como única fuente de carbono de a) *Pseudomonas stutzeri* y b) *Pseudomonas putida*

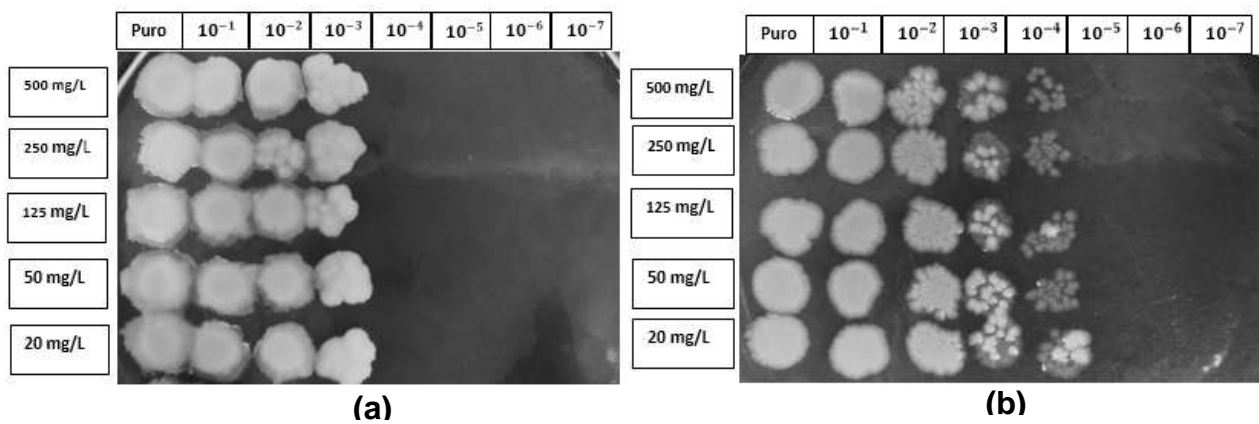
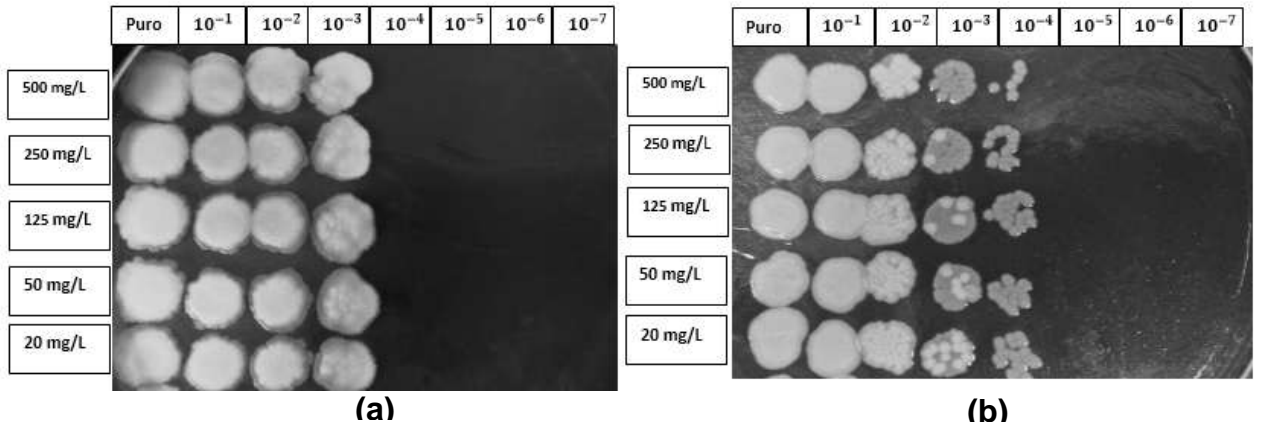
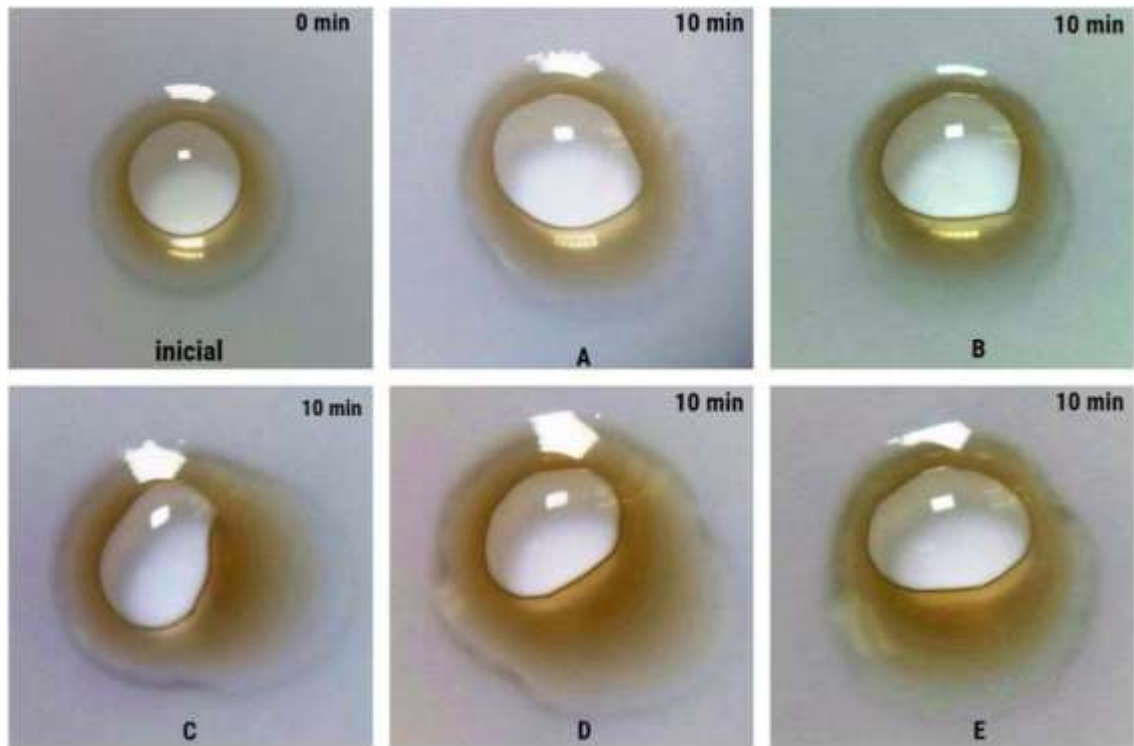


