

**BIODEGRADACIÓN ESTIMULADA DE AGUAS CONTAMINADAS CON  
HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAPs) POR AISLADOS  
NATIVOS *Pseudomonas spp***

**MAYRA ALEJANDRA MARIÑO BOHÓRQUEZ**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2009**

---

**BIODEGRADACIÓN ESTIMULADA DE AGUAS CONTAMINADAS CON  
HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAPs) POR AISLADOS  
NATIVOS *Pseudomonas spp***

**MAYRA ALEJANDRA MARIÑO BOHÓRQUEZ**

**Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar por el título de  
Química**

**Director  
RODRIGO TORRES SÁEZ  
Bioquímica Ph.D**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2009**

---

## CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEÓRICO	
1.1 HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS	2
1.1.1 Estructura química y propiedades	2
1.1.2 Emisiones de los HAPs	4
1.1.3 Exposición de los HAPs en seres humanos	7
1.1.4 Efecto del contacto con HAPs	7
1.1.5 Citotoxicidad asociada con los HAPs	8
1.1.6 Genotoxicidad asociada con los HAPs	8
1.2 AGUAS CONTAMINADAS CON HAPs	10
1.2.1 Análisis de muestras acuosas contaminadas con HAPs	10
1.2.2 Principales métodos de descontaminación de aguas contaminadas con HAPs	12
2. ANTECEDENTES	
2.1 <i>Pseudomonas spp</i>	16
2.2 REQUERIMIENTOS PARA EL CRECIMIENTO MICROBIANO	17
2.3 FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA BIODISPONIBILIDAD	20
2.4 ASPECTOS GENERALES DE LAS RUTAS METABÓLICAS PARA ALGUNOS HAPs POR <i>Pseudomonas spp</i>	22
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL	
3.1 CEPAS BACTERIANAS <i>Pseudomonas spp</i> ESTUDIADAS	26
3.1.1 Tratamiento para las muestras de suelo contaminado	26
3.1.2 Aislamiento de la familia Pseudomonaceae	27
3.1.3 Clasificación e Identificación de las cepas aisladas	28
3.1.4 Recuento de biomasa para cada cepa	37
3.2 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE LOS HAPs EN DIFERENTES MEDIOS SALINOS	39
3.2.1 Comparación de velocidades de degradación estimulada de los HAPs para diferentes concentraciones de hierro en el	41

---

medio salino	
3.3 EFECTO DE LA MEZCLA DE HAPs EN LA BIODEGRADACIÓN ESTIMULADA PARA UN CONSORCIO BACTERIANO	42
3.3.1 Efecto de la presencia de Triton X-100 en la degradación de una mezcla de HAPs usando un consorcio bacteriano	44
3.4 ANÁLISIS SEMICUANTITATIVO DE LAS PROTEÍNAS EXPRESADAS EN LA ESTIMULACIÓN PARA EL FENANTRENO Y PARA EL PIRENO	44
4. ANÁLISIS DE RESULTADOS	
4.1 AISLAMIENTO DE LA FAMILIA <i>Pseudomonaceae</i>	48
4.2 CLASIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS	48
4.3 CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA EL RECuento DE BIOMASA	51
4.4 RESULTADOS DE LAS CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE LOS HAPs EN DIFERENTES MEDIOS SALINOS	53
4.5 RESULTADOS DE LA COMPARACIÓN DE VELOCIDADES DE DEGRADACIÓN ESTIMULADA PARA CADA HAP	71
4.5.1 Efecto de diferentes concentraciones de hierro sobre el proceso biodegradación de los HAPs.	71
4.6 RESULTADOS DE LA BIODEGRADACIÓN ESTIMULADA EN PRESENCIA DE MEZCLAS DE HAPs USANDO UN CONSORCIO BACTERIANO	75
4.7 EFECTO DEL TRITON X-100 SOBRE LA BIODEGRADACIÓN DE HAPs UTILIZANDO AISLADOS DE <i>Pseudomonas spp</i>	79
5. CONCLUSIONES	81
6. RECOMENDACIONES	83
BIBLIOGRAFÍA	84
ANEXOS	90

---

## LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Estructura de algunos HAPs lineales, angulares y pericondensados	4
Figura 2. Diagrama de bloques con pasos a seguir para el análisis de HAPs en agua	10
Figura 3. Procesos dinámicos envueltos en la disminución de la biodisponibilidad para los HAPs	21
Figura 4. Ruta de degradación del naftaleno por algunas bacterias del género <i>Pseudomonas</i>	23
Figura 5. Ruta de degradación propuesta para el antraceno (izq) y para el fenantreno (der) para algunas bacterias del género <i>Pseudomonas</i> .	25
Figura 6. Ruta de degradación detectada para el pireno por <i>Pseudomonas saccharophila</i>	26
Figura 7. Esquema completo de la técnica: <i>siembra de dilución</i> (izq) <i>por estría en placa de agar</i> (der) aplicado a las muestras de suelo.	28
Figura 8. Procedimiento realizado para el recuento de UFC	39
Figura 9. Aislados de <i>Pseudomonas</i> nativas utilizando como medio de aislamiento agar cetrimida ICP-Barranca (izquierda) y La Mesa de los Santos (derecha)	48
Figura 10. Medio salino sin inocular (izquierda) e inoculado (derecha) por la cepa aislada de <i>Ps. cepacia</i> luego de 24 horas	51
Figura 11. Curva de calibración lineal del crecimiento para la cepa <i>Pseudomonas</i> del ICP-Barranca	52
Figura 12. Curva de calibración lineal para crecimiento de la cepa <i>Ps. cepacia</i>	52

---

Figura 13. Cinética de crecimiento para aislado de <i>Pseudomonas</i> ICP-Barranca en medio de cultivo salino con naftaleno en presencia y ausencia de hierro	54
Figura 14. Cinética de crecimiento de un aislado de <i>Pseudomonas</i> ICP-Barranca en medios de cultivo con antraceno (60 ppm) y con presencia y ausencia de hierro	57
Figura 15. Cinética de crecimiento de un aislado de <i>Pseudomonas</i> ICP-Barranca en medio de cultivo salino con Fenantreno en presencia y ausencia de hierro	58
Figura 16. Cinética de crecimiento celular de <i>Pseudomonas</i> ICP-Barranca utilizando un medio de cultivo con Pireno en presencia y ausencia de hierro	60
Figura 17. Cinética de crecimiento celular de un aislado nativo de <i>Ps. cepacia</i> en medios de cultivo con Naftaleno en presencia y ausencia de hierro	63
Figura 18. Cinética de crecimiento celular de un aislado nativo de <i>Ps. cepacia</i> en medios de cultivo con antraceno en presencia y ausencia de hierro	64
Figura 19. Cinética de crecimiento de un aislado nativo de <i>Ps. cepacia</i> en medios de cultivo con Fenantreno en presencia y ausencia de hierro	66
Figura 20. Cinética de crecimiento celular de un aislado nativo de <i>Ps. cepacia</i> en un medio de cultivo con Pireno en presencia y ausencia de hierro	68
Figura 21. Mecanismo propuesto para las intradiol dioxigenasas actuando sobre un diol-aromático (3,4-dihidroxi-HAP)	70
Figura 22. Porcentaje de remoción de los HAPs según cantidad Hierro (II)-Hierro (III) en 24 horas.	78
Figura 23. Comparación entre porcentajes de remoción sin y con tritón X-100 para 1: Naftaleno, 2: Antraceno,3: Fenantreno y 4: Pireno	80

---

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Propiedades físico-químicas de algunos HAPs.	4
Tabla 2. Composición del medio salino mínimo para <i>Pseudomonas spp</i>	40
Tabla 3. Composiciones de los geles usados en SDS-PAGE en orden de añadidura.	46
Tabla 4. Resultados de las pruebas bioquímicas para cada cepa aislada	50
Tabla 5. Correlación de datos medidos para el crecimiento de la cepa <i>Ps. ICP-Barranca</i> .	51
Tabla 6. Correlación para datos medidos durante el crecimiento de la posible cepa <i>Ps cepacia</i> .	52
Tabla 7. Resultados de la cinética de crecimiento de <i>Pseudomonas sp.</i> del ICP-Barranca en naftaleno como fuente de carbono (pre-inóculo de 10% con absorbancia a 600 nm: 0,481)	53
Tabla 8. Resultados de la cinética de crecimiento de <i>Pseudomonas</i> del ICP-Barranca en antraceno como fuente de carbono (pre-inóculo de 5% con absorbancia a 600 nm: 0,442)	56
Tabla 9. Efecto del hierro sobre el crecimiento celular de <i>Pseudomonas</i> ICP-Barranca en un medio de cultivo con antraceno como fuente de carbono	57
Tabla 10. Resultados de la cinética de crecimiento de un aislado nativo <i>Pseudomonas</i> ICP-Barranca en fenantreno como fuente de carbono (pre-inóculo de 5% con absorbancia a 600 nm: 0,372)	58

---

Tabla 11. Efecto del hierro sobre el crecimiento celular de <i>Pseudomonas</i> ICP-Barranca en un medio de cultivo con Fenantreno como fuente de carbono	59
Tabla 12. Resultados de la cinética de crecimiento de un aislado nativo <i>Pseudomonas</i> ICP-Barranca en pireno como fuente de carbono (pre-inóculo de 10% con absorbancia a 600 nm: 0,481).	59
Tabla 13. Efecto del Hierro sobre el crecimiento celular de <i>Pseudomonas</i> ICP-Barranca en un medio de cultivo con Pireno con fuente de carbono	60
Tabla 14. Resultados de la cinética de crecimiento de un aislado nativo <i>Pseudomonas</i> ICP-Barranca (pre-inóculo de 10% con absorbancia a 600 nm: 0,461) en medios de cultivo con benceno	61
Tabla 15. Resultados de la cinética de crecimiento de un aislado nativo <i>Pseudomonas</i> ICP-Barranca (pre-inóculo de 10% con absorbancia a 600 nm: 0,461) en medios de cultivo con tolueno	61
Tabla 16. Resultados de la cinética de crecimiento para <i>Pseudomonas Cepacia</i> en naftaleno como fuente de carbono (pre-inóculo de 5% con absorbancia a 600 nm: 0,360)	62
Tabla 17. Efecto del Hierro sobre el crecimiento celular de <i>Pseudomonas cepacia</i> en un medio de cultivo con Naftaleno	63
Tabla 18. Resultados de la cinética de crecimiento para <i>Pseudomonas cepacia</i> en antraceno como fuente de carbono (pre-inóculo de 5% con absorbancia a 600 nm: 0,360)	64
Tabla 19. Efecto del Hierro sobre el crecimiento celular para <i>Pseudomonas cepacia</i> en un medio de cultivo con Antraceno como fuente de carbono	65
Tabla 20. Resultados de la cinética de crecimiento para <i>Pseudomonas cepacia</i> en fenantreno como fuente de carbono (pre-inóculo	66

---

de 5% con absorbancia a 600 nm: 0,433)

Tabla 21. Efecto del hierro en el crecimiento celular de <i>Pseudomonas cepacia</i> en medio de cultivo con Fenantreno como fuente de carbono	67
Tabla 22. Cinética de crecimiento celular para <i>Pseudomonas cepacia</i> en pireno como fuente de carbono (pre-inóculo de 5% con absorbancia a 600 nm: 0,433).	68
Tabla 23. Efecto del hierro sobre el crecimiento celular para <i>Pseudomonas cepacia</i> en un medio de cultivo con Pireno como fuente de carbono	69
Tabla 24. Efecto de la concentración de $\text{Fe}(\text{SO}_4)\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sobre la biodegradación de los HAPs por 24 horas para <i>Pseudomonas</i> del ICP-Barranca.	72
Tabla 25. Efecto de la concentración de $\text{Fe}(\text{SO}_4)\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sobre la biodegradación de los HAPs por 24 horas para <i>Pseudomonas cepacia</i> .	74
Tabla 26. Efecto del $\text{Fe}(\text{SO}_4)\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sobre la Biodegradación del Antraceno en presencia de otro HAP (50 ppm cada uno) por consorcio de los 2 aislados nativos <i>Pseudomonas</i> .	75
Tabla 27. Efecto del $\text{Fe}(\text{SO}_4)\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sobre la biodegradación de una mezcla Naftaleno-Fenantreno (50 ppm cada uno) por un consorcio de los 2 aislados nativos de <i>Pseudomonas</i> .	77
Tabla 28. Porcentajes de remoción logrados durante la biodegradación simultánea de los 4 HAPs realizada por los 2 aislados nativos de <i>Pseudomonas spp</i> en diferentes medios con hierro*.	77
Tabla 29. Degradación de los HAPs (60 ppm cada uno) para las 2 cepas aisladas de <i>Pseudomonas spp</i> con 96 horas en 0,20 mM de $\text{Fe}(\text{SO}_4)\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .	79
Tabla 30. Efecto del Triton X-100 en la degradación de los HAPs (60 ppm cada uno) para las 2 cepas aisladas de <i>Pseudomonas spp</i> con 96 horas en 0,20 mM de $\text{Fe}(\text{SO}_4)\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .	79

---

## LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1. Calibraciones en el UV-VIS para los HAP en n-hexano	90
ANEXO 2. Calibraciones por HPLC-UV en 254 nm para los HAPs en acetonitrilo	92
ANEXO 3. Espectro HPLC/UV a 254 nm para 5,00 ppm de cada HAP estudiado (en orden de elución: naftaleno, fenantreno, antraceno y pireno)	94
ANEXO 4. Espectro HPLC/UV a 254 nm para 20,0 ppm de cada HAP estudiado (en orden de elución: naftaleno, fenantreno, antraceno y pireno)	95
ANEXO 5. Espectro HPLC/UV a 254 nm para 40,0 ppm de cada HAP estudiado (en orden de elución: naftaleno, fenantreno, antraceno y pireno)	96
ANEXO 6. Espectro HPLC/UV a 254 nm para 60,0 ppm de cada HAP estudiado (en orden de elución: naftaleno, fenantreno, antraceno y pireno)	97
ANEXO 7. Espectro HPLC/UV a 254 nm para 100 ppm de cada HAP estudiado (en orden de elución: naftaleno, fenantreno, antraceno y pireno)	98
ANEXO 8. Datos de las pérdidas abióticas para cada HAP en 24 horas	99

---

## RESUMEN

### TÍTULO

BIODEGRADACIÓN ESTIMULADA DE AGUAS CONTAMINADAS CON HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAPs) POR AISLADOS NATIVOS *Pseudomonas spp.*\*

### AUTOR

Mariño Bohórquez, Mayra Alejandra\*\*

### PALABRAS CLAVES

Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, *Pseudomonas spp.*, biodegradación estimulada, oxigenasas.

### DESCRIPCIÓN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) se encuentran entre los primeros compuestos químicos descubiertos por su capacidad para inducir el cáncer. Es por ello que son considerados compuestos que deben ser prioritariamente degradados para mitigar su impacto ambiental en la salud de los seres humanos. Existen muchas tecnologías para su degradación, entre las cuales se encuentran las tecnologías de biodegradación por microorganismos. Este proceso se denomina biorremediación, el cual es afectado por muchos factores ambientales, tales como la adición de nutrientes, concentración de microorganismos y condiciones de operación (pH, temperatura, oxígeno, etc.).

En este trabajo, se estudió el efecto que ejerce la presencia de hierro exógeno como nutriente, sobre la biodegradación de los HAPs. Este efecto se debería a la inducción de metaloenzimas denominadas mono-oxigenasas y dioxigenasas, que se encuentran en las *Pseudomonas spp.* y poseen en su sitio activo hierro como grupo prostético que les permite realizar la oxidación catalítica de estos sustratos. También, se determinó el efecto de estimulación del tritón X-100 al 0,1% p/v en el proceso de biodegradación de HAPs en medios de cultivo con Fe<sup>II</sup> exógeno.

Como complemento, se observó la estimulación del crecimiento celular por Fe<sup>II</sup> o Fe<sup>III</sup> exógeno para cada HAP como única fuente de carbono en los medios de cultivo de los dos aislados de *Pseudomonas sp.*, en las condiciones de cultivo estudiadas (pH 7.0±0.05, 25°C±2.0, concentración inicial: 60 ppm y agitación constante). Luego se observó que el Fe<sup>III</sup> estimuló la biodegradación de pireno y fenantreno en ambos aislados de *Pseudomonas*. A su vez, no se observó un efecto de estimulación por adición de hierro exógeno en el proceso de biodegradación cuando se usó naftaleno como fuente de carbono en los medios de cultivo, mientras que en los cultivos con antraceno como fuente de carbono hubo estimulación por Fe<sup>II</sup>.

\*Trabajo de grado.

\*\*Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Rodrigo Torres Sáez.

## SUMMARY

### TITLE

STIMULATED BIODEGRADATION OF CONTAMINATED WATER WITH POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS (PAHs) BY ISOLATED NATIVE *Pseudomonas spp.*\*

### AUTHOR

Mariño Bohórquez, Mayra Alejandra.\*\*

### KEY WORDS

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, *Pseudomonas spp.*, stimulated biodegradation, oxygenases.

### DESCRIPTION

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are among the first compounds discovered by its ability to induce cancer. That is why we are considered priority compounds that should be degraded to mitigate its environmental impact on the health of humans. There are many technologies for degradation, among which are the technologies of biodegradation by microorganisms. This process is called bioremediation, which is affected by many environmental factors such as the addition of nutrients, microbial concentration and operating conditions (pH, temperature, oxygen, etc.).

In this paper, we studied the effect exerted by the presence of exogenous iron as a nutrient on the biodegradation of PAHs. This effect is due to the induction of metalloenzymes called mono-oxygenases and dioxygenases, which are found in *Pseudomonas spp* and have iron in its active site prosthetic group that allows them to perform the catalytic oxidation of these substrates. Also, the effect of stimulation of triton X-100 0.1% w / v in the process of biodegradation of PAHs in culture media with exogenous FeII.

As a complement, we observed the stimulation of cell growth by exogenous FeII or FeIII for each PAH as sole carbon source in culture media of the two isolates of *Pseudomonas sp* in the culture conditions studied (pH  $7.0 \pm 0.05$ ,  $25^\circ \text{C} \pm 2.0$ , initial concentration: 60 ppm and agitation). This part was found that the Fe (III) stimulated the biodegradation of pyrene and phenanthrene in both isolates of *Pseudomonas*. In turn, there was no effect of stimulation by addition of exogenous iron on the biodegradation process when used naphthalene as a carbon source in culture media, whereas in the cultures with anthracene as a carbon source stimulation were for Fe (II).

\*Work of grade.

\*\* Faculty of Sciences. School of Chemistry. Director: Rodrigo Torres Sáez.

---

## INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos aromáticos polinucleares (HAPs) han sido reconocidos desde los años 70`s por la US - Environmental Protection Agency (EPA) como un grupo de contaminantes xenobióticos ubicuos en el medio ambiente. Esta apreciación se debe a que estos compuestos, y principalmente sus productos metabólicos, han sido reportados como citotóxicos, cancerígenos y mutagénicos para organismos eucariotas inferiores y superiores, ya que ellos se acumulan en suelos, agua y sedimentos, al unirse a materia orgánica, partículas suspendidas y tejidos animales luego de su liberación en el ambiente<sup>1,2,3</sup>.

Los HAPs tienden a bioacumularse en los riñones, pulmones, hígado y tejido adiposo, propiciando a largo plazo la aparición de cáncer e ictericia. Sin embargo, algunos HAPs son liberados en seres humanos dentro de unos días según sus características físicos-químicas.

Por otro lado, se encuentra una gran proporción de HAPs en aguas de superficie que provienen de la deposición de material particulado suspendido en el aire. Otras fuentes incluyen descargas de agua residual municipal, corrientes de áreas de almacenamiento de carbón, efluentes de plantas de tratamiento de madera y otras industrias que los liberan en la combustión, y por derrames o fugas accidentales originadas por la corrosión. Además, se pueden generar por derramamientos de crudo y extracciones de petróleo<sup>4,5</sup>.

Existen otras fuentes contaminantes de HAPs, las cuales dependen de la industria donde son liberados, como por ej. presencia de HAPs en lodos de plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR), u otras fuentes como la generación de gases de combustión de automóviles, desgaste de neumáticos y del asfalto, irrigación de coque sobre efluentes, lixiviados de sitios de almacenaje de carbón bituminoso y uso de fertilizantes basados en el compost<sup>6,7,8</sup>.

Los HAPs liberados en el ambiente pueden ser removidos por muchos procesos, tanto físicos, como químicos o biológicos. Entre los diferentes tecnologías disponibles se encuentran; la volatilización, foto-oxidación, oxidación química, bioacumulación y adsorción en partículas sólidas. Sin embargo, la alternativa biológicas, mediante el uso microorganismos biodegradadores de HAPs (Biorremediación), ha demostrado ser una alternativa tecnológica viable, efectiva, de bajo costo y amigable con el medio ambiente, al producir compuestos inocuos como el dióxido de carbono, agua y biomasa celular<sup>2,9</sup>.

La biorremediación ofrece la posibilidad de degradar HAPs de bajo peso molecular, los cuales, al poseer mayor solubilidad en agua, puede producir mayores efectos adversos en organismos vivos. Es por ello que es de vital importancia su eliminación en zonas industriales o afectadas por derrames accidentales de oleoductos.

Aunque esta alternativa de descontaminación es de gran interés por su bajo costo, en este estudio se pretende estudiar el efecto de una sal de hierro sobre el proceso de biorremediación de HAPs de diferente complejidad molecular, empleando cepas autóctonas de *Pseudomonas sp.*, las cuales serán bioestimuladas con esta sal de hierro de manera favorecer el proceso de biorremediación de HAPS en medio líquido.

## **1. MARCO TEÓRICO**

### **1.1 HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS**

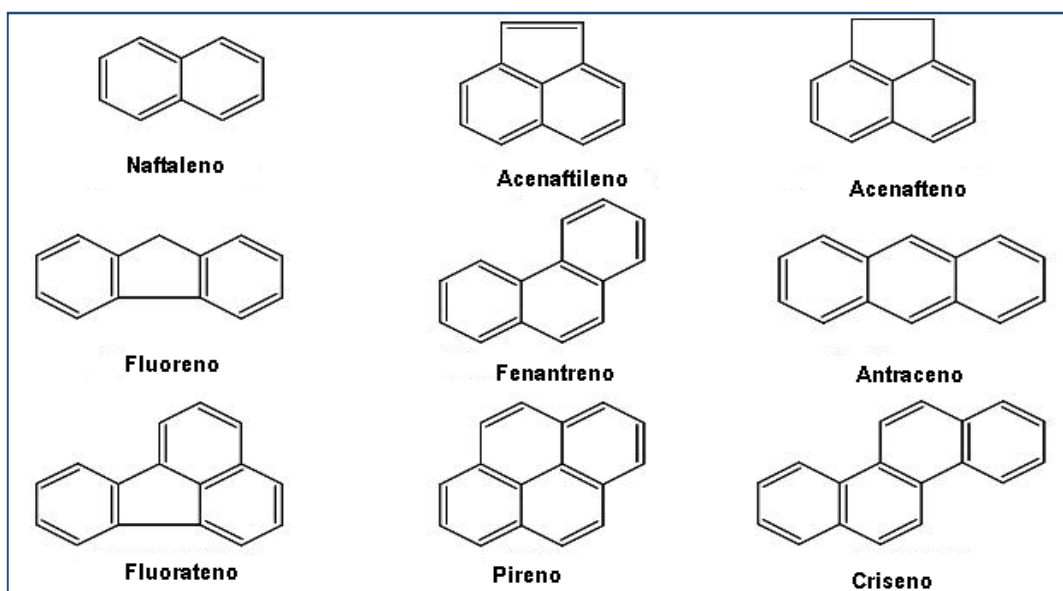
#### **1.1.1 Estructura química y propiedades**

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son una clase de compuestos químicos hidrofóbicos estructuralmente similares, caracterizados por la presencia

de 2 o más anillos aromáticos fusionados, sin heteroátomos y semivolátiles ubicuos en el medio ambiente.

De este modo, existe un gran número de HAPs que difieren en el número de anillos aromáticos, la posición en la que los anillos aromáticos están fusionados a otros y los tipos sustituyentes, todo lo cual afecta sus propiedades físicas y químicas. Respecto a las diferencias en las posiciones en la que un anillo se fusiona a otro, existen 3 formas de unión, la unión pericondensada o racimo de alta simetría (pireno, coroneno, etc), la unión linear como el antraceno y la unión catacondensada o en escalón (fenantreno, criseno, etc).

Las características físicas y químicas de los HAPs (Ver tabla 1) varían con el peso molecular, así la resistencia a la oxidación y reducción, como la vaporización, aumentan con el incremento en el peso molecular, mientras que decrece la solubilidad en agua de estos compuestos. Como resultado de estas propiedades, ellos difieren en su comportamiento químico, distribución en el ambiente y sus efectos en sistemas biológicos. Según sus propiedades pueden dividirse en 2 grupos, los HAPs de baja masa molecular (2 a 3 anillos unidos como los naftalenos, fluorenos, fenantrenos y antracenos). los cuales poseen toxicidad aguda en organismos acuáticos, y los HAPs de alta masa molecular (4 a 7 anillos unidos desde crisenos a coronenos) los cuales no poseen marcada toxicidad en organismos acuáticos debido a su poca hidrofilia. No obstante, varios de estos compuestos pesados son conocidos por inducir cáncer<sup>10</sup>.



**Figura 1.** Estructura de algunos HAPs lineales, angulares y pericondensados

**Tabla 1.** Propiedades físico-químicas de algunos HAPs (Juhasz and Naidu, 2000)<sup>11</sup>

HAP	No. de anillos	PM (g/mol)	Pto. de fusión (°C)	Pto. de ebullición (°C)	Presión de vapor a 25°C (mm Hg)	Solubilidad en agua a 25 °C (mg/L)	log K <sub>ow</sub> <sup>a</sup>
<b>Naftaleno</b>	2	128,17	80,2	218	1,8x10 <sup>-2</sup>	23,3	3,37
<b>Antraceno</b>	3	178,23	216	340	2,0x10 <sup>-4</sup>	0,07	4,45
<b>Fenantreno</b>	3	178,23	101	340	6,8x10 <sup>-4</sup>	1,29	4,46
<b>Pireno</b>	4	202,26	149	360	6,8x10 <sup>-7</sup>	0,14	5,32
<b>Criseno</b>	4	228,29	258	448	6,3x10 <sup>-7</sup>	0,002	5,61

<sup>a</sup> log K<sub>ow</sub>: logaritmo del coeficiente de partición octanol:agua.

### 1.1.2 Emisiones de los HAPs

La presencia de los HAPs en la atmósfera es resultado de varios procesos, tanto naturales como antropogénicos (Ver tabla 2), siendo la quema incompleta de materia orgánica la principal fuente antropogénica de HAPs. Podemos encontrar desde alimentos cocinados (quemados), hasta combustibles para calentar en

centrales térmicas, así como desechos (madera, residuos de basura, estiércol, etc), o productos de la combustión de combustibles fósiles, plantas de coque y alquitrán. Se encuentran también productos de las emisiones naturales:

- Incendios forestales y emisiones de volcanes producto de transformaciones orgánicas en suelos y sedimentos (origen diagénico)
- Biosíntesis por cierto tipo plantas (origen biogénico)
- Transformación anaerobia de material orgánico a combustible fósil (origen petrogénico).

- **Presencia de los HAPs en la atmósfera**

Durante la quema de madera se ha determinado que los siguientes HAPs se encuentran en mayor proporción (3 a 5 veces más) en comparación a sitios donde no se realiza esta actividad: antraceno, fenantreno, benzo(ghi)fluoranteno, ciclopenta(cd)pireno, benzo(a)antraceno, criseno/trifenileno, benzo(a)pireno (BaP), indeno(1,2,3-cd)pireno, benzo(ghi)perileno, y coroneno<sup>12</sup>.

Asimismo, el material particulado en la atmósfera de sitio urbanos está constituido por: naftaleno, acenaftaleno, acenaftileno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno/trifenileno, benzo(a)antraceno, benzo(j+b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1.2.3-cd)pireno, dibenzo, benzo(ghi)perileno y benzo(e)pireno. No obstante, sus concentraciones respectivas diferirán en gran medida dependiendo del sitio estudiado<sup>13</sup>.

El aire urbano contiene aproximadamente 5 veces más concentración de HAPs (0,15-19,3 ng/m<sup>3</sup>) que el aire rural (0,02-1,2 ng/m<sup>3</sup>). Por otro lado, las concentraciones en temporadas de invierno en países con estaciones son 5 a 10 veces más altas que las concentraciones en verano, debido a las diferencias en temperatura, a la radiación solar y al incremento en las emisiones por calentamiento<sup>14</sup>.

Se estima que de 10.000 a 30.000 toneladas (8.900-26.800 toneladas métricas) de HAPs son emitidas anualmente en Estados Unidos y 280 toneladas en países como

Suecia, que posee una gran actividad de quema residencial debido al invierno (mayor que las emisiones por tráfico). China por ser el país desarrollado con mayor densidad poblacional, es el que posee mayores emisiones de HAPs, con 114.000 toneladas anuales en el 2004, constituyendo el 22% de las emisiones mundiales; correspondiendo el 34.6% a quema de paja, 26.2% a producción de coque, 21.2% a quema de madera y el 6.8% a combustión doméstica de carbón.

Otras fuentes incluyen contaminación del aire por la industria, por ejemplo, un ingenio de diesel, emisiones por tráfico, humo de tabaco, pirólisis de carbón, y quemar o cocinar con combustibles fósiles<sup>12,14,15</sup>.

- **Presencia de los HAPs en el agua**

Respecto a las fuentes de HAPs en las superficies de aguas, existe una gran cantidad que proviene de la deposición de las suspensiones en el aire por emisiones industriales. Otras fuentes incluyen descargas de aguas residuales municipales, corrientes de áreas de almacenamiento de carbón, efluentes de plantas de tratamiento de madera y otras industrias. Además, los derramamientos accidentales de crudo y lixiviados en aguas superficiales y subterráneas durante las extracciones de petróleo constituyen una fuente importante de HAPs en aguas<sup>16,17</sup>.

La fuente principal de HAPs dependerá del ambiente industrial dominante. Otras fuentes son los gases de escape de los automóviles, el desgaste de neumáticos y del asfalto, la irrigación de coque sobre efluentes y derrames, y fugas o lixiviados en tanques de almacenamiento con problemas de corrosión que contengan carbón bituminoso o asfalto<sup>18,19,20</sup>.

A nivel del suelo, puede ocurrir la deposición de HAPs desde la atmósfera, u otras fuentes ya mencionadas anteriormente, aunque la principal fuente es la formación natural anaeróbica de combustible fósil, el cual es extraído y usado industrialmente como petróleo, asfalto, alquitrán de hulla y/o creosota.

### **1.1.3 Exposición de los HAPs en seres humanos**

Un contacto frecuente con los HAPs ocurre a través de la ingestión de comida, ya sea porque ha sido cocinada en exceso, porque ha sido contaminada durante su tratamiento o por haber sido preparada aprovechando la combustión de la madera. En este sentido, la cantidad ingerida varía de acuerdo con el estilo de vida. No obstante, la comida asada, frita o ahumada, la comida de mar y los aceites minerales producidos por combustión (como el aceite de oliva y de orujo) son más propensos a entrar en contacto directo con este tipo de compuestos contaminantes<sup>21,22</sup>.

Otras exposiciones importantes en el ambiente urbano son producidas a través de inhalación pasiva y activa del humo del tabaco, humo de la madera y demás contaminación atmosférica, así como el contacto dérmico con el alquitrán de hulla en cosméticos y champús o por aire contaminado en plantas procesadoras de coque, alquitrán, asfalto y creosota<sup>12</sup>.

### **1.1.4 Efectos del contacto con HAPs**

Existen varias consecuencias del contacto directo con los HAPs, los cuales tienden a almacenarse en los riñones, hígado y tejido adiposo cuando son consumidos. Así por ejemplo, la respiración de material particulado tiende a producir cáncer a largo plazo, principalmente de pulmón y de seno. Sin embargo, en seres humanos los HAPs pueden ser liberados dentro de unos días de acuerdo con el tipo de HAPs, evento que generalmente depende del valor de coeficiente de partición octanol-agua ( $K_{ow}$ ) del HAP absorbido por el cuerpo.

El valor del  $K_{ow}$  para cada HAP determinará la eliminación del mismo del organismo en cuestión, ya que para valores altos de  $K_{ow}$  (más de 4 anillos aromáticos) habrá menor permeabilidad en las membranas del organismo por el gran tamaño molecular del HAP y de este modo poca bioconcentración, y viceversa<sup>23,24</sup>.

Frecuentemente se evalúan los metabolitos de los HAPs de forma individual por su peligrosidad como contaminantes o xenobióticos debido a que pueden ser tóxicos o genotóxicos (teratogénicos, mutagénicos y/o cancerígenos) según el número de anillos fusionados.

### 1.1.5 Citotoxicidad asociada con los HAPs

Los HAPs de baja masa molecular (hasta 3 anillos) tienden a ser más citotóxicos al disolverse más fácilmente en agua, siendo el antraceno de un gran potencial citotóxico, con un  $CL_{50}$  de  $0,352 \mu\text{M}$ , lo cual lo hace 10 veces más letal que el BaP<sup>25</sup>. Estas medidas se determinaron usando el colorante supravital rojo neutro, el cual colorea las células viables al atravesar solamente las membranas plasmáticas intactas y almacenarse en los lisosomas<sup>26</sup>.

Igualmente, los naftalenos son muy peligrosos en medio acuoso debido a su movilidad y toxicidad. En general, los naftalenos clorados son muy tóxicos para los organismos acuáticos y también son muy persistentes, por lo que las aguas con altas concentraciones de PAHs no deben ser tratadas con cloro.

Por otro lado, la citotoxicidad de los HAPs pesados está relacionada con la presencia de luz ultravioleta y oxígeno, pues al presentarse foto-degradación se generan compuestos tóxicos tras la excitación de los HAPs<sup>27</sup>.

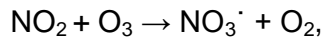
### 1.1.6 Genotoxicidad asociada con los HAPs

Por otra parte, se ha comprobado que varios de los HAPs de masa molecular alta (más de 4 anillos) han producido cáncer de pulmón o de piel. Se han generado también efectos mutagénicos y carcinogénicos mediante fragmentación del DNA y formación de aductos de PAH-DNA en organismos capaces de metabolizarlos, incluso a bajas dosis. Por ej. Por efecto de exposición a bajas concentraciones de BaP<sup>25,28,29,30</sup>.

El fraccionamiento de la cadena de DNA generado por el metabolismo de los HAPs es asociado con la activación de enzimas peroxidasas, lo cual se ha confirmado principalmente por medidas indirectas de producción de radicales superóxido en células polimorfonucleares humanas *in vitro*<sup>25</sup>.

Este potencial genotóxico también puede ser apreciable para HAPs de bajo peso molecular como el naftaleno, el fenantreno y el pireno que se encuentran en la atmósfera como material particulado, los cuales llevan a cabo reacciones por medio de radical  $\text{NO}_3\cdot$ .

Dicho radical formado durante las noches a partir del NO<sub>2</sub> que no puede fotolizarse y el ozono acumulado durante el día, según la reacción:



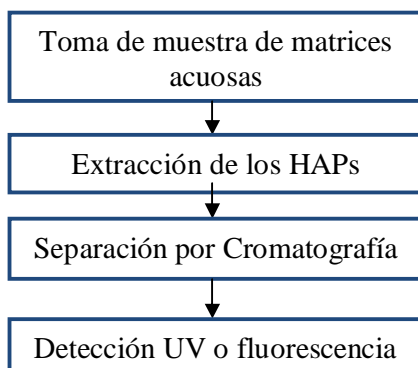
Con la cual se generan compuestos nitrogenados (2-nitronaftaleno, 2-nitrodibenzopiranona y nitropireno lactonas) que demostraron tener gran potencial mutagénico al causar mutaciones puntuales en las vías de síntesis de histidina en *Salmonella typhiimurium*, lo cual fue comprobado mediante el uso de la prueba de reversión de histidina o test de Ames<sup>31,32</sup>. Este test consiste en la expresión de características genotípicas que le permiten crecer sin histidina en el medio de cultivo a las bacterias, lo cual no es posible en condiciones nativas, debido a la auxotrofia de la bacteria. Sin embargo, el agente mutagénico causa una reversión que permite a la bacteria sintetizar la histidina al sustituir las bases y con ello crear mutaciones en el genoma del organismo por cambio de los codones de expresión, debido esencialmente a la presencia de indoles en los nucleótidos, lo cual permite a las cepas mutantes sobrevivir sin histidina<sup>33</sup>.

De manera similar, se evaluó el potencial genotóxico en linfocitos humanos, dando resultados positivos para los tres compuestos, por medio de la prueba CREST micronuclear modificada, la cual detecta pérdida de cromosomas y eventuales rompimientos del DNA, así como la capacidad de expresar citocromo P450 y epóxido hidrolasas<sup>32,33</sup>.

## 1.2 AGUAS CONTAMINADAS CON HAPs

### 1.2.1 Análisis de muestras acuosas contaminadas con HAPs

Una estrategia de análisis de los HAPs se muestra en el esquema general siguiente:



**Figura 2.** Diagrama de bloques con pasos a seguir para el análisis de HAPs en agua

La extracción más simple de HAPs a partir de la muestra acuosa suele ser de tipo líquido-líquido, lo cual permite el reparto selectivo del analito entre la fase acuosa de la muestra y un disolvente orgánico apolar como el n-hexano, el ciclohexano o el diclorometano. Aunque con dicha técnica se genera gran pérdida de disolvente, la recuperación del analito es considerada buena si se compara con la extracción en fase sólida mediante el uso de sistemas de extracción fase sólida que retienen el analito, el cual posteriormente debe ser desorbido para ser recuperado

Posteriormente, se debe seleccionar una técnica para separar los HAPs en el caso de que éstos se encuentren en una mezcla. En caso contrario, se puede detectar directamente con un espectrofotómetro por absorción en el ultravioleta-visible, usando una curva de calibración si la muestra tiene baja concentración del HAP (bajo límite de detección y alta sensibilidad si se han eliminado las interferencias).

Para el caso de las mezclas de HAPs, la mejor técnica de separación y análisis es la cromatografía, ya sea por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) o Cromatografía de Gases (GC). La cromatografía en fase reversa es la que se

considera más adecuada para la separación de los HAPs así como de otros compuestos orgánicos apolares, debido al gran poder de separación de esta técnica cuando se aplica a HAPs. En ella, la fase estacionaria es una matriz de sílice a la que se unen moléculas orgánicas (hidrocarburos saturados, insaturados o aromáticos de diferentes tipos), las cuales serán las causantes de la retención de las moléculas del analito y de que éstas eluyan de la columna en un orden u otro dependiendo de la polaridad de la fase móvil, la cual es distinta de la fase estacionaria.

Otro tipo de cromatografía utilizada es la Cromatografía de Gases (GC). En ella la fase móvil es un gas inerte ( $N_2$ , He,  $CO_2$ , Ar) que transporta la muestra vaporizada por el interior de la columna cromatográfica, en la que se encuentra un material específico (en forma de sólido como relleno o como líquido adsorbido a las paredes) que retiene a los analitos. La columna cromatográfica (fase estacionaria) se encuentra controlada térmicamente, para que eluyan los analitos retenidos en la fase estacionaria (normalmente líquida) en función de los puntos de ebullición y las solubilidades en ella.

La columna puede trabajarse en modo de isoterma o con un programa de temperaturas que realice el trabajo de ir eluyendo los analitos del interior de la columna, debe elegirse de tal forma que su polaridad sea bastante similar a la de los analitos y para la elución se utiliza una fase móvil de polaridad considerablemente distinta y así la polaridad modificará los factores de retención.

Posteriormente, se debe seleccionar el sistema de detección para la concentración de los HAPs separados, lo cual dependerá de la sensibilidad que se requiera para la cuantificación de cada uno. La mayoría de métodos donde se usa extracción líquido-líquido, se realiza la detección de los PHAs en el espectro ultravioleta-visible a 254 nm y a diferentes longitudes de onda para cada HAP por separado. Se pueden también detectar por fluorescencia fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 280 nm para absorción y 389 nm para emisión<sup>34</sup>.

### **1.2.2 Principales métodos de descontaminación de aguas contaminadas con HAPs**

Debido a la preocupación por la ubicuidad y persistencia de los HAPs en el medio ambiente, es necesario realizar la descontaminación de los cuerpos de agua contaminados con HAPs. Es por ello que muchas agencias ambientales, como las de la Comunidad Europea (EC, European Community), la Agencia Norteamericana de Protección Ambiental (U.S EPA) y el Consejo Canadiense del Ministerio del Ambiente (Canadian Council of Ministers of the Environment) han desarrollado legislación dirigida a las industrias que extraen, refinan, almacenan y transportan este tipo de contaminantes apolares<sup>2</sup>.

La Conferencia Internacional para prevenir la Contaminación de las Aguas del Mar por Hidrocarburos de 1962 en su resolución 9, expidió el acuerdo con el gobierno para los casos de recogida de hidrocarburos procedentes del drenaje de las máquinas de los buques, en los puertos no dotados de instalaciones adecuadas de recepción o por accidentes debido a los accidentes por derrames que han ocasionado grandes desastres ambientales<sup>35</sup>.

Los principales métodos que contribuyen en la eliminación de los HAPs presentes en el agua subterránea o superficial, ya sea por un emplazamiento contaminado u otras fuentes ya mencionadas, son:

- **Foto-oxidación:**

Debido a que algunos HAPs se oxidan fácilmente en la atmósfera con la luz ultravioleta, existen métodos, clasificados entre las Tecnologías de procesos Avanzados de Oxidación (TAO), basados en la foto-degradación inducida por radiación ultravioleta en ausencia de un catalizador o en presencia de un catalizador (degradación foto-catalítica), de modo que el contaminante absorbe energía y es excitado electrónicamente sufriendo subsecuentes transformaciones.

En este proceso el oxígeno reaccionante se encuentra disuelto en el agua y se requiere de la presencia de grupos radicales hidroxilo del agua para iniciar el proceso. A su vez, se deben generar varias fragmentaciones para la obtención final de CO<sub>2</sub>, agua y ácidos inorgánicos, lo cual dependerá principalmente de la cantidad de luz solar o ultravioleta y los niveles de concentración del oxígeno.

En la fotocatalisis se incluye un material semiconductor (TiO<sub>2</sub> generalmente) que absorbe el PAH y posteriormente la radiación ultravioleta y así indirectamente degrada los contaminantes por medio de reacciones redox<sup>36</sup>. Esta técnica es de gran interés para eliminar HAPs en aguas en los casos en que no sea posible la degradación microbiana (cuando se debe degradar HAPs de alto peso molecular).

- **Oxidación química:**

La oxidación suele ser apropiada como un pre-tratamiento para HAPs de alta masa molecular o HAPs en ambientes muy hostiles para el crecimiento de microbiota nativa (en sitios de derrames de crudo o ambientes industriales), Sin embargo, debe ir acompañada por una técnica complementaria, ya que la oxidación sólo atenúa el contaminante, pero no lo elimina, generando en algunas ocasiones productos más tóxicos que los propios HAPs<sup>37</sup>.

Las opciones más reconocidas por su rapidez y eficiencia se agrupan en los Procesos de Oxidación Avanzada (AOPS por sus siglas en inglés), donde se crea una interfase con un compuesto inorgánico que absorbe el PAH en la suspensión acuosa, entre los cuales se destacan:

UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV/ozono, ozono/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fenton y UV/TiO<sub>2</sub> ya mencionada, aplicadas tanto para componentes de la gasolina (entre ellos el metil-ter-butil-eter o MTBE) como para los HAPs.

Sin embargo, se deben tener en cuenta las interferencias presentes en el agua, como los compuestos inorgánicos y orgánicos, el pH y los metales que afectan la

eficiencia del proceso, de modo que la interfase dependerá de la matriz a recuperar y del presupuesto, pues se trata de técnicas solo aplicables fuera del sitio de contaminación (off-site: traslado del agua a tratar), así que su aplicación en aguas subterráneas puede presentar inconvenientes para el traslado<sup>38,39,40</sup>.

- **Adsorción en partículas sólidas:**

Una opción para recuperar aguas subterráneas contaminadas con HAPs es la instalación de barreras permeables reactivas (PRBs) en el subsuelo, las cuales se rellenan con un material reactivo oxidante que transforma los contaminantes, o con un material adsorbente que los retiene, reduciéndose así su movilidad y toxicidad.

Esta técnica PRB combina varios procesos de acuerdo con material reactivo a utilizar. La elección de este material dependerá del grado y tipo de contaminación en las aguas, de las interferencias presentes o calidad del agua a tratar, y de la caracterización del suelo para conocer la viabilidad de la PRB. De este modo, pueden usarse tratamientos físicos, químicos o biológicos para recuperar el agua contaminada.

La principal ventaja de este método es que opera *in-situ*, sus operaciones son reducidas, posee mantenimiento de bajo costo, y además pueden implementarse otras opciones para mejorar el proceso (catalizadores metálicos, agentes quelantes para inmovilizar metales, nutrientes y oxígeno para biorremediación usando medios permeables con oxígeno)<sup>41</sup>.

- **Degradación por transformación microbiológica:**

Las aguas contaminadas con HAPs, tanto saladas como dulces debido a las diversas fuentes ya mencionadas, pueden ser tratadas aprovechando la capacidad que tienen algunos microorganismos para degradar HAPs en sustancias inertes, CO<sub>2</sub> y agua. Esta metodología puede aplicarse de varias formas, ya sea como lodo activado (Microorganismos en estado suspendido), o con los microorganismos retenidos en un soporte sólido (microorganismos inmovilizados) que puede presentarse en diferentes modelos (por ejemplo, a manera de disco de material orgánico o metálico con el soporte interno para los microorganismos). Esta aplicación con soportes sólidos posee la ventaja de que pueden manipularse más fácilmente las condiciones propicias para el crecimiento de los microorganismos. Algunas cepas del género *Pseudomonaceae* han demostrado un metabolismo muy

versátil al lograr degradar HAPs de diversas masas moleculares, pero como toda técnica deben optimizarse las condiciones para obtener resultados más rápidos y eficientes.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 *Pseudomonas spp*

Las *Pseudomonas* son un género de bacterias con forma de bacilos que presentan una membrana interna que rodea el citoplasma bacteriano, una pared celular exterior constituida de peptidoglicano y una segunda membrana externa. La capa de peptidoglicano en estas bacterias se presenta más delgada al tener un segundo recubrimiento, y con un espacio entre membrana interna y externa llamado espacio periplásmico, que posee muchas enzimas encargadas del transporte de nutrientes.