Figura C.3 Prueba de viabilidad con tolueno como única fuente de carbono de a) *Pseudomonas stutzeri* y b) *Pseudomonas putida*



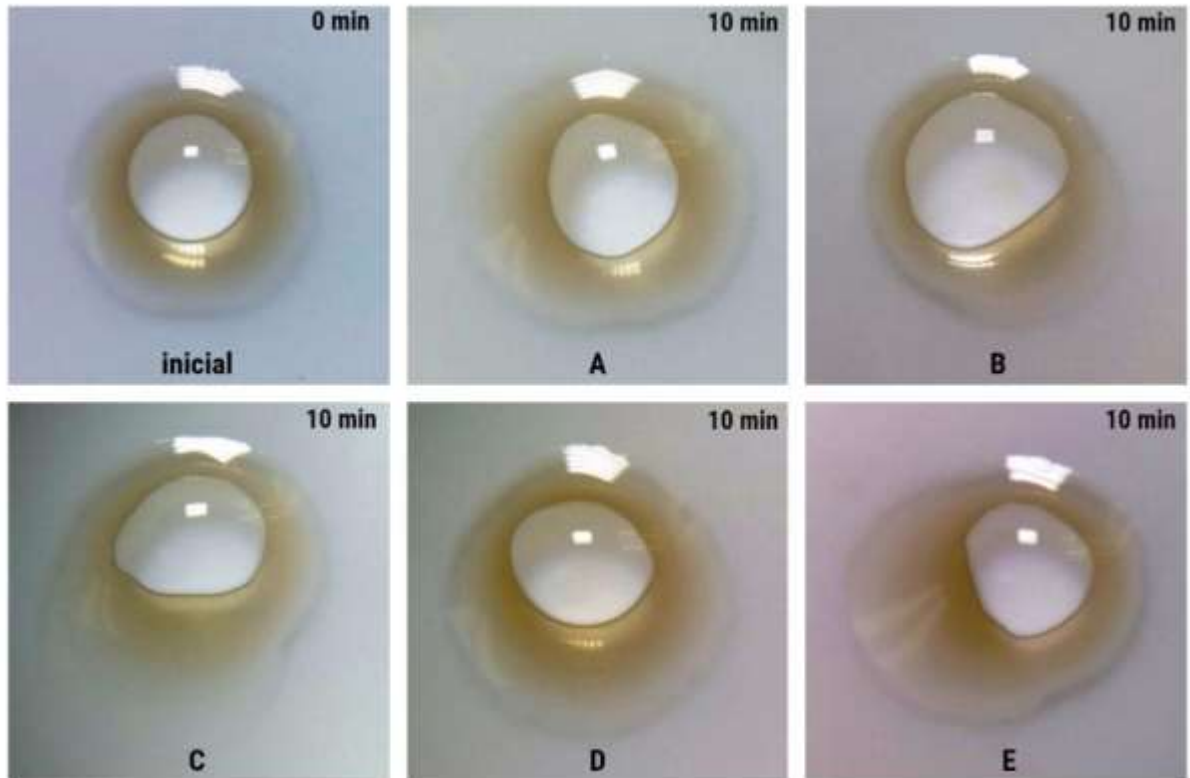
Anexo D. Gota colapsada

Figura D.1 Prueba de la gota colapsada para *Pseudomonas putida* con fenol como única fuente de carbono.



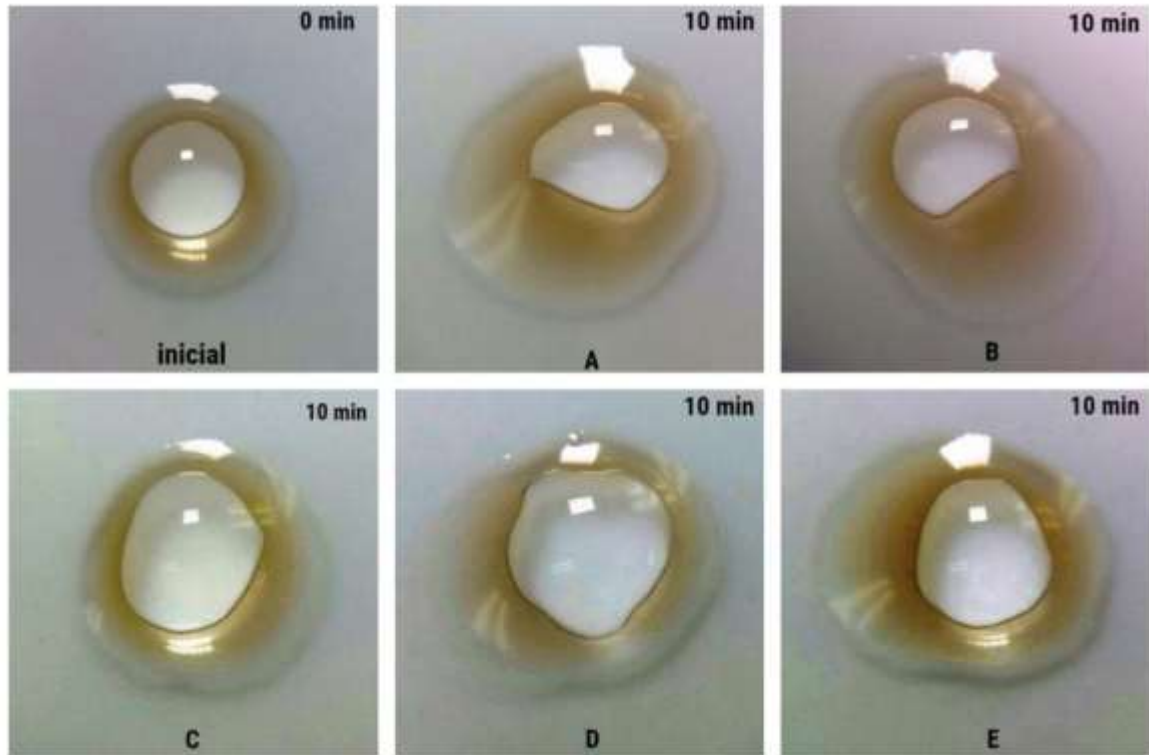
(A): Concentración 500 mg/L. (B): Concentración 250 mg/L. (C): Concentración 125 mg/L. (D): Concentración 50 mg/L. (E): Concentración 20 mg/L

Figura D.2 Prueba de la gota colapsada para *Pseudomonas putida* con tolueno como única fuente de carbono.



(A): Concentración 500 mg/L. (B): Concentración 250 mg/L. (C): Concentración 125 mg/L. (D): Concentración 50 mg/L. (E): Concentración 20 mg/L

Figura D.3 Prueba de la gota colapsada para *Pseudomonas putida* con benceno como única fuente de carbono.



(A): Concentración 500 mg/L. **(B):** Concentración 250 mg/L. **(C):** Concentración 125 mg/L. **(D):** Concentración 50 mg/L. **(E):** Concentración 20 mg/L

Anexo E. Índice de emulsificación

Figura E.1 Prueba del índice de emulsificación (%E24) para *Pseudomonas putida* con fenol como única fuente de carbono.

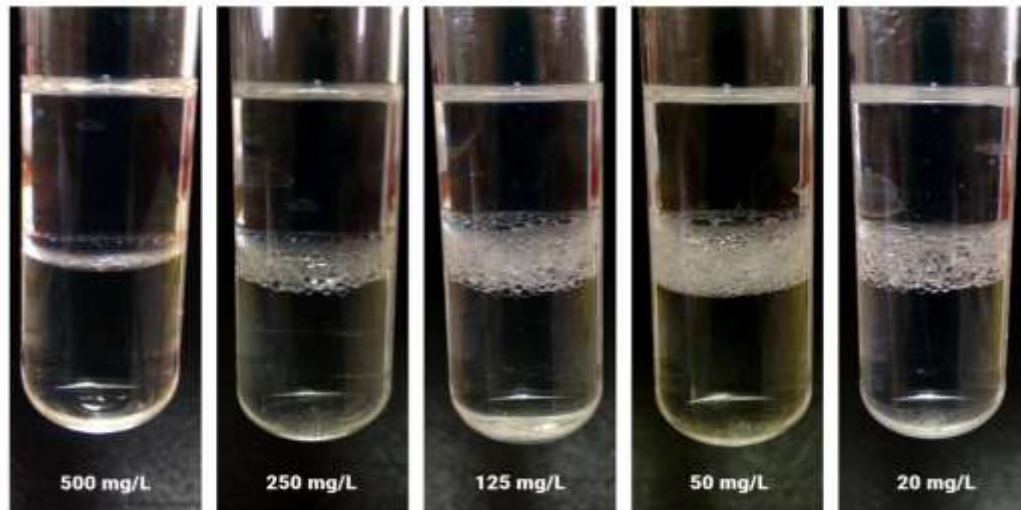


Figura E.2 Prueba del índice de emulsificación (%E24) para *Pseudomonas putida* con tolueno como única fuente de carbono.

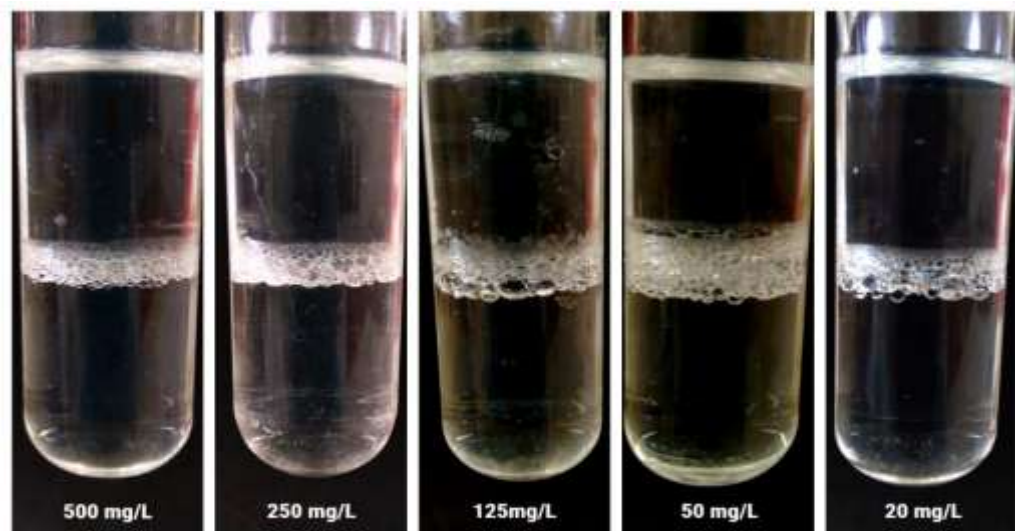


Figura E.3 Prueba del índice de emulsificación (%E24) para *Pseudomonas stutzeri* con tolueno como única fuente de carbono.