Estas bacterias se clasifican como gram negativas según la respuesta a la tinción diferencial Gram (genera coloración azul-morado para gram positivas que solo poseen una capa gruesa de peptidoglicano y coloración rosado-fucsia para gram negativas)<sup>42</sup>. La explicación para esta diferencia de respuestas hacia los colorantes se debe principalmente por el mayor contenido de lípidos en las bacterias Gram negativas en comparación con las bacterias Gram positivas, ya que el tratamiento con alcohol-acetona (decoloración) extrae los lípidos de las bacterias Gram negativas y así se aumenta la permeabilidad de la pared celular (en las Gram positivas hay reducción de la permeabilidad por deshidratación), así el complejo insoluble de violeta de genciana-lugol, creado en la tinción diferencial se decolora fácilmente y resulta solo la observación del colorante de contraste fucsia (safrarina)<sup>43</sup>.

Otras características estructurales de las *Pseudomonas spp* es la presencia de flagelos difíciles de observar al microscopio y de composición proteica que cumplen la función de coordinar los movimientos de acuerdo a las sustancias químicas en su medio ambiente (quimiotaxis) e igualmente en algunas cepas la presencia de cápsulas en la parte exterior de la pared celular formadas por

polisacáridos (poli- $\beta$ -hidroxibutirato en el caso de algunas *Pseudomonas*) que ayudan en la adhesión a superficies, protección a la fagocitosis o como material de reserva<sup>42</sup>.

## 2.2 REQUERIMIENTOS PARA EL CRECIMIENTO BACTERIANO<sup>44</sup>

A nivel celular los parámetros que afectan el crecimiento de los microorganismos aerobios como las *Pseudomonas* son:

**La temperatura:** Para las *Pseudomonas spp* la mejor condición de crecimiento corresponde entre 25 a 30°C, aunque algunas pueden crecer a 41°C o incluso debajo de 45°C hasta los 10-15°C (mesofílicas) y otras por debajo de 15-30°C hasta llegar de 0-4°C (psicrofílicas) que se adaptan gracias cierta tipo de ácidos grasos insaturados presentes en sus membranas plasmáticas.

**Concentración de O<sub>2</sub>:** Aunque generalmente exista gran cantidad disponible en el agua, los microorganismos aerobios (reciben oxígeno comoceptor final de electrones en la respiración) y aerobios facultativos (cambian su tipo de metabolismo entre aerobio y anaerobio) exhiben un gran rango de respuesta al oxígeno molecular, ya sea para controlar la acumulación letal de superóxido (superóxido dismutasa), para descomponer el peróxido de hidrógeno (catalasa y/o peroxidasa) o en este caso para oxidar compuestos aromáticos como los HAPs (oxigenasas, dioxigenasas, entre otras).

**Concentración de ion hidrógeno (pH):** para cada organismo el rango de pH en que puede crecer consta de 3 rangos cardinales:

pH mínimo, por debajo del cual no puede crecer

pH máximo, por encima del cual no puede crecer

pH óptimo, donde el organismo crece mejor

Muchas bacterias poseen un orden creciente en la velocidad de crecimiento entre el pH mínimo y el pH óptimo y un correspondiente orden decreciente entre el pH óptimo y el pH máximo, lo cual refleja el efecto de cambio en la concentración del ion hidrógeno en las velocidades de reacción enzimática.

Durante la preparación y durante el uso del medio de cultivo, debe considerarse siempre el pH óptimo de crecimiento del organismo deseado e incorporar buffers para mantener el pH del medio afectado por los productos de desecho de las bacterias durante el crecimiento.

Para muchas cepas de *Pseudomonas* el pH mínimo se encuentra en 5.6, el pH óptimo entre 6.6-7.0 y el pH máximo de 8.0.

**Disponibilidad de agua:** la disponibilidad de agua es el factor crítico que afecta el crecimiento de todas las células y ello dependerá de la humedad relativa en la atmósfera o su presencia en solución o en una sustancia (actividad del agua). Esta actividad es afectada por la presencia de solutos como las sales o azúcares disueltos en el agua y mientras más alta es la concentración del soluto, más baja será la actividad del agua y viceversa.

Los microorganismos viven sobre un rango de actividad del agua entre 1.0-0.7, en la sangre humana hay 0.99, el agua del mar es 0.98 y en suelos de agricultura el rango es de 0.9-1.0.

La clasificación de las bacterias según su crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl (la sal más común en la naturaleza bajo amplios rangos de concentración) es:

**Medio halófilos:** requieren entre 1-6% de sal para crecer

**Halófilos moderados:** requieren entre 6-15% de sal para crecer

**Halófilos extremos:** requieren entre 15-30% de sal para crecer

**Halotolerantes u osmotolerantes:** crecen mejor en ausencia de NaCl

**Osmófilos:** son capaces de crecer en medios con alto contenido de azúcar

Respecto a las *Pseudomonas* la mínima actividad del agua en la que son capaces de crecer es para 0,91, lo que las sitúa en el rango de osmotolerancia o halotolerancia.

**Nutrientes para poder degradar los sustratos:** las sustancias requeridas para generar energía y biosíntesis celular en el medio de cultivo se clasifican en:

Elementos mayoritarios: C, H, O, N, S, P, K, Mg, Fe, Ca y Mn.

Elementos traza: Zn, Co, Cu y Mo.

Estos elementos se encuentran como iones inorgánicos y pequeñas moléculas en el agua y su composición varía de acuerdo al género de bacteria.

En general cada medio salino para microorganismos debe poseer estrictamente lo siguiente:

**Nitrógeno (en forma de nitrato o amoniacal):** constituyente de aminoácidos, ácidos nucleicos, nucleótidos y coenzimas

**Fósforo (en forma de fosfatos):** como constituyente de los ácidos nucleicos, nucleótidos, fosfolípidos y demás

**Azufre (en forma de sulfatos):** como constituyente de la cisteína, metionina, glutatión y varias coenzimas

**Potasio (en forma de sales):** como constituyente de cofactores de ciertas enzimas y principal catión inorgánico celular para obtener energía

**Magnesio (en forma de sales):** como constituyente de cofactores de ciertas reacciones enzimáticas y catión celular

**Calcio (en forma de sales):** como constituyente de ciertas enzimas y componente de endosporas)

**Hierro (en forma de sales):** como componente de citocromos, enzimas con grupo hemo y componente prostético de enzimas como las involucradas en el ciclo de

Krebs y cofactores para ciertas enzimas como las di-oxigenasas y mono-oxigenasas involucradas en la oxidación de los HAPs. (bacteriW y Fe artículo)

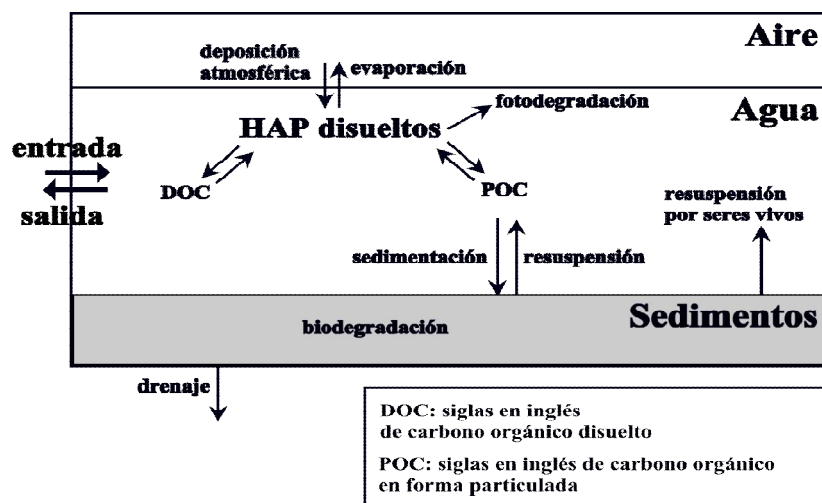
Este ambiente bioquímico (nutricional) se encuentra disponible como medio de cultivo y dependiendo de la necesidad particular de cada bacteria existe gran variedad de medios de cultivo con diferentes propósitos y usos. De este modo el medio líquido se usa para el crecimiento de cultivos puros por lotes (batch), mientras el medio sólido o semisólido (agar) se usa principalmente para el aislamiento de cultivos puros usados varios propósitos.

### **2.3 FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA BIODISPONIBILIDAD**

A nivel abiótico los parámetros determinantes de la biodisponibilidad (fracción del contaminante presente en el agua que pueda ser transferida a los tejidos de un organismo durante su tiempo de vida) son:

***El equilibrio de partición:*** en el caso de los HAPs depende del carácter hidrofóbico ya mencionado, el contenido de lípidos del organismo y las características del agua (contenido de sedimentos como material orgánico). Dicha distribución en el medio contaminado determina en gran parte la magnitud de la biotransformación por el microorganismo, esto debido a que por la baja solubilidad en agua y altos coeficientes de partición octanol-agua, la concentración de los HAPs en agua será muy baja y de este modo se acumulan en los finos granos de sedimentos a manera de reservorio.

De forma general para naftaleno, antraceno y fenantreno entre el 15 al 30% permanece unido al material orgánico disuelto presente en el agua, y en mayor proporción para hidrocarburos con  $K_{ow} < 5,00$ ; además, influyen otros factores abióticos generados por procesos dinámicos (drenaje, lluvias, etc) tal como se muestra en la figura 3<sup>11</sup>.



**Figura 3.** Procesos dinámicos envueltos en la disminución de la biodisponibilidad para los HAPs.

**Especie de microorganismo:** el otro parámetro, independiente de la biodisponibilidad que exista del HAP en el medio acuoso, es la capacidad de transporte que tenga el microorganismo para cada HAP, ya que según sus propiedades físico-químicas, el contaminante podrá permear a nivel celular de acuerdo con la solubilidad de las moléculas en el tejido graso de la membrana externa e interna del organismo.

Existen cepas de *Pseudomonas* que han inducido la síntesis de biosurfactantes en presencia del antraceno, aumentado de esta manera la biodisponibilidad del HAP en el ambiente y esta producción de un surfactante (posiblemente ramnolípido) puede ser estimulada debido a la presencia de hierro en forma de una sal adecuada (soluble en agua y bajo una concentración no tóxica para el microorganismo).

La ruta de esta síntesis puede ser estudiada, ya sea por técnicas electroforéticas (en una dimensión 1D o en dos dimensiones 2D) para determinar las enzimas implicadas y/o por técnicas más complejas como marcaje isotópico o HPLC-espectrometría masas<sup>45</sup>.

## 2.4 ASPECTOS GENERALES DE LAS RUTAS METABÓLICAS PARA ALGUNOS HAPs POR *Pseudomonas spp*

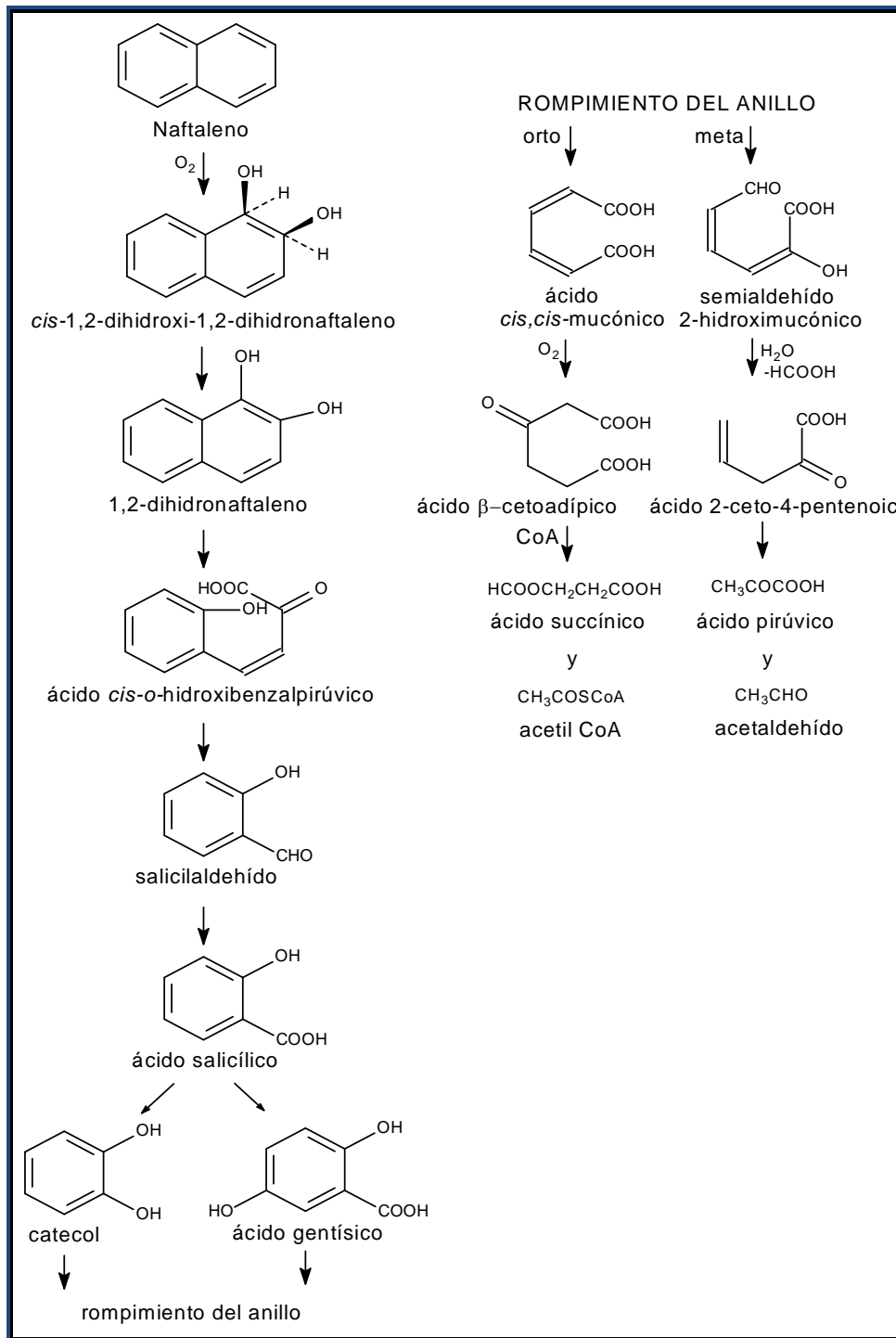
Los pasos metabólicos iniciales llevados a cabo por enzimas oxidativas en las *Pseudomonas* son específicos para cada uno de los diferentes compuestos aromáticos. Sin embargo, una vez que se genera el rompimiento del anillo aromático, y los pasos posteriores para generar los metabolitos intermediarios, éstos son generalmente degradados en el ciclo de Krebs.

- **Naftaleno**

La degradación del naftaleno por bacterias del género *Pseudomonas* es probablemente la ruta más estudiada de biodegradación de HAPs. Esta degradación consiste en la oxidación del naftaleno mediante la incorporación a la molécula de HAP de los 2 átomos del oxígeno molecular para dar un intermediario (+)-*cis*-(1R,2S)-dihidroxi-1,2-dihidronaftaleno. Esta ruta utiliza sistemas de enzimas multicomponentes de dioxigenasas NAP dox<sub>G7</sub> (flavoproteína o reductasa<sub>NAP</sub> a reducir, una 2-hierros, 2 sulfuros ferredoxina NAP a oxidar y oxigenasa terminal ISP<sub>NAP</sub> a reducir)<sup>46</sup>. La masa molecular del terminal dioxigenasa ISP<sub>NAP</sub> se compone de 2 subunidades de 55 y 20 kD determinadas por medio de electroforesis SDS-PAGE para las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente<sup>47</sup>.

El segundo paso en la degradación es la conversión de *cis*-(1R,2S)-dihidroxi-1,2-dihidronaftaleno a 1,2-dihidroxi-naftaleno catalizada por naftaleno (+)-*cis*-dihidrodiol deshidrogenasa, con una masa molecular de 102 kD y que requiere NAD<sup>+</sup> como aceptor de electrones. El próximo paso es el rompimiento enzimático de 1,2-dihidroxi-naftaleno a *cis*-2-hidroxibenzalpiruvato, el cual es convertido vía series de dioxigenasas a salicilato y piruvato.

Posteriormente, el salicilato es oxidado a catecol por salicilato hidroxilasa, que puede sobrellevar fisión *orto* o *meta* dependiendo del metabolismo bacteriano. No obstante, algunas bacterias del género *Pseudomonas testosteroni* convierten el salicilato a ácido gentísico (Ver figura no.4)



**Figura 4.** Ruta de degradación del naftaleno por algunas bacterias del género *Pseudomonas*.

- **Antraceno**

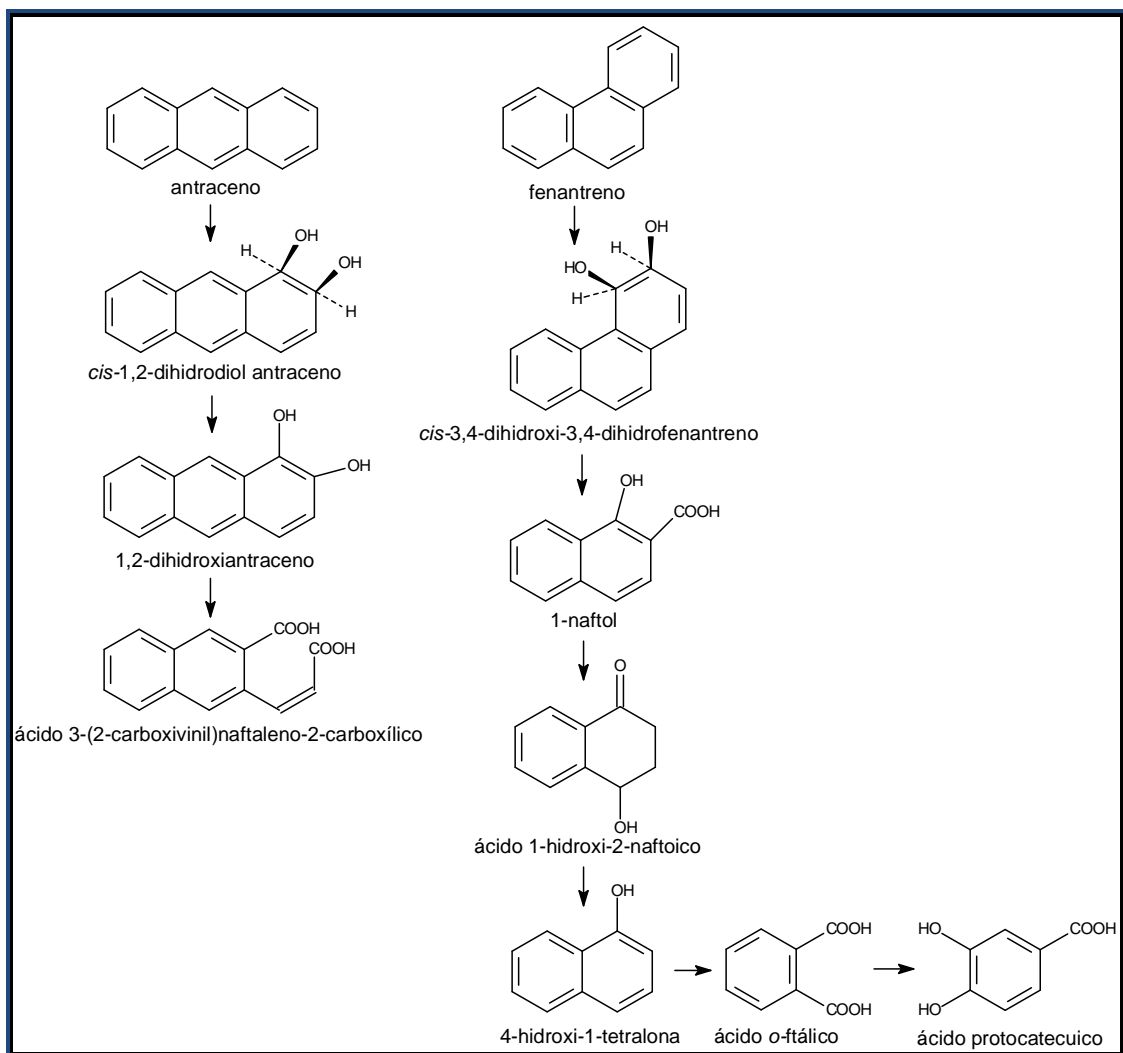
Los hidrocarburos aromáticos tricíclicos pueden también ser mineralizados por bacterias del género *Pseudomonas* aisladas de agua dulce y ambientes marinos. En este caso, el antraceno se convierte inicialmente en el intermediario oxigenado el *cis*-(1R,2S)-dihidroxi-1,2-dihidroantraceno, para luego ser biotransformado en 1,2-dihidroxi-antraceno por la vía NAD<sup>+</sup>-dependiente dihidrodiol deshidrogenasa. Luego, este producto es oxidado por fisión del anillo aromático a ácido *cis*-4-(2-hidroxinaft-3-il)-2-oxobut-enoico con la subsecuente conversión a ácido 2-hidroxinaftoico. Los productos de la fisión del anillo son metabolizados hacia salicilato y catecol a través de 2,3-dihidroxinaftaleno. De esta forma, se degrada a simples compuestos alifáticos por una vía similar a la conversión del catecol generada en el naftaleno (Ver figura no. 5)<sup>48</sup>.

- **Fenantreno**

Las bacterias del género *Pseudomonas* oxidan inicialmente el fenantreno en las posiciones 1,2 y 3,4 para formar el *cis*-1,2-dihidroxi-1,2-dihidrofenantreno o *cis*-3,4-dihidroxi-3,4-dihidrofenantreno. Sin embargo, el isómero 3,4 es el predominante y posteriormente es convertido a 3,4-dihidroxifenantreno.

Asimismo, los productos del rompimiento del anillo son metabolizados a ácido 1-hidroxi-2-naftoico, el cual es posteriormente descarboxilado a 1,2-dihidroxinaftaleno, el cual es sometido a rompimiento *meta* para formar ácido salicílico, el cual puede a su vez ser degradado vía formación de catecol o ácido gentísico. Sin embargo, ambas vías implican fisión del anillo para formar intermediarios del ciclo de Krebs.

Existen a su vez otros tipos de metabolitos encontrados en el género *Pseudomonas* a partir de fenantreno, entre ellos el 1-naftol junto con el ácido 1-hidroxi-2-naftoico y el ácido salicílico e igualmente la formación de ácido *o*-ftálico, las cuales han sido reportadas últimamente en la literatura (figura no. 5).

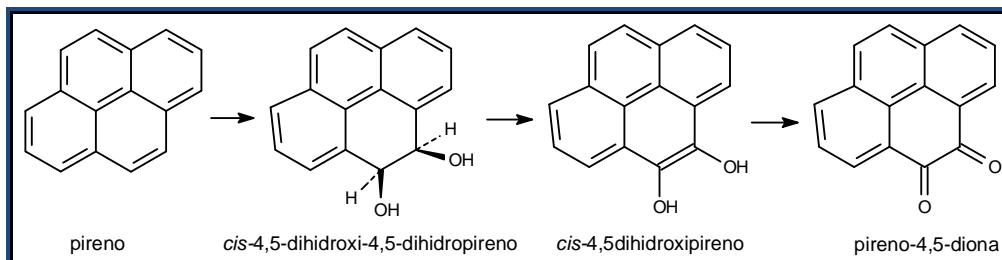


**Figura 5.** Ruta de degradación propuesta para el antraceno (izq) y para el fenantreno (der) por algunas bacterias del género *Pseudomonas*.

- **Pireno**

La biodegradación del pireno, un HAP pericondensado, ha sido investigada principalmente para la cepa *Ps. saccharophila* P15, la cual transformó *cis*-4,5-dihidroxipireno a pireno-4,5-diona. Esta biotransformación se debería probablemente a la oxidación de *cis*-4,5-dihidroxi-4,5-dihidroxipireno a 4,5-dihidroxipireno, posterior autooxidación de este metabolito (ver figura No.6), tal como ya se ha visto con los otros HAPs, para finalmente producir los metabolitos que forman parte del ciclo de Krebs, con intermediarios detectados en *Ps. stutzeri* que luego siguen una de las rutas metabólicas del fenantreno, como: fenantreno-

4,5-dicarboxilato, fenantreno 4-carboxilato, *cis*-3,4-fenantreno-dihidrodiol-4-carboxilato y 3,4-dihidroxi-fenantreno.<sup>46</sup>



**Figura 6.** Ruta de degradación detectada para el pireno por *Pseudomonas saccharophila*.

### 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Los pasos seguidos en la evaluación de la bioestimulación se basaron en vertimientos simulados de distintos HAPs sobre agua (naftaleno, antraceno, fenantreno y pireno), de modo que pudiera estudiarse el efecto del hierro sobre el proceso de biodegradación. Para ello se trabajó con dos aislados nativos de cepas *Pseudomonas*.

#### 3.1 CEPAS BACTERIANAS *Pseudomonas spp* ESTUDIADAS

##### 3.1.1 Tratamiento para las muestras de suelo contaminado

La obtención de los microorganismos nativos se realizó a través de 2 muestras de suelo del Departamento de Santander, una con microorganismos adaptados a la presencia de HAPs procedente de suelo del Complejo Industrial en Barrancabermeja del ICP (Instituto Colombiano de Petróleo) y otra muestra con microorganismos no adaptados a la presencia de HAPs procedente de suelo boscoso de La Mesa de los Santos.

- El procesamiento de la muestra consistió en la dilución de 10,0 g. en 9,00 mL de solución salina (0,89% de NaCl) esterilizada en autoclave (15 psi y 120 °C por 15 min) y posterior preparación de diluciones asépticamente de 1,00 mL de ésta muestra en tubos de ensayo con 9,00 mL de solución salina estéril y así se logró el aislamiento del consorcio de microorganismos (figura 7).

### 3.1.2 Aislamiento de la familia *Pseudomonaceae*

Conociendo la gran eficiencia y versatilidad de las *Pseudomonas spp* para degradar compuestos persistentes en el ambiente, su aislamiento del resto de microflora presente en el suelo contaminado se llevó a cabo usando medio sólido Cetrimida, el cual es selectivo para la familia *Pseudomonacea* (la cual en su gran mayoría toleran la presencia de la cetrimida), el cual consta de:

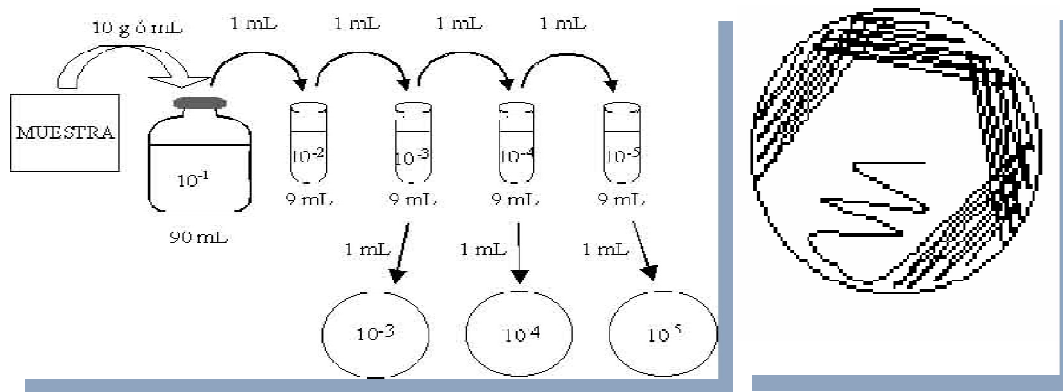
Peptona de gelatina	20,0 g
MgCl <sub>2</sub>	1,40 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10,0 g
Agar-agar	13,6 g
Bromuro de N-cetil-N,N,N-trimetilamonio (cetrimida)	0,300 g
pH 7,2±0,2 a 25°C	

La preparación de dicho medio consiste en la adición a un erlenmeyer de 45,3 g del agar cetrimida y 10 mL de glicerina por litro de medio disuelto en agua destilada. Luego se procedió a esterilizar en autoclave (121°C durante 15 minutos), y por último se depositada asépticamente en cajas Petri estériles, de modo que tras el enfriamiento se obtiene el medio sólido en cuestión y se almacena entre 4,0 y 10°C para su utilización posterior. Luego de homogenizar cada una de las diluciones realizadas a la muestra, se procedió a incubar en el medio sólido preparado a 35°C por 24 horas.

La técnica usada para obtener cultivos puros o axénicos, se denomina siembra de dilución por estría en placa de agar y consistió en:

- Para cada dilución de las 2 muestras de suelo se tomó un inóculo de 1 mL con ayuda de un asa de anillo metálica esterilizada con un mechero de Bunsen y enfriada al aire, pero de tal forma que cada vez que se destapara el tubo de ensayo con la dilución fuera flameada la boca del tubo
- Fueron realizadas estrías sobre la placa de agar cetrimida, para así diluir el inóculo y lograr el aislamiento de los microorganismos presentes.

La técnica de siembra consistió en estrías a 90° una de la otra y a lo ancho de la placa, esterilizando y enfriando el asa entre cada una<sup>49</sup>.



**Figura 7.** Esquema completo de la técnica: *siembra de dilución* (izq) *por estría en placa de agar* (der) aplicado a las muestras de suelo.

- Se incubaron las siembras a 37°C por 24 horas y finalmente se observó las diluciones donde hubo una mejor separación de colonias, las cuales se usarían posteriormente como inóculos para cultivos puros. Sin embargo, se realizó previamente un frotis de microorganismos teñidos con la técnica de Gram descrita más adelante, con el objeto de confirmar la pureza del cultivo y la morfología al microscopio de bacilo Gram negativo.

### 3.1.3 Clasificación e Identificación de las cepas aisladas

Ya habiendo obtenido el aislamiento de 2 colonias diferentes (descendientes cada una de una sola especie) se procedió a definir la taxonomía microbiana, para lo cual

fue imprescindible llevar a cabo la identificación de las cepas bacterianas aisladas en base a la combinación de varios métodos, para luego comparar las características de las cepas aisladas con las características de las especies conocidas.

Esta descripción se encuentra en el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology<sup>50</sup>.

Las propiedades que usa este manual para clasificar las bacterias son las morfológicas, el tipo de pared y el tipo de metabolismo. Puede ocurrir que esta sea una nueva bacteria, en ese caso comparando con las ya descritas sólo se puede decir que se parece mucho a una especie ya descrita pero que no pertenece a la misma usando claves dicotómicas a manera de diagrama de flujo.

#### ✦ **Clasificación e Identificación basada en criterios morfológicos:**

Las colonias de cada especie bacteriana son diferentes, así que las cepas nativas aisladas fueron caracterizadas macroscópicas según lo siguiente:

- **Forma de la colonia:** puntiforme, circular, irregular, alargada, fusiforme, filamentosa, rizoide, etc.
- **Elevación de la colonia:** aplanada, elevada, pulvinada, convexa, umbonada, umblicada, etc.
- **Color y olor de la colonia.**
- **Consistencia:** mucoide (acuosa o encapsulada característico de organismos antigénicos), lisa o uniforme (característica de cepas salvajes recién aisladas), rugosas o granuladas (posibles cepas mutantes), con anillos concéntricos, etc.
- **Borde de la colonia:** continuo, ondulado, lobulado, erosionado, festoneado, filamentoso, etc.
- **Opacidad:** transparente, opaca, etc<sup>42</sup>.

#### ✦ **Clasificación e Identificación basada en criterios de tinción con Gram:**

Para el examen con microscopio óptico de preparados o frotis se usó la tinción con Gram, debido a que es una técnica rápida y sencilla, la cual clasifica las bacterias según la morfología microscópica observada. De forma simultánea, se determinó la importante clasificación relacionada exclusivamente con la pared celular, que divide las bacterias en dos grandes grupos, las Gram positivas y las Gram negativas.

La morfología microscópica clasifica las bacterias según su forma esférica (cocos), cilíndrica (bacilos), de coma (vibrios) o helicoidal (espirilos o espiroquetas si presentan muchas espirales).

Los bacilos como las *Pseudomonas* solo suelen presentarse aislados, en pares, en cadena, en forma de fibras y algunos con los extremos más delgados (fusiformes) según la cepa<sup>42</sup>.

La técnica de tinción consiste en:

Primero se preparó el frotis:

- Con ayuda del asa en anillo se tomó una colonia de la cepa a observar, la cual fue diluida con una gota de solución salina estéril al 0,89% de NaCl y se extendió en un portaobjetos, aunque cuando la muestra era de un medio con de caldo de cultivo este último paso se omitía.
- A continuación, se fijó la muestra por calentamiento con un mechero de Bunsen y enseguida se dejó enfriar y secar junto al mechero o en un horno.

La tinción de Gram del frotis preparado consistió en:

- Se añadió al frotis frío unas gotas de colorante violeta de genciana (tiñe a todos los microorganismos), de modo que cubriera bien la muestra fijada y se dejó actuar por 1 minuto exactamente. Inmediatamente se lavó con ayuda de un frasco lavador lleno de agua.

- A continuación, se añadió unas gotas de Lugol (yodo y KI en solución), el cual actuó como mordiente precipitando el violeta de genciana, igualmente se dejó por 1 minuto y se lavó.
- Luego se decolora por unos 5 segundos con una mezcla de alcohol 95° y acetona. Esta mezcla decolora a las bacterias Gram negativas debido a su diferente estructura de la pared celular (tamaño de los poros).
- Por último, se agregó unas gotas de safranina, se dejó actuar por 30 minutos y lavó enseguida. Este es el colorante diferenciador que tiñe solo las bacterias Gram negativas.
- La observación del frotis teñido se realizó con un microscopio óptico marca Zeiss con 4 lentes CP-Achromat; para esto se trabajó primero el objetivo 10x para localizar la muestra y posteriormente se graduó el objetivo de inmersión 100x, haciendo antes agregado una gota de aceite de inmersión en el lugar a observar ya localizado.

Las bacterias entonces fueron descartadas (cocos violetas o rosados) o aceptadas (bacilos rosados o gram negativos) al ver su forma y coloración.

#### ✦ **Clasificación e identificación basada en criterios metabólicos<sup>49</sup>:**

Para finalizar la recopilación de características a comparar con las expuestas en el Manual de Bergey, por medio de pruebas bioquímicas se determinó para cada cepa aislada si puede fermentar azúcares, la presencia de ciertas enzimas, la degradación de compuestos, producción de compuestos coloreados, etc.

#### **Prueba para la catalasa:**

En principio se comprobó la presencia de la enzima catalasa presente sólo en los microorganismos aerobios y anaerobios facultativos que contienen citocromo, como en el caso de las *Pseudomonas*, la cual se realizó por el método del portaobjetos:

- Con el asa de siembra se recogió una colonia de 24 horas y se colocó en un portaobjetos limpio, luego con un gotero o pipeta Pasteur se agregó una gota de  $H_2O_2$  al 30% sobre la colonia sin mezclarla.

**Interpretación:** La presencia de la enzima catalasa se evidencia al observar burbujas.

### **Prueba para la reducción de nitratos:**

El medio de cultivo en agua destilada para la nitrato reductasa fue:

- Agar cetrimida 8,0 g/L para suministrar los nutrientes básicos. A éste se agregó 1,0 g/L de  $KNO_3$ . Posteriormente, fue envasado en tubos de ensayo (uno para el caldo y otro para el blanco) con tapa, para generar la anaerobiosis luego de calentar 15 minutos en baño María (eliminación de  $O_2$ ). Luego, se ajustó el pH en  $7,0 \pm 0,2$  a temperatura ambiente y por último fueron esterilizados.

Luego se marcar cada tubo por cepa y el blanco, se inoculó asépticamente por punción con colonias de 24 horas (excepto el tubo del blanco), incubando cada tubo a  $37^\circ C$  por 24 horas y determinándose si había presencia de los siguientes productos, así:

**$NH_3$ :** se agregó 1 mL de reactivo de Nessler (iodomercuriato de potasio) a una porción del cultivo. La prueba es positiva si se observa un precipitado color ladrillo.

**$NO_2^-$ :** se agregó 2 gotas de ácido sulfanílico al 0,8% p/v en ácido acético concentrado y luego 2 gotas de alfa-naftilamina al 0,5% p/v en el mismo ácido.

**Interpretación:** Para la presencia de amoníaco la prueba es positiva si se observa un precipitado ladrillo (rojo o café),. Si no se observa puede ser que el nitrato no se redujo o que se redujo todo a  $N_2$ .

La prueba del nitrito es positiva si se observa una coloración rojiza en la superficie. En caso de no observarse, se agrega una pizca de zinc en polvo, si no hay

cambios la prueba es positiva para nitrato reductasa al no haber nitrato presente, pero si hay color rojo esta vez, la prueba es negativa al ser reducido el nitrato a nitrito por el zinc.

### **Prueba para fermentación de glucosa con rojo de fenol:**

Debido a que el rojo de fenol tiene un rango de viraje de 6,8 indicando acidez de color amarillo-naranja y basicidad de color rojo intenso, la prueba de oxidación-fermentación de glucosa consistió de:

El medio de cultivo en agua destilada para fermentación de glucosa consistió en:

- Peptona de gelatina: 2,0 g/L, NaCl: 5,0 g/L,  $K_2HPO_4$ : 0,3 g/L y 0,018 g/L de indicador rojo de fenol a 3 tubos de ensayo con tapa para cada cepa, de modo que un tubo se tapó completamente (anaerobiosis), otro fue sellado con una gasa o algodón para que pueda entrar aire, pero evitando que se contamine (aerobiosis) y por último dos tubos fueron dejados como referencia (con tapa y cubierto con gasa).

El pH fue ajustado en  $7,4 \pm 0,2$  a temperatura ambiente y luego fueron esterilizados los tubos.

Finalmente en frío se agregó 5 g/L de d-glucosa al medio de cultivo y se marcó cada tubo según su característica y la cepa a inocular.

A excepción de los tubos de referencia, los tubos enfriados se inocularon asépticamente con colonias de 24 horas, el tubo para aerobiosis se inoculó con un asa recta sobre la superficie del agar, pero el tubo para anaerobiosis fue purgado 15 minutos en baño María para eliminar el  $O_2$ , luego de enfriar, se destapó e inoculó junto al mechero por punción al fondo del medio, y se dejaron incubando a  $37^\circ C$  por 2 a 3 días junto a los tubos de referencia.

### ***Interpretación:***

**Metabolismo oxidativo:** solo es positivo para el tubo cubierto con gasa por presencia de acidez, indicada por el viraje del rojo de fenol a naranja claro y el tubo con tapa debe seguir de color rojo-naranja en medio neutro.

**Metabolismo fermentativo:** solo es positivo para el tubo cerrado con tapa con presencia de acidez, indicada por el viraje del rojo de fenol a naranja claro y el tubo cubierto con gasa puede presentarse de color rojo-naranja por pH neutro o de color naranja claro por acidez.

**Tubo de referencia:** tanto el tubo cubierto con gasa como el tubo tapado deben permanecer con el color original rojo-naranja del pH neutro.

### **Prueba para la lecitinasa:**

El medio sólido para la prueba de la lecitinasa consistió en:

- La receta ya mencionada para el agar selectivo cetrimida para una caja de Petri que contiene los nutrientes básicos y además se añadió  $K_2HPO_4$ : 1,3 g/L y NaCl: 0,5 g/L en agua destilada.

Luego de esterilizar y a 60°C se añadió a la caja de Petri de forma aséptica: 0,5 g/L de d-glucosa y 0,6 g/10 mL de yema de huevo (la cáscara del huevo fue lavada primero con etanol industrial); se homogenizó la mezcla y se ajustó el pH en  $7,3 \pm 0,2$  en esta temperatura para evitar contaminación del material esterilizado.

Con un marcador indeleble, se marcaron los 2 sectores para cada cepa en la base de la caja Petri y luego de inocular con un asa recta en forma de una estría, con colonias de cada cepa de 24 horas, para luego se incubaron a 37°C por 24 horas.

### ***Interpretación:***

La presencia de un halo opaco alrededor del lugar donde creció la bacteria, es prueba positiva para la acción de la enzima lecitinasa sobre la yema del huevo, esto debido a la fosfatidil colina o lecitina, un fosfoglicérido presente en la yema.

### **Prueba para la hidrólisis del almidón:**

El medio sólido para esta prueba consistió en:

- El procedimiento ya mencionado usando el agar selectivo cetrimida para 2 cajas Petri (una para inocular y otra de referencia), pero además se añadió 10 g/L de almidón soluble. Luego se ajustó el pH en  $7,5\pm 0,2$  a temperatura ambiente y se esterilizó.

Por último, se marcó 2 sectores, uno para cada cepa en la base de la caja Petri, se inoculó en forma de una estría con colonias de cada cepa de 24 horas con ayuda del asa en anillo y se incubó por 24 horas a 37°C.

Pasada la incubación, se cubrió con cuidado (por separado cada sector) la superficie de las cajas Petri con la solución de yodo (Lugol al 5%) usada en tinción con Gram, de modo que el almidón se tiñera de azul.

#### ***Interpretación:***

Si se observan zonas claras o transparentes alrededor de las colonias bacterianas, es prueba positiva para la hidrólisis del almidón.

#### **Prueba de producción de pigmentos para *Pseudomonas spp*:**

La capacidad para producir pigmentos como pioverdina (fluoresceína) y piocianina es una característica importante para la identificación de especies de *Pseudomonas*. Algunas de ellas elaboran sólo fluoresceína (como *Ps. fluorescens*) y otras ambos pigmentos (como *Ps. aeruginosa*). La piocianina solamente es producida por *Ps. aeruginosa* aunque no todas las cepas de esta especie la producen. Se han diseñado medios de cultivo que potencian la elaboración de uno de los pigmentos e inhiben la formación del otro, los cuales son:

Para la diferenciación de especies en base a la producción de piocianina y piorrubina:

- **Medio King A o *Pseudomonas* agar P:**

Se preparó el mismo agar selectivo cetrimida, el cual estimula la producción de piocianina y piorrubina gracias a la glicerina y las sales de magnesio y potasio e inhiben a su vez la producción de fluoresceína.

Usando la receta ya mencionada en cajas Petri marcadas, se inoculó por estría cada medio con cada cepa con colonias de 24 horas y usando el asa de anillo. Pasado el período de incubación (24 horas a 37°C) se observaron las colonias. Luego se dejaron incubar a temperatura ambiente para observar si había cambios.

***Interpretación:***

El resultado es positivo para piocianina si se observa un pigmento azul o azul-verdoso alrededor de las colonias o extendido en el medio por difusión.

El resultado es positivo para piorrubina si se observa un pigmento rojo alrededor de las colonias o extendido en el medio por difusión.

Resultado positivo para cepa de *Ps. aeruginosa*.

Para la diferenciación de especies en base a la producción de fluoresceína:

- **Medio King B o *Pseudomonas* agar F:**

Se preparó para cajas Petri con tripteína: 10 g/L, peptona de gelatina: 10 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1,5 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O: 1,5 g/L, agar-agar: 15,0 g/L y glicerina: 10 mL/L. El pH fue ajustado en 7,2±0,2 a temperatura ambiente y luego fue esterilizado.

Al enfriar se inoculó por estría con cada cepa aislada por separado usando un asa de anillo y se dejó incubar por 24 horas a 37°C. Posteriormente, se dejó a temperatura ambiente por otras 24 horas.

***Interpretación:***

El resultado es positivo para fluoresceína si se observa un pigmento amarillo-verdoso alrededor de las colonias o extendido en el medio por difusión.

### **Prueba de crecimiento a 41°C:**

- Fue preparado, esterilizado y enfriado el medio de agar selectivo cetrimida para 2 cajas Petri, luego la base de la placa fue marcada en 2 sectores para cada cepa, se inoculó por separado las colonias de 24 horas y se incubó por 24 horas a 41°C.

### ***Interpretación:***

Se observa si alguna cepa creció a 41°C pasado el período de incubación.

### **3.1.4 Recuento de biomasa para cada cepa<sup>51</sup>:**

Para las medidas cuantitativas de la biomasa bacteriana durante las cinéticas de crecimiento se eligió un método de recuento rápido y sencillo, la turbidimetría o densidad óptica, el cual con ayuda de un espectrofotómetro mide la absorbancia a 600 nm (para volumen mínimo de 3,0 mL de caldo de cultivo) de la suspensión de material orgánico en comparación con el blanco (medio salino estéril sin inocular), de modo que a mayor número de células en suspensión, menor porcentaje de luz atraviesa la muestra y mayor será la absorbancia o luz reflejada.

Sin embargo, al ser este un método indirecto, se realizó una curva de calibración para los cultivos puros de cada cepa aislada usando como referencia un método directo para cuantificación de biomasa bacteriana.

Para esto se eligió el método de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), con el cual se obtienen buenas correlaciones de la cantidad de biomasa presente como células microbianas viables (colonias) y así pudo disminuirse en gran parte la incertidumbre generada con el método de turbidimetría, el cual no distingue entre biomasa viable y biomasa no viable para el crecimiento o muerte.

Este método fue llevado a cabo con el siguiente procedimiento:

- Primero se realizaron varias diluciones 1:10 hasta  $1:1 \times 10^6$  tubos Eppendorf estériles a partir de una muestra de caldo puro para cada cepa, así: 1,0 mL/100  $\mu$ L de caldo en 9,0 mL/900  $\mu$ L de agua estéril al 0,89% de NaCl, para la medida de absorbancia (espectrofotómetro de Spectronic

Instruments 20 Genesys™) y para la medida de UFCs, respectivamente. Progresivamente, se realizaba lo mismo a partir de la dilución preparada (diluciones 1:10, 1:100, 1:1000, etc), luego de homogenizar muy bien con ayuda de un vórtex.

Para tubos Eppendorf se desechaban las puntas de la micropipeta en cada dilución.

Según la carga esperada se eligió las diluciones a sembrar, se marcó la base de la caja Petri para distinguir las diluciones y las cepas (5 diluciones por placa), y posteriormente fueron sembradas en el agar cetrimida 20 µL por triplicado de cada dilución, cambiando las puntas de la micropipeta para cada dilución, agitando bien con el vórtex y dejando secar las gotas junto al mechero o en un horno BINDER.