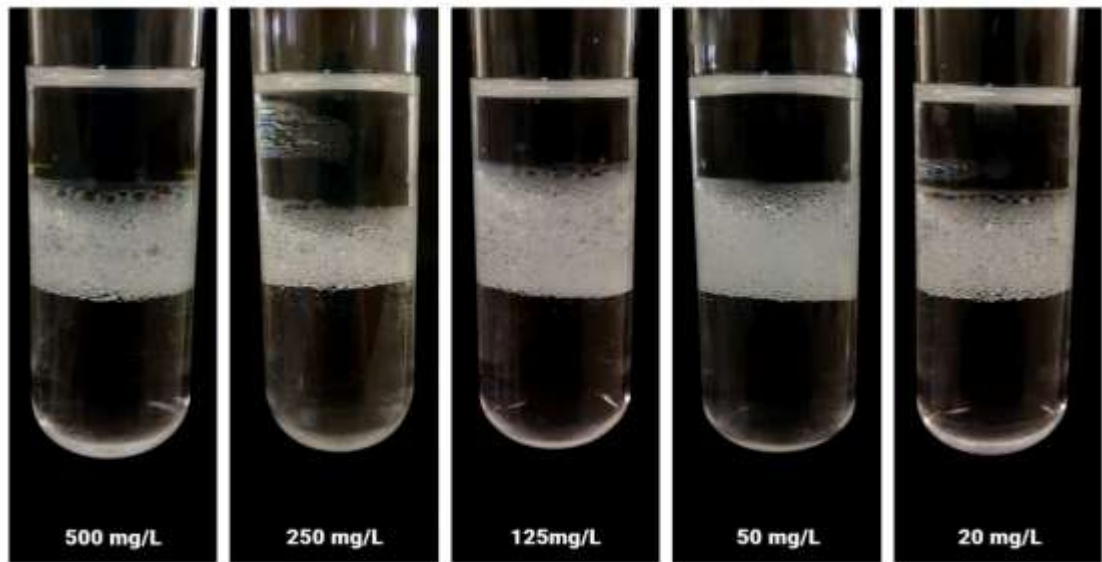
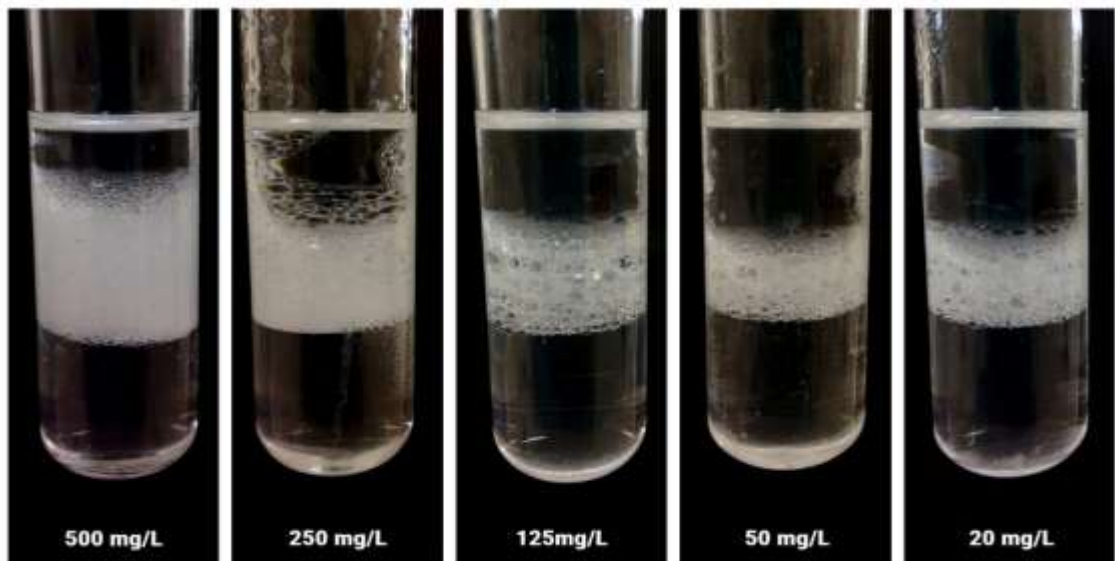


Figura E.4 Prueba del índice de emulsificación (%E24) para *Pseudomonas stutzeri* con benceno como única fuente de carbono.



Anexo F. Consumo de hidrocarburos

Tabla F.1 Concentración final de los hidrocarburos para *Pseudomonas putida*

Concentración inicial [mg/L]	Concentración final [mg/L]		
	Fenol	Tolueno	Benceno
500	209,09	54,5	110,91
250	134,71	47,36	84,82
125	35,21	33,07	58,73
50	17,6	25,92	32,65
20	11,57	4,5	2,21

Tabla F.2 Concentración final de los hidrocarburos para *Pseudomonas stutzeri*

Concentración inicial [mg/L]	Concentración final [mg/L]		
	Fenol	Tolueno	Benceno
500	376,86	120,93	91,35
250	226,45	80,21	43,96
125	100,83	30,21	28,30
50	48,76	18,79	17,43
20	15,70	6,64	7,87