Por último, se incubaron por 24 horas las placas Petri de forma invertida a 37°C, teniendo cuidado de que no se mezclaran las diluciones durante el transporte hacia el horno.

***Interpretación:***

Pasado el período de incubación se observó con buena luz el número de colonias por réplica y dilución, diferenciándolas de cualquier partícula de muestra que se pueda confundir por el reducido tamaño de las colonias estudiadas. A continuación, se contaron como colonias individuales todas aquellas que disten de las colonias próximas una distancia al menos igual al diámetro de la colonia más pequeña.

El informe del recuento en placa para cada dilución, con su correspondiente valor de absorbancia a 600 nm, se calculó así:

### Recuento de la cepa aislada en UFC/mL:

(Promedio de colonias contadas según réplicas) x (factor de dilución) x (50  $\mu$ L)

Por ejemplo, para un promedio de 50 colonias en la dilución 1:100 y tomando 20  $\mu$ L de cada dilución para la siembra en el agar, el valor UFC/mL sería de:

$$(50)(100)(50\mu\text{L}) = 250.000 \text{ UFC/mL.}$$

Finalmente, se tabularon los datos para realizar la curva de calibración, los cuales corresponden a la absorbancia a 600 nm y el valor de UFCs de las diluciones realizadas para los caldos por separado de cada cepa estudiada.

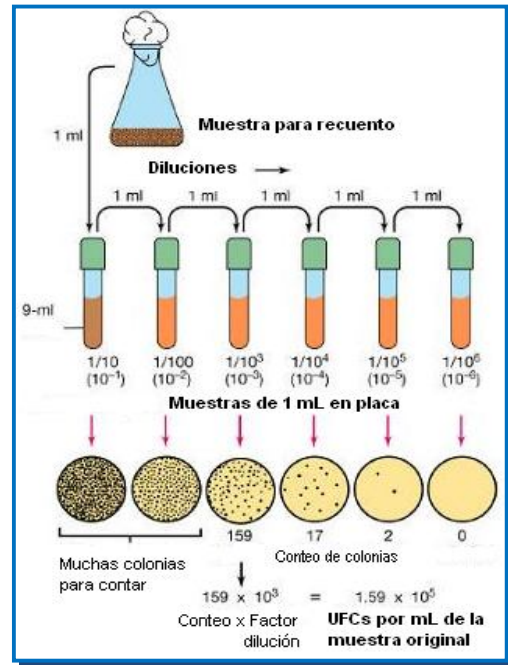


Figura 8. Procedimiento realizado para el recuento UFC

### 3.2 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE LOS HAPs EN DIFERENTES MEDIOS SALINOS

La primera parte consistió en determinar los medios salinos en los cuales cada cepa aislada de *Pseudomonas spp* degrada más rápidamente de acuerdo a los HAPs elegidos, esto desde el punto de vista de la biodegradación estimulada con hierro.

Los medios salinos tratados fueron 3 medios diferentes en composición respecto al hierro:

**Tabla 2.** Composición del medio salino mínimo para *Pseudomonas spp*

Reactivo	Cantidad
NaCl	0.30 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.50 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.65 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.25 g/L
MgSO <sub>4</sub>	0.24 g/L
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.040 g/L
HAP en solución	60 ppm

La diferencia entre los medios fue la siguiente:

**Medio salino #1:** sin hierro

**Medio salino #2:** con hierro divalente como FeSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.1 Mm.

**Medio salino #3:** con hierro trivalente como Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O 0.1 mM.

El pH de los medios debía oscilar entre 7.00±0.2, el cual fue ajustado usando HCl y/o NH<sub>4</sub>OH diluidos. El HAP fue añadido disuelto en un solvente adecuado (DMF o etanol) para alcanzar una concentración en el medio salino de 60 ppm. Para cada cepa aislada se llevaron a cabo cinéticas en los 3 diferentes medios salinos estériles y para los siguientes sustratos aromáticos:

Benceno, Tolueno, Naftaleno, Antraceno, Fenantreno y Pireno.

Las cinéticas se llevaron a cabo en los 3 medios salinos simultáneamente para cada sustrato, de modo que las diferencias por temperatura ambiente, pre-inóculo, agitación y condiciones en la toma de mediciones fueran mínimas.

Para el comienzo de la cinética, se toma en este caso un pre-inóculo líquido de un volumen determinado (generalmente correspondiente al 10% del volumen total de cultivo), y se agrega al erlenmeyer con el medio en un agitador rotatorio. De eta

forma, se garantiza que el número de bacterias al inicio de la cinética sea igual para todos los medios a comparar, ya que usando colonias desde agar sólido no hay garantía de esto.

El intervalo de tiempo entre mediciones de crecimiento de biomasa fue de 2 horas aproximadamente tras la extracción del sustrato, el cual al estar presente en la alícuota causa interferencias en las medidas de absorbancia, debido a que es poco soluble en el medio salino, lo cual incrementa la dispersión de la muestra.

La extracción de muestra de HAP se llevó a cabo con 5,0 mL de n-hexano para igual volumen de muestra, la cual consistió de agitación vigorosa, decantación por un tiempo para formación de las dos capas: olefínica con HAP-acuosa con biomasa y retiro de la capa superior que contenía el HAP.

La parte acuosa se conservó para las medidas de absorbancia a 600 nm (3,0 mL) y la parte olefínica (3,0 mL) para las medidas de la concentración de cada HAP.

La determinación del crecimiento bacteriano fue llevada a cabo por medidas espectrofotométricas a 600 nm usando 3,0 mL para cada caldo e igualmente 3,0 mL de cada medio salino como blanco (#1, #2 y #3), lo cual indica el crecimiento bacteriano al aumentar la dispersión de la luz en el medio salino en cultivo.

Por otro lado, se debió ajustar el pH máximo a las 4 horas, de manera de garantizar la supervivencia y crecimiento de las bacterias.

### **3.2.1 Comparación de velocidades de degradación estimulada de los HAPs para diferentes concentraciones de hierro en el medio salino:**

Luego de conocer el efecto del hierro sobre el crecimiento de las cepas aisladas para los diferentes HAPs a 60 ppm, el siguiente paso fue buscar la concentración de hierro (forma divalente o trivalente), dependiendo de los resultados, la cual estimularía más el metabolismo de los HAPs bajo las condiciones usadas.

Este estudio fue llevado a cabo utilizando medios de cultivo a partir de un pre-inóculo para un tiempo determinado, en este caso 24 horas a temperatura ambiente y en agitación, llevando a cabo el ajuste de pHs cada 2 a 4 horas, de modo que no se afectara el crecimiento bacteriano.

Las concentraciones trabajadas adecuadas para el crecimiento microbiano fueron: 0.050 mM, 0.10 mM, 0.15 mM y 2.0 mM según fuera hierro divalente o trivalente, de acuerdo con los resultados compilados de la primera parte para cada sustrato.

Se realizaron medidas del crecimiento bacteriano para cada concentración de hierro por medio de medidas espectrofotométricas a 600 nm, usando como blanco el medio salino respectivo y tras la extracción del sustrato de la alícuota con n-hexano.

Además del crecimiento bacteriano, la determinación de la concentración de los HAPs permite conocer las mejores condiciones para la biodegradación según la concentración del hierro apta para el metabolismo de los HAPs.

Esto fue realizado usando un espectrofotómetro de absorción en la región ultravioleta-visible y usando una longitud de onda determinada según el HAP a medir disuelto en el n-hexano de extracción, usando igualmente como blanco hexano, pero luego de realizar un barrido del HAP en hexano para determinar una longitud de onda adecuada con la cual llevar a cabo la curva de calibración absorbancia vs concentración de HAP.

Se prepararon soluciones de cada HAP en hexano para concentraciones conocidas entre el rango 5-60 ppm, a las cuales se les midió la absorbancia a la longitud de onda establecida usando como blanco el hexano. Se obtuvo la curva de calibración de cada sustrato.

### **3.3 EFECTO DE MEZCLAS DE HAPs EN LA BIODEGRADACIÓN ESTIMULADA PARA UN CONSORCIO BACTERIANO**

El siguiente paso en el estudio de la biodegradación estimulada usando *Pseudomonas*, fue determinar el efecto de mezclar 2 o los 4 HAPs sobre la degradación de los mismos, utilizando cada cepa aislada. A su vez se deseaba estudiar el efecto bioestimulador de hierro sobre la velocidad de biodegradación bacteriana en las mezclas de HAPs.

El procesamiento de la muestra para determinar el crecimiento bacteriano fue el mismo previamente ya mencionado. Sin embargo, para conocer la cantidad de la mezcla de HAPs que ha sido metabolizada en 24 horas no es adecuado el espectrofotómetro, ya que generalmente puede existir solapamiento de picos de absorción y no podrá distinguirse los picos de baja absorción a la longitud de onda ya determinada para cada HAP.

Sin embargo al realizar el barrido por el espectro ultravioleta (200 nm a 350 nm) ciertas mezclas de 2 HAPs no presentaron solapamiento de picos de absorción en las longitudes de onda escogidas anteriormente, de modo que pudieron determinarse sus concentraciones usando el espectrofotómetro y para el resto de mezclas fue necesario usar un detector UV a 254 nm acoplado a un equipo de HPLC Agilent 1100 Series que constó de lo siguiente:

Bombas, desgasificador, inyector automático de muestras, columna cromatográfica C<sub>18</sub> de 30 mm de largo por 4.6 mm de ancho y detector UV.

El sistema de bombas operaba isocráticamente y produciendo un gradiente lineal de 50/50 agua:acetonitrilo hacia 100% acetonitrilo en 10 minutos.

El detector UV operado a 254 nm y la columna operaba en fase reversa.

El procedimiento usado para las muestras de HAPs fue:

- 1 mL/min para flujo lineal de agua:acetonitrilo y un volumen de inyección de 20 µL para las muestras guardadas en viales con tapas, a las cuales se les realizó el mismo procedimiento de extracción con hexano y posterior concentración por evaporación para luego diluir en acetonitrilo. El tiempo para inyección entre una muestra y otra fue de 2,0 minutos.

El sistema de adquisición del equipo colectó los datos (área de los picos y tiempos de retención) en medio magnético, habiendo primero realizado la calibración con soluciones hechas de mezclas de los HAPs de concentración conocida entre 5-100 ppm en acetonitrilo; fue incluido un medio salino sin inocular con los HAPs estudiados a 60 ppm cada uno, excepto el fenantreno a 100 ppm, el cual hizo de blanco para conocer las pérdidas abióticas de los HAPs luego de 24 horas de agitación.

El orden de elución ascendente según la literatura es:

Naftaleno, Fenantreno, Antraceno y Pireno<sup>52</sup>.

### **3.3.1 Efecto de la presencia de Tritón X-100 en la degradación de una mezcla de HAPs usando un consorcio bacteriano<sup>53</sup>:**

Se estudió el efecto de usar surfactantes para estimular la biodegradación de los HAPs. Para ello, se trabajó con el surfactante no iónico tritón X-100 (polioxietileno-octilfenil éter) agregado al medio salino, de modo que con ello se aumentara la biodisponibilidad de los HAPs.

Sin embargo, debió tenerse en cuenta no pasar la concentración mínima micelar (CMC), pues los PAHs serían retenidos dentro de las micelas reduciendo la biodisponibilidad y/o porque la concentración, tanto del PAH como del surfactante, aumenta pudiendo resultar tóxica para las bacterias.

- De este modo la concentración de tritón X-100 agregada a los medios salinos estériles con una mezcla de HAPs (60 ppm para cada uno de los 4 HAPs) fue de 0,1% v/v, enseguida se inoculó en un erlemeyer con un porcentaje de caldo ya preparado o pre-inóculo y se cultivó a temperatura ambiente en un agitador rotatorio por 96 horas.
- Para la comparación se realizó el mismo procedimiento en un erlenmeyer, omitiendo el paso en el que se agrega 0,1% de Tritón X-100.
- Pasadas las 96 horas fueron analizados los caldos de cultivo (con Tritón X-100 y en ausencia de Tritón X-100), usando el procedimiento mencionado de extracción, concentración por evaporación, dilución con acetonitrilo y tratamiento de separación y detección por HPLC-UV.

### **3.4 ANÁLISIS SEMICUANTITATIVO DE PROTEÍNAS EXPRESADAS EN LA BIOESTIMULACIÓN PARA LA BIODEGRADACIÓN DEL FENANTRENO Y PARA EL PIRENO<sup>54,55</sup>**

Fueron ensayadas 2 técnicas para la extracción de proteínas, ya que para el caso de las bacterias la cantidad de proteínas obtenida en los caldos de cultivo es muy

baja debido a su microcosmos y por ello debe extraerse una buena cantidad para que sean detectadas según la sensibilidad del método de tinción.

La primera técnica fue la extracción por hidrólisis básica, así:

- 30 mL del caldo de cultivo obtenido fue centrifugado en un tubo Falcón 50 cónico por 20 minutos a 1200 gravedades (IEC CL31R Multispeed Centrifuge) para concentrar la biomasa. Enseguida se hicieron 2 lavados con agua estéril para eliminar las sales que causan interferencia.
- Una vez concentrada la biomasa y descartado el sobrenadante, se trasvasó el contenido a un tubo Eppendorf con una micropipeta y allí se agregó 90  $\mu$ L de NaOH al 20%. Esto fue puesto a ebullición por 5 minutos.
- Luego de enfriar se volvió a centrifugar 10 minutos a 6000 rpm, pero esta vez se tomó el sobrenadante para medirle la concentración proteica.
- Las medidas de la concentración de proteínas se realizaron usando una curva de calibración por el método de Bradford usando un espectrofotómetro a 595 nm.

El método consiste preparar el buffer a trabajar según el medio salino de la muestra, en este caso 7,0 para el medio salino de las bacterias, y preparar el reactivo Bradford.

- Este reactivo se preparó agregando 25 mL de etanol 95° en un erlenmeyer protegido de la luz, 50 mg de azul Coomasie R-250 agregados lentamente con agitación y lentamente se agregó 50 mL de ácido ortofosfórico al 85%, para finalmente aforar con agua destilada hasta 500 mL.
- Ya habiendo preparado lo anterior se realizaron las soluciones de 50  $\mu$ L de las muestras de concentración conocida de proteína (albúmina de 0,1-1,0 mg/mL en el buffer pH 7,0 a usar) y 2,5 mL del reactivo Bradford, teniendo en cuenta que el blanco sea de 2,5 mL del reactivo Bradford y 50  $\mu$ L de buffer.
- Las muestras se dejaron reposar por 3 minutos y enseguida se leyeron las absorbancias a 595 nm luego de ajustar con el blanco mencionado. Por

último, se realizó el mismo procedimiento, pero en este caso con las muestras provenientes de la extracción de proteínas por hidrólisis básica.

Para hallar la concentración proteica se realizó la curva de calibración, usando regresión lineal se halló la correlación lineal  $y=mx+b$  y con ello fueron interpolados los datos para las muestras del caldo bacteriano.

El segundo método de extracción fue con buffer de lisis (buffer Tris base: 40 mM, urea: 7 M, tiourea 2M, CHAPS 4% p/v y PMSF: 1 mM) para las proteínas, así:

- 200  $\mu$ L de buffer de lisis fueron agregados al centrifugado en un tubo Eppendorf obtenido del caldo de cultivo con 2 o 3 lavados, realizado esto se dejó media hora en agitación en un vórtex y luego fue centrifugado a 6000 rpm por 10 minutos.
- Igual que el caso anterior, 50  $\mu$ L del extracto se usaron para determinar la concentración proteica por el método de Bradford.

Ya teniendo los extractos, fue agregado en frío 15  $\mu$ L de buffer de resolución para cada 15  $\mu$ L de muestra y aparte se prepararon los geles, así:

**Tabla 3.** Composición de los geles usados en SDS-PAGE en orden de añadidura

<b>Componente</b>	<b>Gel de empacamiento (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Gel resolución 12% (mL)</b>
<b>Agua bidestilada</b>	930	1,60
<b>Acrilamida/bis acrilamida 30%</b>	230	2,00
<b>Buffer Tris-HCl 0,5M pH: 6,8</b>	375	1,30
<b>SDS al 10%(p/v)</b>	15,0	50,0
<b>Persulfato de amonio 10%(p/v)</b>	30,0	25,0
<b>TEMED solución stock</b>	7,50	10,0

El gel resolución al 12% v/v (acrilamida/bisacrilamida 30% v/v y de 5,0 mL volumen total) posee un tamaño de poro pequeño, en el cual migrarán las proteínas según su tamaño en SDS-PAGE y el resto del procedimiento fue de montaje de la instrumentación (BIORAD Mini Protein Tetra Cell) y los geles, ingreso de 15,0  $\mu$ L de cada muestra en los pocillos, incluido el marcador para saber el peso molecular en kilodaltons.

Luego de ver el desplazamiento vertical de las proteínas, se removió el gel y se sumergió en un envase con una solución de azul de Coomassie R250 por 20 minutos en agitación con vórtex y en incubación por 16 horas en reposo.

Por último retiró la solución del colorante y se sumergió el gel en solución de decoloración rápida, para luego agrega solución de decoloración lenta (10% ácido acético glacial, 5,0% de metanol y 85% de agua en v/v) en agitación hasta poder visualizar las bandas proteicas características.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 AISLAMIENTO DE LA FAMILIA *Pseudomonaceae*

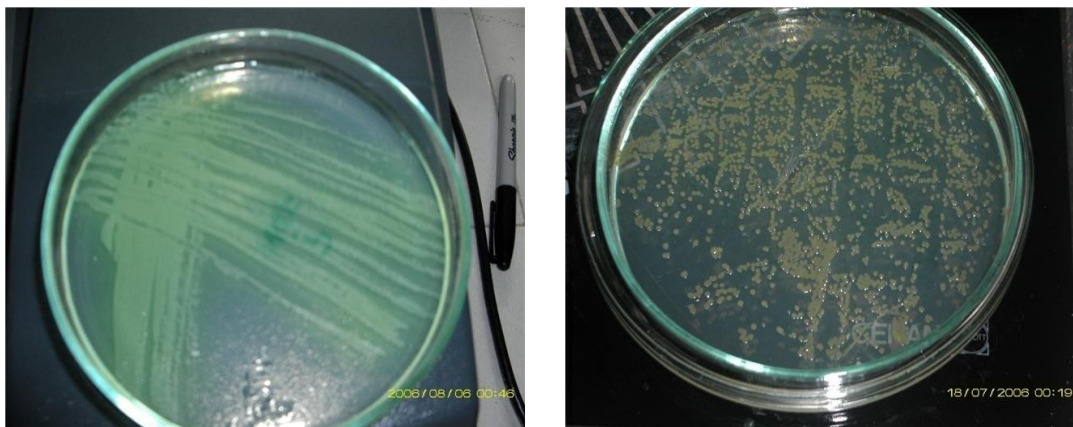
Las cepas aisladas que crecieron en el agar selectivo cetrimida para *Pseudomonas* fueron principalmente:

Colonias pequeñas redondas blancas y grandes irregulares, colonias verdes fluorescentes irregulares grandes y redondas pequeñas y colonias amarillas pequeñas redondas en general.

El aislamiento fue más notorio a partir de la dilución  $1 \cdot 10^{-4}$  y por ello con esta dilución fueron seleccionadas las 2 cepas con las que se llevó a cabo la biodegradación de cada HAP.

### 4.2 CLASIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS:

Las características físicas macroscópicas para cada cepa son las siguientes:



**Figura 9.** Aislados de *Pseudomonas* nativas utilizando como medio de aislamiento agar cetrimida: ICP-Barranca (izquierda) y La Mesa de los Santos (derecha)

#### a. Cepa proveniente del Complejo Industrial-Barrancabermeja ICP (figura 9):

**Forma de la colonia:** circular.

**Elevación de la colonia:** aplanada.

**Color y olor de la colonia:** verde que se desvanece con el tiempo y olor dulce.

**Consistencia:** lisa o uniforme.

**Borde de la colonia:** continuo.

**Opacidad:** opaca.

**b. Cepa proveniente de La Mesa de los Santos (figura 9):**

**Forma de la colonia:** circular.

**Elevación de la colonia:** aplanada.

**Color y olor de la colonia:** amarillo crema tenue que oscurece con el tiempo hacia naranja y olor dulce.

**Consistencia:** mucoide.

**Borde de la colonia:** continuo.

**Opacidad:** entre opaca y transparente.

**✦ Clasificación e Identificación basada en criterios de tinción de Gram:**

La vista microscópica del frotis en tinción de Gram las clasificó según lo siguiente:

**Cepa proveniente del Complejo Industrial-Barrancabermeja ICP:**

Bacilos pequeños aislados, Gram negativos (tinción Gram fucsia) y presencia de gránulos.

**Cepa proveniente de La Mesa de los Santos:**

Bacilos pequeños aislados y en pares, Gram negativos (tinción Gram fucsia) y con gránulos.

✦ **Clasificación e identificación basada en criterios metabólicos:**

Las observaciones del metabolismo general para cada cepa fueron las siguientes según las prueba bioquímicas realizadas para *Pseudomonas*:

**Tabla 4.** Resultados de las pruebas bioquímicas para cada cepa aislada

<b>PRUEBA BIOQUÍMICA</b>	<b>Resultado cepa ICP-Barranca</b>	<b>Resultado cepa Mesa de los Santos</b>
<b>CATALASA</b>	Positivo	Positivo
<b>REDUCCIÓN DE NITRATO</b>	Positivo nitrito y NH <sub>3</sub>	Positivo nitrito, negativo NH <sub>3</sub>
<b>FERMENTACIÓN GLUCOSA</b>	Positiva en aerobiosis	Positiva en aerobiosis
<b>PRESENCIA DE LECITINASA</b>	Negativa	Positiva (halo amarillo crema)
<b>HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN</b>	Negativa	Negativa
<b>PIGMENTOS King A y King B</b>	Positiva King B (verde sin difusión), King A negativa	+King B (amarilla-verde con difusión en el medio), King A-
<b>CRECIMIENTO A 41°C</b>	Negativo	Positivo

Según el Manual de Bergey, la cepa de ICP-Barranca no se encontró registrada y la cepa de la Mesa de los Santos es probablemente una cepa de *Pseudomonas cepacia*.

#### 4.3 CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA EL RECuento DE BIOMASA:

Luego de haber obtenido los caldos de cultivo (figura 10), se procedió a realizar las calibraciones pertinentes para cada cepa según su tamaño para medidas de densidad óptica y crecimiento celular en UFC/mL.

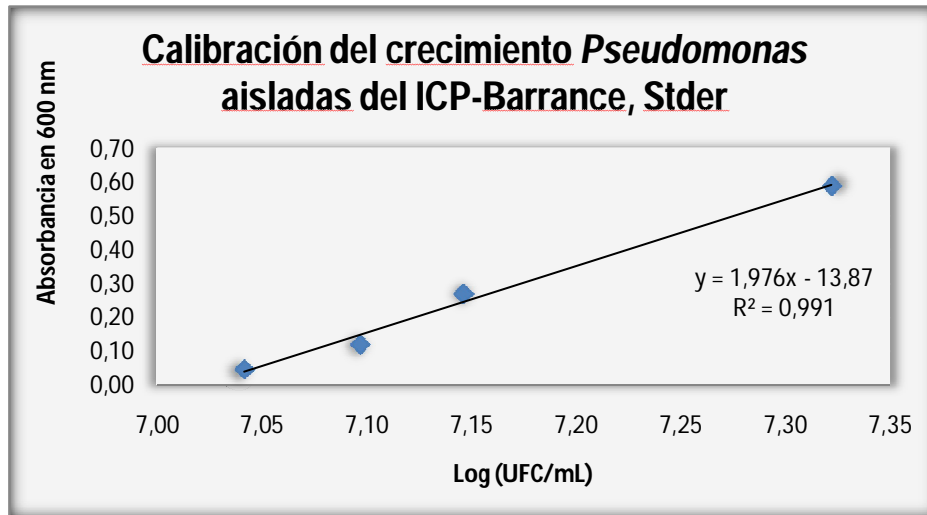


**Figura 10.** Medio salino sin inocular (izquierda) e inoculado (derecha) por la cepa aislada *Ps. cepacia* luego de 24 horas

Las correlaciones medidas para cuantificación de la biomasa bacteriana, entre el método indirecto de densidad óptica a 600 nm y el método directo de UFC/mL fueron las siguientes:

**Tabla 5.** Correlación de datos medidos para el crecimiento de la cepa *Ps. ICP-Barranca*

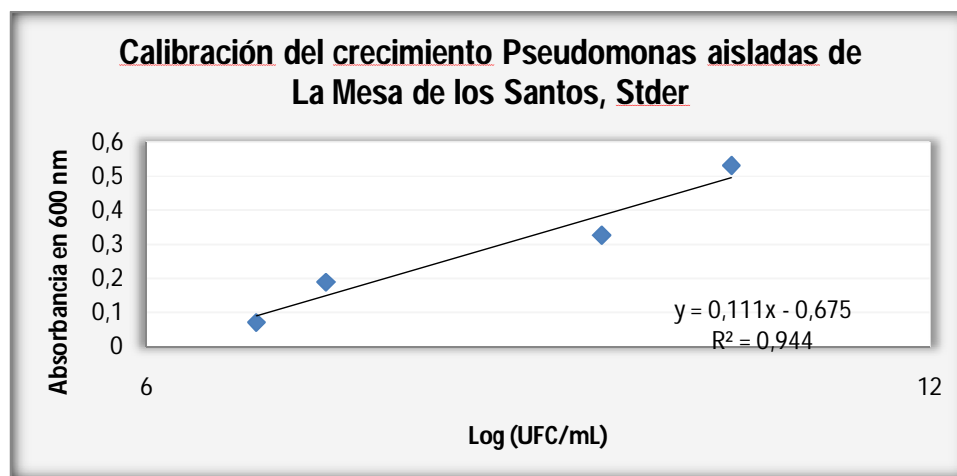
Absorbancia a 600 nm	Medida de UFC/mL	Log UFC/mL calculado
0,046	$11,0 \times 10^6$	7,0414
0,120	$12,5 \times 10^6$	7,0969
0,270	$14,0 \times 10^6$	7,1461
0,590	$21,0 \times 10^6$	7,3222



**Figura 11.** Curvas de calibración lineal del crecimiento para la cepa del ICP-Barranca.

Absorbancia a 600 nm	Medida de UFC/mL	Log (UFC/mL) calculado
0,071	$7,00 \times 10^6$	6,8451
0,189	$24,0 \times 10^6$	7,3802
0,327	$31,0 \times 10^8$	9,4914
0,532	$30,5 \times 10^9$	10,484

**Tabla 6.** Correlación para datos medidos durante el crecimiento de la posible cepa *Ps cepacia*



**Figura 12.** Curvas de calibración lineal para crecimiento de la posible cepa *Ps cepacia*.

Para esta cepa la calibración muestra un crecimiento principalmente logarítmico, indicando con ello una fase de adaptación un poco más demorada comparada con la cepa ICP-Barranca, ya que esta cepa no estaba adaptada a la presencia de los HAPs (figura 12).

#### 4.4 RESULTADOS DE LAS CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE LOS HAPs EN DIFERENTES MEDIOS SALINOS.

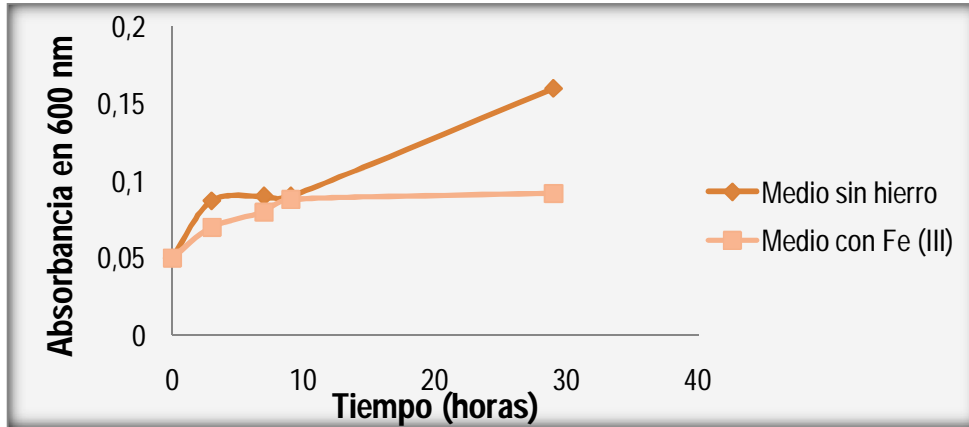
Para conocer el efecto de la presencia del hierro (II o III) en el medio salino fueron correlacionadas las medidas de absorbancia a 600 nm con el Log (UFC/mL), mediante el uso de las ecuaciones de calibración hechas según la cepa (figura 11 y figura 12).

Posteriormente, se calcularon las velocidades específicas de crecimiento ( $\mu$ ) en fase exponencial, para así poder seleccionar el mejor medio de cultivo (mayor  $\mu$  en estas condiciones) en el cual llevar a cabo las degradaciones para cada HAP como única fuente de carbono.

**Tabla 7.** Resultados de la cinética de crecimiento de *Pseudomonas sp.* del ICP-Barranca en naftaleno como fuente de carbono (pre-inóculo de 10% con absorbancia a 600 nm: 0,481)\*

Tiempo		Medio salino sin presencia de hierro		Medio salino con 0,1 mM de Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	
Horas	Absorbancia en 600 nm	Log (UFC/mL)	Absorbancia en 600 nm	Log UFC/mL	
0	0,050	7,0445	0,050	7,0445	
3	0,087	7,0633	0,070	7,0547	
7	0,090	7,0648	0,080	7,0597	
9	0,090	7,0648	0,088	7,0638	
29	0,160	7,1002	0,092	7,0658	

\*Datos obtenidos para 60 ppm de naftaleno inicialmente, pH 7,0±0,05 y 25±2,0°C con agitación por 14 horas.



**Figura 13.** Cinética de crecimiento para aislado de Ps. ICP-Barranca en medio de cultivo salino con naftaleno en presencia y ausencia de hierro

Para calcular el valor de  $\mu$ , debe calcularse primero el tiempo de generación o de duplicación promedio, es decir, el tiempo necesitado para que una cepa determinada duplique su número de células iniciales en el tiempo cero ( $t_0$ ); sabiendo que hasta el tiempo final ( $t_f$ ) para cada cinética han transcurrido  $n$  (número de generaciones) tiempos de duplicación ( $t_d$ ), tenemos la siguiente relación:

$$\text{--- (1)}$$

Sabiendo el número de células iniciales  $N_0$  y siendo la sucesión de divisiones por generación:

$N_0 \times 2^1, N_0 \times 2^2, N_0 \times 2^3, N_0 \times 2^4$ , etc hasta la sucesión final  $N_f$ :

$$\text{, definida por el } t_f \text{ (2)}$$

Relacionamos esta última ecuación (2) con los valores usados en las ecuaciones de calibración por:

$$\text{--- (3)}$$

Conociendo este valor de generaciones se obtuvo el tiempo de duplicación o generación por la ecuación (1)<sup>56</sup> y posteriormente se relacionó el  $t_d$  calculado con la velocidad específica de crecimiento  $\mu$  por hora, así:

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

$$\frac{dN}{dt} = kN \quad \frac{dX}{dt} = kX \quad \frac{dZ}{dt} = kZ \quad (4)$$

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

Mediante la integración de estas ecuaciones diferenciales, se obtiene lo siguiente aplicado en la práctica:

$$\ln Z_f - \ln Z_0 = \mu(t_f - t_0) \quad (5)$$

$$\log Z_f - \log Z_0 = \frac{\mu}{2,303}(t_f - t_0) \quad (6)$$

$$\frac{\mu}{2,303} = \frac{\log Z_f - \log Z_0}{t_f - t_0} \quad (7)$$

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu} \quad (8)$$

Y de este modo, al haber hallado el valor  $t_d$ , despejamos el valor de  $\mu$  de interés para cada medio en el que se realizó cinéticas, en un intervalo de tiempo en que pueda apreciarse crecimiento exponencial y según la cepa, ya que el crecimiento es característico para cada aislado nativo<sup>57</sup>.

Por la tabla 7 del crecimiento, se calculan los valores anteriores de acuerdo a los logaritmos obtenidos:

**Medio sin presencia de hierro de 3 a 29 horas:**

Por la ecuación (3)  $n = 0,123$

Por la ecuación (1)  $t_d = 212$  horas

Por la ecuación (8)  $\mu = 0,00327 \frac{UFC}{mL.h} = 3,27 \frac{UFC}{L.h}$

**El medio con Hierro (III) tuvo los siguientes resultados de 3 a 29 horas:**

Por la ecuación (3)  $n = 0,0369$

Por la ecuación (1)  $T_d = 705$  horas

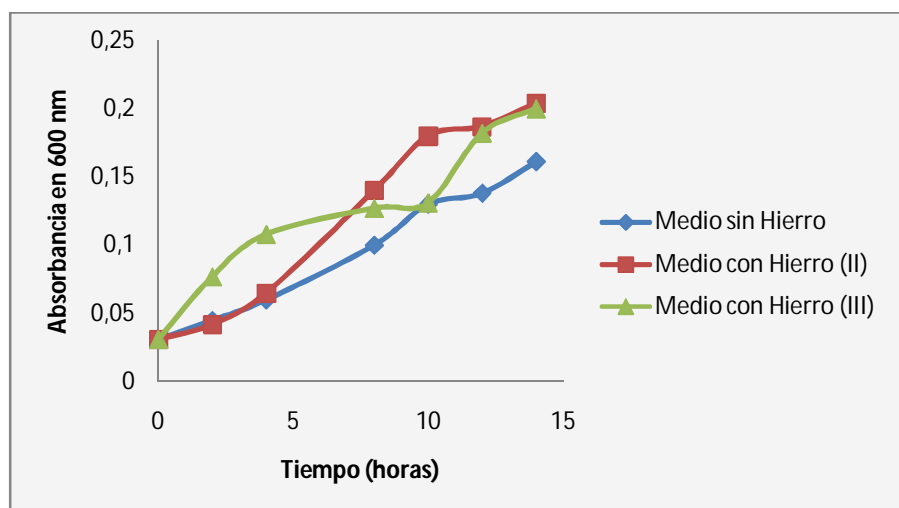
Por la ecuación (8)  $= 0,000983 \frac{UFC}{mL.h} = 0,983 \frac{UFC}{L.h}$

Lo anterior muestra que para el naftaleno en el hierro sin hierro y en el medio con hierro (III), la cepa del ICP-Barranca no tuvo una duplicación de la población bacteriana a las 29 horas de la cinética, sin embargo la mayor velocidad de crecimiento fue en el medio sin hierro, 3.3 veces mayor que en el medio con hierro (III) según estos cálculos, lo cual muestra que esta cepa no experimenta bioestimulación por hierro (III) al degradar naftaleno por la notoria diferencia de  $\mu$ s.

**Tabla 8.** Resultados de la cinética de crecimiento de *Pseudomonas* del ICP-Barranca en antraceno como fuente de carbono (pre-inóculo de 5% con absorbancia a 600 nm: 0,442)\*

Tiempo	Medio salino sin presencia de hierro		Medio salino con 0,1 mM de Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O		Medio salino con 0,1 mM de Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	
	Absorbancia en 600 nm	Log UFC/mL	Absorbancia en 600 nm	Log UFC/mL	Absorbancia en 600 nm	Log UFC/mL
0	0,031	7,0349	0,031	7,0349	0,031	7,0349
2	0,045	7,0420	0,042	7,0405	0,077	7,0582
4	0,060	7,0496	0,065	7,0521	0,108	7,0740
8	0,100	7,0698	0,140	7,0900	0,127	7,0835
10	0,130	7,0850	0,180	7,1103	0,131	7,0855
12	0,138	7,0891	0,187	7,1139	0,182	7,1113
14	0,161	7,1007	0,204	7,1225	0,200	7,1204

\*Datos obtenidos con 60 ppm de antraceno inicialmente, pH 7,0±0,05 y 25±2,0°C con agitación por 14 horas



**Figura 14.** Cinética de crecimiento de un aislado de *Pseudomonas* ICP-Barranca en medios de cultivo con antraceno (60 ppm) y con presencia y ausencia de hierro

Los cálculos para el crecimiento celular en cada medio (tabla 8) con antraceno como fuente de energía son para el intervalo de 4-14 horas:

**Tabla 9.** Efecto del hierro sobre el crecimiento celular de *Pseudomonas* ICP-Barranca en un medio de cultivo con antraceno como fuente de carbono

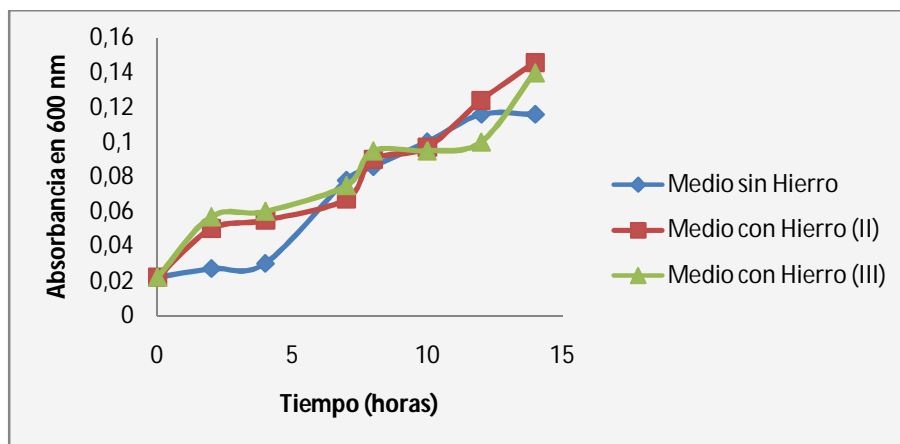
Medio salino en Antraceno	Número de generaciones	Tiempo de duplicación ( $t_d$ en horas)	Velocidad de crecimiento ( $\mu.h^{-1}$ )
Sin Hierro	0,170	58,9	0,0118
Con Hierro (II)	0,234	42,8	0,0162
Con Hierro (III)	0,154	64,9	0,0107

En la Figura 14 se observa que la bacteria crece inicialmente a una mayor velocidad específica de crecimiento en las primeras horas de cultivo en el medio con hierro (III). En el medio sin presencia de hierro se obtuvo la menor  $\mu$  bajo las condiciones trabajadas. En cambio, el crecimiento celular en el medio con hierro (II) alcanzó el menor tiempo de duplicación, correspondiente al mayor valor de crecimiento específico en antraceno, siendo 1,4 veces mayor esta velocidad comparada con el medio sin hierro (ver tabla 9).

**Tabla 10.** Resultados de la cinética de crecimiento de un aislado de *Pseudomonas* ICP-Barranca en fenantreno como fuente de carbono (pre-inóculo de 5% con absorbancia a 600 nm: 0,372)\*.

Tiempo	Medio salino sin presencia de hierro		Medio salino con 0,1 mM de Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> H <sub>2</sub> O		Medio salino con 0,1 mM de Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	
Horas	Absorbancia en 600 nm	Log UFC/mL	Absorbancia en 600 nm	Log UFC/mL	Absorbancia en 600 nm	Log UFC/mL
0	0,022	7,0304	0,022	7,0304	0,022	7,0304
2	0,027	7,0329	0,050	7,0445	0,057	7,0481
4	0,030	7,0344	0,055	7,0471	0,060	7,0496
7	0,078	7,0587	0,067	7,0531	0,075	7,0572
8	0,086	7,0628	0,090	7,0648	0,095	7,0673
10	0,100	7,0698	0,097	7,0683	0,095	7,0673
12	0,116	7,0779	0,124	7,0820	0,100	7,0698
14	0,116	7,0779	0,146	7,0931	0,140	7,0900

\*Datos obtenidos con 60 ppm de fenantreno inicialmente, pH: 7,0±0,05 y 25±2,0°C con agitación por 14 horas)



**Figura 15.** Cinética de crecimiento de una aislado de *Ps.* ICP-Barranca en medio de cultivo salino con Fenantreno en presencia y ausencia de hierro

Usando los datos de la tabla 10 se realizaron los siguientes cálculos en el intervalo de 10-14 horas:

**Tabla 11.** Efecto del hierro sobre el crecimiento celular de *Pseudomonas* ICP-Barranca en un medio de cultivo con Fenantreno como fuente de carbono

Medio salino en Fenantreno	Número de generaciones	Tiempo de duplicación ( $t_d$ en horas)	Velocidad de crecimiento ( $\mu.h^{-1}$ )
Sin Hierro	0,0270	149	0,00466
Con Hierro (II)	0,0824	48,5	0,0143
Con Hierro (III)	0,0754	53,0	0,0131

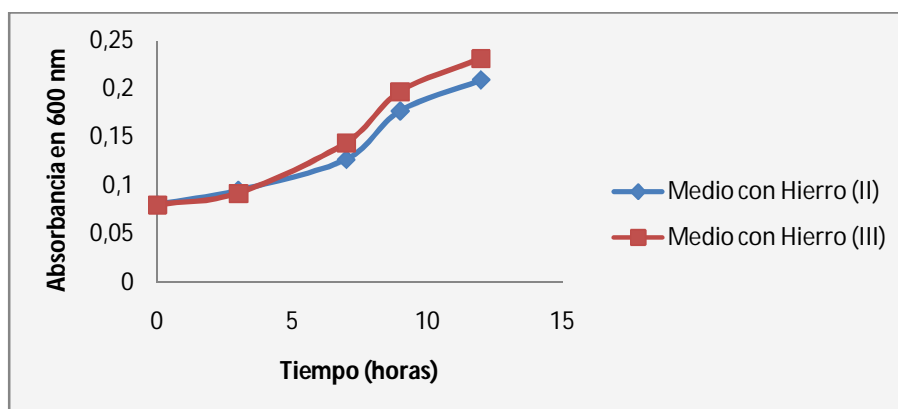
En los medios de cultivo con fenantreno (Ver figura 15) la bacteria presentó un mejor crecimiento al inicio del cultivo en un medio con hierro trivalente con 2,8 mayor  $\mu$  respecto al medio sin hierro.

No obstante, después de las 10 horas de cultivo celular, las bacterias presentaron mayor estimulación del crecimiento en el medio con Fe (II) con un valor similar de 3,0 veces la velocidad del medio sin hierro (ver tabla 11).

**Tabla 12.** Resultados de la cinética de crecimiento celular de un aislado *Pseudomonas* ICP-Barranca en pireno como fuente de carbono (pre-inóculo de 10% con absorbancia a 600 nm: 0,481)\*.

Tiempo	Medio salino con 0,1 Mm de $Fe(SO_4).6H_2O$		Medio salino con 0,1 mM de $Fe(NO_3)_3.9H_2O$	
Horas	Absorbancia en 600 nm	Log UFC/mL	Absorbancia en 600 nm	Log UFC/mL
0	0,080	7,0597	0,080	7,0597
3	0,095	7,0673	0,092	7,0658
7	0,127	7,0835	0,144	7,0921
9	0,177	7,1088	0,197	7,1189
12	0,209	7,1250	0,231	7,1361

\*Datos obtenidos con 60 ppm de pireno inicialmente, pH:  $7,0 \pm 0,05$  y  $25 \pm 2,0^\circ C$  con agitación constante durante 12 horas



**Figura 16.** Cinética de crecimiento celular de *Pseudomonas* ICP-Barranca utilizando un medio de cultivo con Pireno en presencia y ausencia de hierro

Usando los datos de la tabla 12 para 7 a 12 horas de crecimiento celular se calculó lo siguiente:

**Tabla 13.** Efecto del Hierro sobre el crecimiento celular de *Pseudomonas* ICP-Barranca en un medio de cultivo con Pireno con fuente de carbono.

Medio salino en Pireno	Número de generaciones	Tiempo de duplicación ( $t_d$ en horas)	Velocidad de crecimiento ( $\mu.h^{-1}$ )
Con Hierro (II)	0,138	36,3	0,0191
Con Hierro (III)	0,146	34,2	0,0203

En este caso, la velocidad específica de crecimiento aumentó en presencia de hierro (III) durante el tiempo de cultivo evaluado con 1,1 más velocidad que el medio con hierro (II) (Ver tabla 13).

Este HAP es más complejo, pero las bacterias pudieron degradarlo y usarlo como sustrato (fuente de Carbono) para poder crecer en el medio de cultivo.

**Tabla 14.** Resultados de la cinética de crecimiento celular de un aislado de *Pseudomonas* ICP-Barranca (pre-inóculo de 10% con absorbancia a 600 nm: 0,461) en medios de cultivo con benceno\*.

Tiempo	Medio salino sin presencia de hierro		Medio salino con 0,1 mM de Fe(SO <sub>4</sub> ).6H <sub>2</sub> O		Medio salino con 0,1 mM de Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	
Horas	Absorbancia en 600 nm	Log UFC/mL	Absorbancia en 600 nm	Log UFC/mL	Absorbancia en 600 nm	Log UFC/mL
0	0,060	7,0496	0,060	7,0496	0,060	7,0496
4	0,090	7,0648	0,090	7,0648	0,081	7,0602
8	0,137	7,0886	0,129	7,0845	0,087	7,0633
33	0,140	7,0900	0,134	7,0870	0,139	7,0896

\*Datos obtenidos con 60 ppm de benceno inicialmente, pH: 7.0±0,05, 33 horas y 25±2,0°C con agitación constante

**Tabla 15.** Resultados de la cinética de crecimiento de un aislado nativo *Pseudomonas* ICP-Barranca (pre-inóculo de 10% con absorbancia a 600 nm: 0,461) en medios de cultivo con tolueno\*

Tiempo	Medio salino sin presencia de hierro		Medio salino con 0,1 mM de Fe(SO <sub>4</sub> ).6H <sub>2</sub> O		Medio salino con 0,1 mM de Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	
Horas	Absorbancia en 600 nm	Log UFC/mL	Absorbancia en 600 nm	Log UFC/mL	Absorbancia en 600 nm	Log UFC/mL
0	0,072	7,0557	0,072	7,0557	0,072	7,0557
4	0,090	7,0648	0,086	7,0628	0,074	7,0567
8	0,107	7,0734	0,114	7,0769	0,074	7,0567
33	0,121	7,0805	0,149	7,0946	0,102	7,0709

\*Datos obtenidos con 60 ppm de tolueno inicialmente, pH: 7.0±0,05, 33 horas y 25±2,0°C con agitación constante

En este punto se descartó el tolueno y el benceno como sustratos por su lenta adaptación, es decir, crecimiento muy lento para llegar a la fase exponencial y la posible cepa *P.cepacia* demostró muy poco crecimiento por degradación para estos mismos sustratos.

La ruta de degradación del benceno por *Pseudomonas* genera inicialmente benceno-*cis*-glicol (catecol) y posteriormente ocurre el rompimiento del anillo en posición meta, lo cual es realizado por enzimas dioxigenasas ferrosas. Sin

embargo, no se observó la estimulación del crecimiento bacteriano con  $Fe^{II}$ , lo cual indica que al igual que para el naftaleno, las enzimas inducidas por el benceno son afectadas por variaciones de concentraciones de Fe en el medio de cultivo.

En el caso del tolueno la oxidación ocurre inicialmente por transformación del sustituyente del anillo en bencil alcohol gracias a la enzima tolueno mono-oxigenasa. Luego actúa la bencil alcohol deshidrogenasa y se escinde el anillo en la posición meta por las enzimas ferrosas dioxigenasas.

Debido a que en la etapa de crecimiento adaptativo se observó mayor crecimiento en la presencia de  $Fe^{II}$ , es probable que la actividad de estas enzimas haya sido estimulada por la adición de este nutriente (tabla 15), excepto para la deshidrogenasa que no experimenta reducción en su actividad bajo condiciones de limitación en el hierro<sup>11,58</sup>.

Para la cepa identificada como *Pseudomonas cepacia*, la influencia del hierro en la velocidad de crecimiento en medios de cultivo con hidrocarburos aromáticos se expone a continuación:

**Tabla 16.** Resultados de la cinética de crecimiento para *Pseudomonas cepacia* en naftaleno como fuente de carbono (pre-inóculo de 5% con absorbancia a 600 nm: 0,360)\*

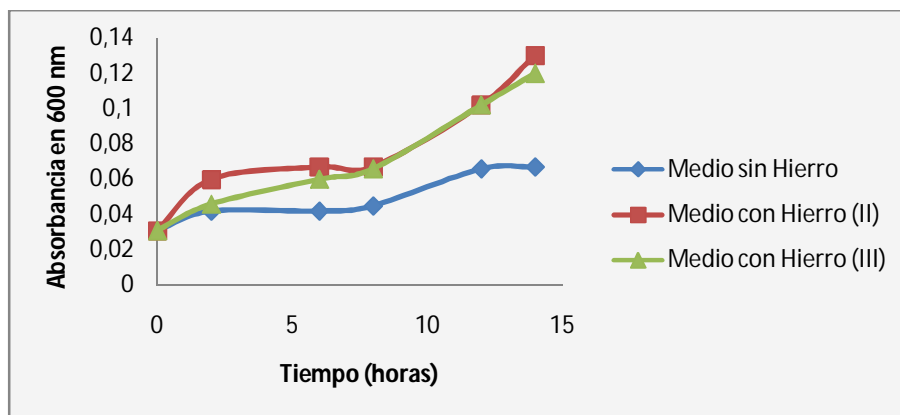
Tiempo	Medio salino sin presencia de hierro		Medio salino con 0,1 mM de $Fe(SO_4)_6 \cdot 6H_2O$		Medio salino con 0,1 mM de $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$	
Horas	Absorbancia en 600 nm	Log UFC/mL	Absorbancia en 600 nm	Log UFC/mL	Absorbancia en 600 nm	Log UFC/mL
0	0,031	6,3604	0,031	6,3604	0,031	6,3604
2	0,042	6,4595	0,060	6,6216	0,046	6,4955
6	0,042	6,4595	0,067	6,6847	0,060	6,6216
8	0,045	6,4865	0,067	6,6847	0,066	6,6757
12	0,066	6,6757	0,102	7,0000	0,102	7,0000
14	0,067	6,6847	0,130	7,2523	0,120	7,1622

\*Datos para 60 ppm de naftaleno inicialmente, pH  $7.0 \pm 0,05$ , 12 horas y  $25 \pm 2,0^\circ C$  con agitación constante.

Usando los datos de la tabla 16 se realizaron los siguientes cálculos en el intervalo de 8 a 14 horas:

**Tabla 17.** Efecto del Hierro sobre el crecimiento celular de *Pseudomonas cepacia* en un medio de cultivo con Naftaleno.

Medio salino en Naftaleno	Número de generaciones	Tiempo de duplicación ( $t_d$ en horas)	Velocidad de crecimiento ( $\mu.h^{-1}$ )
Sin Hierro	0,658	9,11	0,0761
Con Hierro (II)	1,89	3,18	0,218
Con Hierro (III)	1,62	3,71	0,187



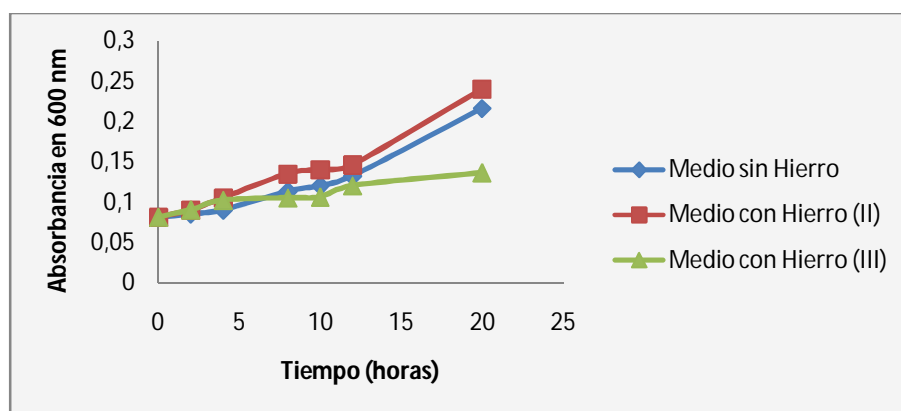
**Figura 17.** Cinética de crecimiento celular de un aislado nativo de *Ps. cepacia* en medios de cultivo con Naftaleno en presencia y ausencia de hierro

Los resultados del crecimiento muestran menor tiempo de duplicación para el medio con hierro (II) con 2,8 veces mayor velocidad que para el medio sin hierro (ver tabla 17). Para el aislado *Pseudomonas* ICP-Barranca no se observó estimulación por hierro (III). En general, es mayor el crecimiento exponencial con hierro exógeno en naftaleno como fuente de carbono y energía para la cepa de La Mesa de los Santos, ya que en poco tiempo se alcanzó la duplicación de la población.

**Tabla 18.** Resultados de la cinética de crecimiento celular para *Pseudomonas cepacia* en antraceno como fuente de carbono (pre-inóculo de 5% con absorbancia a 600 nm: 0,360)\*.

Tiempo	Medio salino sin presencia de hierro		Medio salino con 0,1 Mm de Fe(SO <sub>4</sub> ).6H <sub>2</sub> O		Medio salino con 0,1 Mm de Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	
Horas	Absorbancia en 600 nm	Log UFC/mL	Absorbancia en 600 nm	Log UFC/mL	Absorbancia en 600 nm	Log UFC/mL
0	0,081	6,8108	0,081	6,8108	0,081	6,8108
2	0,085	6,8468	0,090	6,8919	0,090	6,8919
4	0,090	6,8919	0,105	7,0270	0,102	7,0000
8	0,113	7,0991	0,135	7,2973	0,105	7,0270
10	0,120	7,1622	0,140	7,3423	0,106	7,0360
12	0,132	7,2703	0,146	7,3964	0,120	7,1622
20	0,216	8,0270	0,240	8,2432	0,136	7,3063

\*Datos para 60 ppm de antraceno inicialmente, pH 7.0±0,05, 20 horas y 25±2,0°C con agitación constante.



**Figura 18.** Cinética de crecimiento celular de un aislado nativo de *Ps. cepacia* en medios de cultivo con antraceno en presencia y ausencia de hierro

Usando los datos de la tabla 18 fueron hallados los siguientes valores para 10 a 20 horas de crecimiento:

**Tabla 19.** Efecto del Hierro sobre el crecimiento celular para *Pseudomonas cepacia* en un medio de cultivo con antraceno como fuente de carbono

Medio salino en Antraceno	Número de generaciones	Tiempo de duplicación ( $t_d$ en horas)	Velocidad de crecimiento ( $\mu.h^{-1}$ )
Sin Hierro	2,87	3,48	0,199
Con Hierro (II)	3,00	3,34	0,207
Con Hierro (III)	0,898	11,1	0,0622

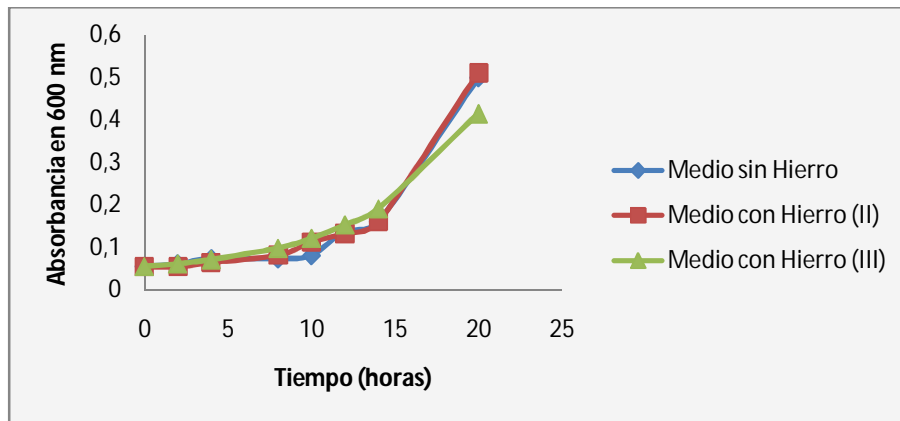
En estos estudios, el aislado de *Ps. cepacia* alcanzó mejor crecimiento en los medios con Fe (II), con el triple de la velocidad de crecimiento del medio con Fe<sup>III</sup> (ver tabla 19) y con menor tiempo de duplicación, el cual fue el mismo comportamiento observado para la cepa del ICP-Barranca.

Este comportamiento puede explicarse teniendo en cuenta el sistema enzimático expresado para la oxidación del antraceno, el cual como se observó es inhibido por la presencia de hierro (III) exógeno, ya que la enzima encargada de la escisión del anillo aromático en posición meta del sustrato 1,2-dihidroxi-antraceno es una enzima ferrosa, que posiblemente experimentó un aumento de su actividad catalítica gracias a la presencia del hierro divalente (ver figura 5)<sup>59</sup>.

**Tabla 20.** Resultados de la cinética de crecimiento para *Pseudomonas cepacia* en fenantreno como fuente de carbono (pre-inóculo de 5% con absorbancia a 600 nm: 0,433)\*

Tiempo	Medio salino sin presencia de hierro		Medio salino con 0,1 mM de Fe(SO <sub>4</sub> ).6H <sub>2</sub> O		Medio salino con 0,1 mM de Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	
Horas	Absorbancia en 600 nm	Log UFC/mL	Absorbancia en 600 nm	Log UFC/mL	Absorbancia en 600 nm	Log UFC/mL
0	0,054	6,5676	0,054	6,5676	0,054	6,5676
2	0,060	6,6216	0,054	6,5676	0,060	6,6216
4	0,072	6,7297	0,064	6,6577	0,070	6,7117
8	0,072	6,7297	0,081	6,8108	0,097	6,9549
10	0,080	6,8018	0,112	7,0901	0,120	7,1622
12	0,138	7,3243	0,132	7,2703	0,152	7,4505
14	0,160	7,5225	0,160	7,5225	0,190	7,7928
20	0,498	10,567	0,510	10,676	0,414	9,8108

\*Datos obtenidos para 60 ppm de fenantreno inicialmente, pH: 7.0±0,05, 30 horas y 25°C±2,0 con agitación permanente



**Figura 19.** Cinética de crecimiento de un aislado nativo de *Ps. cepacia* en medios de cultivo con Fenantreno en presencia y ausencia de hierro

Usando los datos de la cinética registrados en la tabla 20 para 12 a 20 horas, se determinó lo siguiente:

**Tabla 21.** Efecto del hierro en el crecimiento celular para *Pseudomonas cepacia* en medio de cultivo con Fenantreno como fuente de carbono

Medio salino en Fenantreno	Número de generaciones	Tiempo de duplicación ( $t_d$ en horas)	Velocidad de crecimiento ( $\mu.h^{-1}$ )
Sin Hierro	10,8	1,67	0,304
Con Hierro (II)	11,3	1,59	0,436
Con Hierro (III)	7,84	2,30	0,302

En estos estudios se observaron ligeras diferencias de estimulación para el crecimiento celular en medio con fenantreno. No obstante, se obtuvo mayor crecimiento celular durante la fase adaptativa en el medio con hierro (III), debido posiblemente a una mayor inducción de las enzimas por adición de este nutriente (ver figura 19).

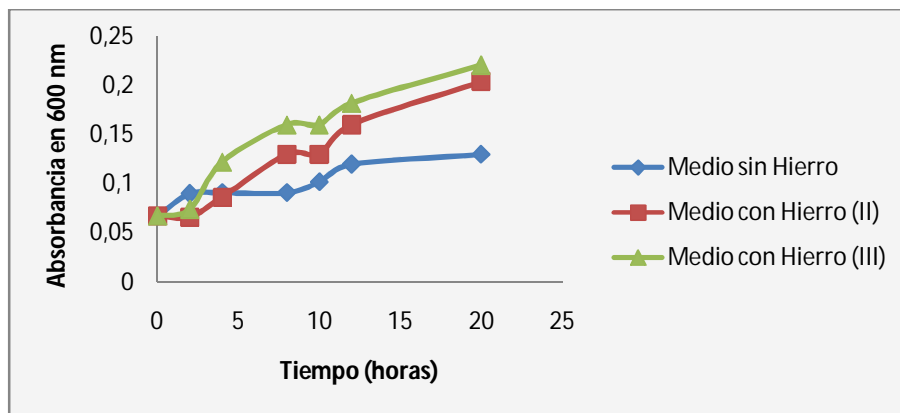
Sin embargo, se observa mayor estimulación del crecimiento durante la fase exponencial en el medio de cultivo con hierro (II), duplicando la velocidad de crecimiento en comparación con los otros medios de cultivo estudiados.

Este aislado de la Mesa de los Santos, comparado con el otro aislado, presentó mayor crecimiento en los HAPs como única fuente de carbono, ya que la duplicación de la población bacteriana se logró en tiempos muy cortos. En cambio, en el otro aislado la población no alcanzó a duplicarse en los tiempos trabajados.

**Tabla 22.** Cinética de crecimiento celular para *Pseudomonas cepacia* en pireno como fuente de carbono (pre-inóculo de 5% con absorbancia a 600 nm: 0,433)\*

Tiempo	Medio salino sin presencia de hierro		Medio salino con 0,1 mM de Fe(SO <sub>4</sub> ).6H <sub>2</sub> O		Medio salino con 0,1 mM de Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	
Horas	Absorbancia 600 nm	Log UFC/mL	Absorbancia 600 nm	Log UFC/mL	Absorbancia 600 nm	Log UFC/mL
0	0,067	6,6847	0,067	6,6847	0,067	6,6847
2	0,090	6,8919	0,066	6,6757	0,074	6,7477
4	0,091	6,9009	0,086	6,8559	0,122	7,1802
8	0,091	6,9009	0,130	7,2522	0,160	7,5225
10	0,102	7,0000	0,130	7,2522	0,160	7,5225
12	0,120	7,1622	0,160	7,5225	0,182	7,7207
20	0,130	7,2522	0,204	7,9189	0,221	8,0721

\*Datos obtenidos para 60 ppm de pireno inicialmente, pH 7.0±0,05 y 25°C±2,0 con agitación constante



**Figura 20.** Cinética de crecimiento celular de un aislado nativo de *Ps. cepacia* en un medio de cultivo con Pireno en presencia y ausencia de hierro

Con los datos de la tabla 22 para 2 a 20 horas se realizaron los cálculos que evidencian las diferencias entre los medios con Pireno:

**Tabla 23.** Efecto del hierro sobre el crecimiento celular para *Pseudomonas cepacia* en un medio de cultivo con Pireno como fuente de carbono

Medio salino en Pireno	Número de generaciones	Tiempo de duplicación ( $t_d$ en horas)	Velocidad de crecimiento ( $\mu.h^{-1}$ )
Sin Hierro	1,20	15,0	0,0461
Con Hierro (II)	4,13	4,36	0,159
Con Hierro (III)	4,40	4,09	0,169

En este caso, la presencia de hierro aumentó significativamente el crecimiento celular del aislado nativo de *Ps. cepacia*, lo cual permitió la bioestimulación del crecimiento principalmente en presencia del hierro (III) con 3,7 veces mayor velocidad que en el medio sin hierro (ver tabla 23).

Este efecto fue similar para el cultivo de la *Pseudomonas* ICP-Barranca (Ver figura 20).

Este comportamiento probablemente se deba a la presencia de enzimas que activan el  $O_2$  a través de una reacción redox con Fe(III), con la cual se generarían especies radicalarias del oxígeno ( $S=1/2$ ) que favorecen la oxidación por  $O_2$  ( $S=1$ ) de los compuestos aromáticos bajo un espín permitido.

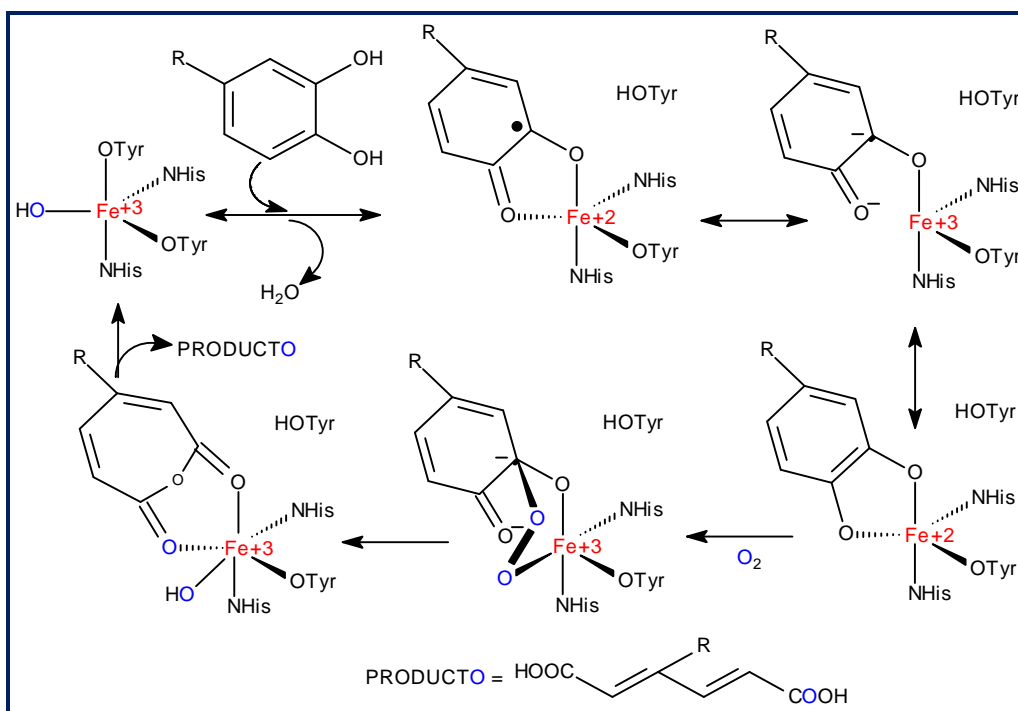
Esto se lleva a cabo debido a que el sustrato aromático ( $S=0$ ) es termodinámicamente favorable para reaccionar, pero cinéticamente lento para la oxidación por el  $O_2$  al ser espín prohibido.

Estas enzimas mononucleares que poseen un sitio activo con hierro (III) de alto espín y geometría bipiramidal trigonal distorsionada (ver figura 21) son llamadas enzimas sustrato-activantes férricas y para el caso particular de los HAPs son enzimas intradiol dioxigenasas.

Dichas enzimas catalizan el rompimiento del anillo aromático en posición orto para el HAP 3,4-dihidroxi-HAP, caso contrario a las extradiol dioxigenasas (enzimas

activantes-O<sub>2</sub> ferrosas), que catalizan el rompimiento del anillo en posición meta para el 1,2-dihidroxi.HAP.

La unión del sustrato 3,4-dihidroxi fenantreno, producido en la degradación del fenantreno y del pireno, genera una geometría piramidal cuadrada por enlace bidentado con la forma doblemente desprotonada de la enzima, como primer paso en la posterior activación de este sustrato.



**Figura 21.** Mecanismo propuesto para las intradiol dioxigenasas actuando sobre un diol-aromático (3,4-dihidroxi-HAP)

El mecanismo de activación del 3,4-dihidroxi-HAP consiste en la transferencia de un par electrones del orbital molecular ocupado más alto del sustrato hacia la molécula triplete del O<sub>2</sub>, logrando con esto que el Fe<sup>III</sup> con S=5/2 pase a una coordinación de bajo espín con S=3/2.

Luego de obtenerse el espín permitido, el O<sub>2</sub> procede a ligarse al sustrato formando un aducto peroxi (quinona), se disocia el enlace Fe-O<sup>catecolato</sup> y por último ocurre la escisión del anillo (figura 21)<sup>59,60</sup>.

Debido a estas observaciones en las cinéticas de crecimiento, puede corroborarse la clase de rompimiento que ocurre en el anillo aromático, de acuerdo a la enzima dioxigenasa inducida por la bacteria en presencia del catecol del HAP; ya sea rompimiento extradiol de 1,2-dioles ( $\text{Fe}^{\text{II}}$  exógeno estimuló el crecimiento en antraceno) u intradiol de 3,4-dioles ( $\text{Fe}^{\text{III}}$  exógeno estimuló el crecimiento en fenantreno y pireno).

#### **4.5 RESULTADOS DE LA COMPARACIÓN DE VELOCIDADES DE DEGRADACIÓN ESTIMULADA PARA CADA HAP:**

##### **4.5.1 Efecto de diferentes concentraciones de hierro sobre el proceso de biodegradación de los HAPs.**

En estas experiencias se evaluó el efecto de diferentes cantidades de hierro divalente, excepto para el Pireno, que se trabajó con hierro trivalente debido a los resultados antes vistos. Esta evaluación se llevó a cabo durante un tiempo de biodegradación de 24 horas para los diferentes HAPs, realizando los cálculos para porcentajes de biodegradación con las curvas de calibración ajustadas UV-VIS (ver anexo 1) y teniendo en cuenta las cantidades de cada HAP pérdidas abióticamente (anexo 8).

**Tabla 24.** Efecto de la concentración de  $\text{Fe}(\text{SO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  sobre la biodegradación por 24 horas de naftaleno para *Pseudomonas* ICP-Barranca

<b><math>\text{Fe}(\text{SO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}</math> en el medio salino (mM)</b>	<b>Absorbancia en 600 nm del medio salino</b>	<b>Log UFC/mL</b>	<b>Absorbancia<sup>1</sup> en UV-VIS del extracto<sup>2</sup></b>	<b>%Remoción en 24 horas<sup>3</sup></b>
<b>NAFTALENO</b>				
<b>0,05</b>	1,191	7,622	0,134	>48
<b>0,10</b>	1,206	7,630	0,128	>48 máximo
<b>0,15</b>	0,970	7,510	0,174	>48
<b>0,20</b>	0,942	7,496	0,218	>48
<b>ANTRACENO</b>				
<b>0,05</b>	0,266	7,154	0,631(2)	56
<b>0,10</b>	0,501	7,273	0,755	70
<b>0,15</b>	0,584	7,315	0,752	70
<b>0,20</b>	0,460	7,252	0,631(2)	56
<b>FENANTRENO</b>				
<b>0,05</b>	0,555	7,300	0,332	63
<b>0,10</b>	0,570	7,308	0,327	65
<b>0,15</b>	0,631	7,339	0,319	68
<b>0,20</b>	0,663	7,355	0,270	84
<b><math>\text{Fe}(\text{NO}_3) \cdot 3\text{H}_2\text{O}</math> (mM)</b>	<b>PIRENO</b>			
<b>0,05</b>	0,515	7,280	0,136	>95 máximo
<b>0,10</b>	0,506	7,275	0,182	>95
<b>0,15</b>	0,476	7,260	0,389	91
<b>0,20</b>	0,448	7,246	0,765	83

<sup>1</sup>En orden descendente: 275 nm para el naftaleno, 356 para antraceno, 298 para fenantreno y 299 nm para pireno.

<sup>2</sup>Valor tomado teniendo en cuenta 60,0 ppm de concentración inicial a pH  $7,0 \pm 0,05$  y  $25^\circ\text{C} \pm 2,0$  con agitación constante.

<sup>3</sup> Entre paréntesis: factor de dilución asociado con la medida de absorbancia y máximo: para la menor absorbancia detectada por UV-VIS que estuvo por debajo de los valores de la curva de calibración.

En los datos compilados en la tabla 24 para los aislados nativos *Pseudomonas* ICP-Barranca se observó:

La biodegradación del fenantreno mostró alta dependencia del hierro (II) exógeno como nutriente, ya que el mayor porcentaje de remoción se presentó para el medio con 0,20 mM con 1.3 veces más degradación que el medio de cultivo con 0,05mM.

A su vez, para el antraceno, el mayor porcentaje de remoción fue en 0,15 mM con 1.3 veces mayor degradación que el medio de cultivo con 0,05 mM.

Para el medio de cultivo con naftaleno no se observó influencia en la degradación debido al hierro (II), lo cual ya ha sido documentado debido a que la enzima naftaleno dioxigenasa no exhibe aumento de su actividad con hierro exógeno<sup>61</sup>.

Respecto a la oxidación del Pireno en presencia de hierro (III) exógeno (ver tabla 24), el mejor resultado se observó para bajas cantidades de este nutriente, pues para 0,05 mM en el medio salino hubo 1.1 veces mayor biodegradación comparado con 0,20 mM para *Pseudomonas* ICP-Barranca.

Se presentó el mismo comportamiento en el pireno como fuente de carbono y energía de las *Pseudomonas cepacia*, alcanzando 1,3 veces mayor remoción para el medio con 0,10 mM respecto al medio con 0,20 mM de hierro trivalente (ver tabla 25).

**Tabla 25.** Efecto de la concentración de  $\text{Fe}(\text{SO}_4)_6\text{H}_2\text{O}$  sobre la biodegradación de los HAPs por 24 horas para *Pseudomonas cepacia*.

<b>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>H<sub>2</sub>O en el medio salino (mM)</b>	<b>Absorbancia en 600 nm del medio salino</b>	<b>Log UFC/mL</b>	<b>Absorbancia<sup>1</sup> en UV-VIS del extracto<sup>2</sup></b>	<b>%Remoción en 24 horas<sup>3</sup></b>
<b>NAFTALENO</b>				
<b>0,05</b>	0,251	8,342	1,313	<37
<b>0,10</b>	0,301	8,793	1,127	<37
<b>0,15</b>	0,569	9,549	0,910	39
<b>0,20</b>	0,370	9,414	0,940	38
<b>ANTRACENO</b>				
<b>0,05</b>	0,148	7,414	0,791 (2)	44
<b>0,10</b>	0,164	7,559	0,772 (2)	45
<b>0,15</b>	0,216	8,027	0,765 (2)	46
<b>0,20</b>	0,220	8,063	0,731 (2)	48
<b>FENANTRENO</b>				
<b>0,05</b>	0,341	9,153	0,323	66
<b>0,10</b>	0,370	9,414	0,180	>88
<b>0,15</b>	0,490	10,495	0,159	>88
<b>0,20</b>	0,720	12,568	0,100	>88 máximo
<b>Fe (NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O (mM) PIRENO</b>				
<b>0,05</b>	0,206	7,937	0,818 (2)	64
<b>0,10</b>	0,374	9,450	0,600 (2)	73
<b>0,15</b>	0,290	8,694	0,807 (2)	64
<b>0,20</b>	0,160	7,522	0,993 (2)	56

<sup>1</sup>En orden descendente: 275 nm para naftaleno, 356 nm para antraceno, 298 nm para fenantreno y 299 nm para pireno.

<sup>2</sup>Valor tomado teniendo en cuenta 60,0 ppm de concentración inicial con pH 7,0±0,05 y 25°C±2,0 con agitación cte.

<sup>3</sup>Entre paréntesis: factor de dilución asociado con la medida de absorbancia y máximo: para la menor absorbancia detectada en UV-VIS que estuvo por debajo de los valores de la curva de calibración.

El efecto de la presencia de hierro (II) exógeno en la oxidación de los HAPs por cepas nativas de *Pseudomonas cepacia* de la Mesa de los Santos fue:

Para el antraceno como fuente de carbono hubo un aumento en el porcentaje de remoción conforme aumentaba la cantidad de  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , llegando a lograrse en 0,20 mM 1.1 veces más biodegradación que la presentada con 0,05 mM.

Otro resultado importante ocurrió para el Fenantreno, donde la biodegradación se incrementó 1,3 veces en el medio con 0,20 mM de Fe<sup>II</sup> comparado con el medio con 0,05mM.

#### 4.6 RESULTADOS DE LA BIODEGRADACIÓN ESTIMULADA EN PRESENCIA DE MEZCLAS DE HAPs USANDO UN CONSORCIO BACTERIANO

Para los cálculos de las mezclas entre Antraceno y los otros HAPs trabajados, se usaron las curvas de calibración en el UV-VIS (ver anexo 1) y para el resto de casos la determinación de las concentraciones finales de contaminante fueron realizadas por análisis en HPLC (ver anexo 2), teniendo en cuenta las cantidades perdidas abióticamente para cada HAP (anexo 8).

**Tabla 26.** Efecto del Fe(SO<sub>4</sub>).6H<sub>2</sub>O sobre la Biodegradación del Antraceno en presencia de otro HAP (50 ppm cada uno) por consorcio de los 2 aislados nativos *Pseudomonas*.

Fe(SO <sub>4</sub> ).6H <sub>2</sub> O en el medio salino (mM) <sup>1</sup>	Absorbancia 1 del extracto en 356 nm	%Remoción del antraceno	Absorbancia 2 del extracto <sup>2</sup>	%Remoción del 2º HAP
<b>ANTRACENO-PIRENO</b>				
0,10	0,440	78	0,710(2)	62
0,15	0,358	82	1,054	75
0,20	0,226	>86	0,592	84
0,30	0,266	86	0,678	82
<b>ANTRACENO-NAFTALENO</b>				
0,10	0,763(2)	35	0,620(2)	33
0,15	0,850	60	0,750(2)	23
0,20	0,683	67	0,866(2)	13
0,30	0,594	71	0,882(2)	12
<b>ANTRACENO-FENANTRENO</b>				
0,10	0,749(2)	36	0,459	5,3
0,15	0,879	58	0,460	4,9
0,20	0,739	65	0,460	4,9
0,30	0,986	53	0,402	28

<sup>1</sup>En orden descendiente: 299 nm pireno, 275 nm naftaleno y 298 nm fenantreno.

<sup>2</sup>Condiciones del cultivo: agitación constante, pH 7,0±0,05 y 25°C±2,0 por 24 horas.

Para cada HAPs degradado en presencia del Antraceno (tabla 26) se observó que a las 24 horas:

- Se degradó de manera significativa el antraceno en presencia del pireno, siendo la cantidad 0,20 mM de hierro (II) presente en el medio de cultivo, la que mejor estimuló la remoción de los dos contaminantes, con un 81,5% para el Pireno y más del 85,0% para el antraceno.
- En las degradaciones del antraceno en presencia del Naftaleno se observó mayor remoción del antraceno para 0,30 mM de hierro (II), mientras que la mayor remoción de naftaleno ocurrió para 0,10 mM, lo cual mostró que al estar presente naftaleno y antraceno como fuentes de carbono, el hierro (II) exógeno es asimilado principalmente para la degradación del antraceno.
- Por último, se disminuyó drásticamente la degradación del Fenantreno en presencia del antraceno como fuente de carbono, mientras la mayor remoción del antraceno fue para el medio de cultivo con 0,20 mM de Fe<sup>II</sup>, lo cual puede demostrar que existe competencias entre enzimas por la asimilación del nutriente ferroso.

Para la mezcla de Naftaleno-Fenantreno, el Fenantreno aumentó su porcentaje de remoción, siendo la cantidad 0,30 mM de Fe<sup>II</sup> donde hubo mayor biodegradación (ver tabla 27).

En este caso, se observa también que la mayor degradación del Naftaleno ocurrió para la menor cantidad de hierro presente en el medio de cultivo, por lo que para la oxidación del Fenantreno el hierro (II) es asimilado en su totalidad, al no ser utilizado por las enzimas que oxidan el naftaleno.

**Tabla 27.** Efecto del  $\text{Fe}(\text{SO}_4)\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  sobre la biodegradación de una mezcla Naftaleno-Fenantreno (50 ppm cada uno) por un consorcio de los 2 aislados nativos de *Pseudomonas*.

<b><math>\text{Fe}(\text{SO}_4)\cdot 6\text{H}_2\text{O}</math> en el medio salino (mM)*</b>	<b>%Remoción Naftaleno</b>	<b>%Remoción Fenantreno</b>
<b>0,10</b>	34	>82
<b>0,20</b>	32	>82
<b>0,30</b>	27	>82 máximo

\*Condiciones del cultivo: agitación constante, pH:  $7.0\pm 0.05$  y  $25^\circ\text{C}\pm 2.0$  por 24 horas.

La última mezcla con la que se trabajó fue la de los 4 HAPs (50 ppm cada uno, excepto fenantreno a 100 ppm), la cual se dejó en el medio de cultivo durante 48 horas usando el consorcio de los 2 aislados nativos.

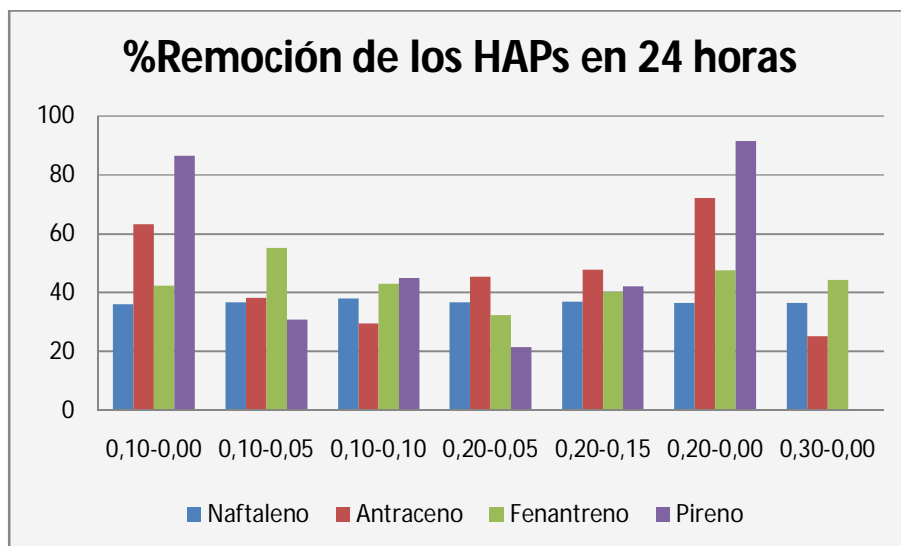
Los resultados fueron analizados por HPLC usando las calibraciones y correcciones por pérdidas abióticas mencionadas (anexo 2 y 8):

**Tabla 28.** Porcentajes de remoción logrados durante la biodegradación simultánea de los 4 HAPs realizada por los 2 aislados nativos de *Pseudomonas spp* en diferentes medios con hierro\*.

<b><math>\text{FeSO}_4\cdot 6\text{H}_2\text{O}</math>- <math>\text{Fe}(\text{NO}_3)_3\cdot 9\text{H}_2\text{O}</math> (mM)</b>	<b>% Remoción Naftaleno</b>	<b>% Remoción Antraceno</b>	<b>% Remoción Fenantreno</b>	<b>% Remoción Pireno</b>
<b>0,10-0,00</b>	36	63	42	86
<b>0,10-0,05</b>	37	38	55	30
<b>0,10-0,10</b>	38	30	43	45
<b>0,20-0,05</b>	36	45	32	21
<b>0,20-0,15</b>	37	48	40	42
<b>0,20-0,00</b>	36	72	47	>92
<b>0,30-0,00</b>	36	25	44	----

\*Datos obtenidos para 50 ppm inicial de cada HAP, excepto fenantreno con 100 ppm,

pH:  $7.0\pm 0.05$  y  $25\pm 2.0^\circ\text{C}$  con agitación por 24 horas



**Figura 22.** Porcentaje de remoción de los HAPs según cantidad Hierro (II)-Hierro (III) en 24 horas.

- Para el naftaleno los resultados fueron muy cercanos para los diferentes medios con  $Fe^{II}$  y  $Fe^{II}$ - $Fe^{III}$  (ver figura 21), de modo que la presencia de hierro no influyó de manera significativa en la biodegradación del naftaleno.
- Por el contrario, se observó un efecto importante en la estimulación de la biodegradación del antraceno (alcanzando alrededor del 72% de remoción del HAP) en el medio de cultivo con 0,20 mM de hierro divalente (ver figura 21).
- Respecto al Fenantreno la mayor remoción (54,91%) fue en el medio con mezcla 0,10-0,05 de hierro. Al comparar con las remociones obtenidas con los otros HAPs de menor masa molecular, se pudo comprobar que fueron más bajas las velocidades de degradación y valores de remoción de estos HAPs.
- El mejor resultado con el pireno (más del 91,50% de remoción) fue con presencia de 0,20 mM de hierro (II) en el medio de cultivo, lo cual difirió de los resultados observados por bioestimulación con  $Fe^{III}$ , aunque la tendencia en la que es mayor la biodegradación para bajas cantidades de  $Fe$  (III) se mantuvo.

#### 4.7 EFECTO DEL TRITÓN X-100 SOBRE LA BIODEGRADACIÓN DE HAPs UTILIZANDO AISLADOS DE *Pseudomonas spp.*

En las Tablas 29 y 30 se muestran los resultados del efecto del tritón X-100 sobre la biodegradación.

**Tabla 29.** Degradación de los HAPs (60 ppm cada uno) para las 2 cepas aisladas de *Pseudomonas spp* con 96 horas en 0,20 mM de  $\text{Fe}(\text{SO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}^*$ .

HAP	Concentración (ppm)	%Remoción
Naftaleno	35	42
Antraceno	8,8	85
Fenantreno	21	65
Pireno	18	70

\*Valores para condiciones de pH  $7.0 \pm 0,05$ ,  $25 \pm 2,0^\circ\text{C}$  y agitación constante.

**Tabla 30.** Efecto del tritón X-100 en la degradación de los HAPs (60 ppm cada uno) para las 2 cepas aisladas de *Pseudomonas spp.* en medio salino con 0,20 mM de  $\text{Fe}(\text{SO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}^*$ .

HAP	Concentración (ppm)	%Remoción
Naftaleno	32	47
Antraceno	6,3	89
Fenantreno	9,8	84
Pireno	4,0	93

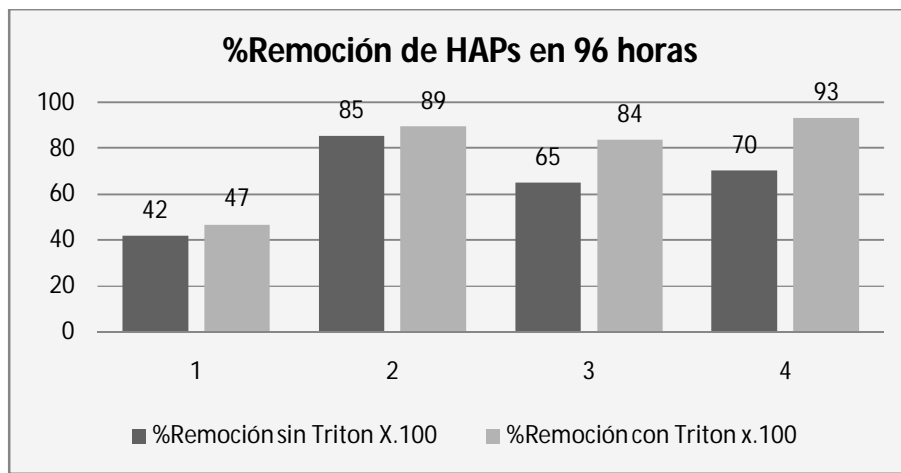
\*Valores para condiciones de pH  $7.0 \pm 0,05$ ,  $25 \pm 2,0^\circ\text{C}$ , 0.1% P/V triton X-100 y agitación constante por 96 horas.

El tritón X-100 aumentó la biodisponibilidad de los HAPs (ver figura 22), aumentando en mayor medida la biodegradación del pireno (1.33) y el fenantreno (1.28).

Estos dos HAPs presentan mayor  $K_{ow}$  con menores pérdidas abióticas (tabla 1), pero por su gran tamaño poseen mejor interacción con las membranas lipofílicas

celulares de las bacterias gracias a la presencia del tritón X-100. Por otro lado, aunque el naftaleno es de menor tamaño molecular, presentó mayor afinidad por el agua y una menor interacción con el tritón X-100, produciéndose un aumento de la remoción de sólo 1,12.

El caso del antraceno fue particular, ya que al poseer la menor solubilidad en agua y mediano tamaño molecular, es mayor su permeabilidad celular y no necesita de un agente permeabilizante, ya que sin presencia del tritón X-100 hubo un alto porcentaje de remoción (85,40%).<sup>11,53</sup>



**Figura 23.** Comparación entre porcentajes de remoción sin y con tritón X-100 para  
1: Naftaleno, 2: Antraceno, 3: Fenantreno y 4: Pireno

## 5. CONCLUSIONES

- ✦ Se aislaron dos cepas nativas de *Pseudomonas sp* desde sitios contaminados (terrenos contaminados con HAPs de la refinería de Barrancabermeja) y no-contaminados con HAPs (Mesa de Los Santos). Los aislados de la Mesa de Los Santos fueron identificados como especies probables de *Pseudomonas cepacia*.
- ✦ En el proceso de biodegradación y crecimiento celular no hubo aumento significativo en la biomasa celular para los medios de cultivo con naftaleno como fuente de carbono. No se produjeron tampoco cambios significativos en el proceso de biodegradación de naftaleno por efecto de la adición de hierro para los aislados *Pseudomonas* ICP-Barranca.
- ✦ Para los aislados nativos de *Ps. cepacia* se observó un incremento notorio del crecimiento celular cuando se usó naftaleno como fuente de carbono en el medio de cultivo, tanto por adición de hierro (II) como de hierro (III), aumentando más del doble la velocidad específica de crecimiento celular en comparación con los medios sin hierro.
- ✦ Se observó un crecimiento celular similar para ambas cepas nativas en el medio de cultivo con antraceno como fuente de carbono, el cual aumentó en presencia del hierro (II) y disminuyó en presencia de hierro (III) respecto al medio de cultivo sin hierro exógeno.
- ✦ La disponibilidad de  $Fe^{III}$  aumentó considerablemente el crecimiento celular en los medios de cultivo con fenantreno y pireno como fuentes de carbono. Los medios de cultivo en los que se presentaron mayores remociones de fenantreno y pireno por separado, fueron aquellos que contenían bajas cantidades de este metal trivalente, mientras que para medios de cultivos con mezclas de HAPs se produjeron mejores resultados con  $Fe^{II}$  en altas concentraciones.
- ✦ Para medios de cultivo con 0,20 mM de hierro (II), el aumento de las biodegradaciones debido al surfactante no iónico tritón X-100 fue más significativo para la remoción del pireno, aumentando la remoción de HAPs

en un factor de 1.33 para pireno, 1.29 para fenantreno, 1.12 para naftaleno y 1.05 veces para el antraceno.

- ✦ Se logró obtener los siguientes porcentajes de biodegradación de los HAPs para cultivos de 24 horas con presencia de  $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y con presencia de  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ :

35-38% de Naftaleno, 50-70% de Antraceno, 40-55% de Fenantreno y 80-90% de Pireno.

## 6. RECOMENDACIONES

- ✦ Identificar los aislados por métodos basados en biología molecular, como por ejemplo la PCR con marcadores moleculares de subunidades ribosomales.
- ✦ Escalar estos procesos de biodegradación en un bioreactor de mayor tamaño para facilitar el control de las condiciones deseadas (temperatura, pH, agitación, tiempo, etc) durante el crecimiento y biodegradación celular de los HAPs.
- ✦ Estudiar las enzimas implicadas e inducidas (estimuladas) durante el proceso de biodegradación por técnicas de proteómica (Electroforesis en 2D y Espectrometría de Masas).
- ✦ Estudiar el metabolismo de biodegradación de HAPs de estos nuevos aislados de *Pseudomonas* por técnicas de HPLC-MS para identificar los metabolitos intracelulares involucrados en el proceso de biodegradación microbiano.
- ✦ Inmovilizar los microorganismos en soportes sintéticos o naturales, como el bagazo de caña, para determinar si hay aumento significativo en la velocidad de biodegradación de los HAPs.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1. Chupungars, K. Rerngsamran, P. Thaniyavarn, S.** Polycyclic Aromatics Hydrocarbons degradation by *Agroclybe* sp. CU-43 and its fluorine transformation. En: *International Biodeterioration & Biodegradation*. Vol. 6 (2008); p. 1-7.
- 2. Sánchez, Fulvia.** Seguimiento mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas de la biodegradación de hidrocarburos aromáticos polinucleares en suelo. Proyecto de grado. Universidad Industrial de Santander. Escuela de Química, 1998.
- 3. ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry).** Reseña Toxicológica de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (en inglés). Atlanta, GA: Departamento de Salud Pública y Servicios Humanos de EE.UU, 1995.
- 4. EPA.** Chemical Hazard Data Availability Study: High Production Volume (HPV) Chemicals and SIDS Testing. Office of Pollution Prevention and Toxics, Washington, 1998.
- 5. Levin, Morris. Gealt, Michael.** Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos. McGraw-Hill. Madrid, España. (1997); p: 3-5, 21-22.
- 6. Perwak, J., M. Byrne, S. Coons, et al.** An Exposure and Risk Assessment for Benzo[a]pyrene and Other Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Volume IV. U.S. EPA, Office of Water Regulations and Standards, Washington, DC. EPA 440/4-85-020-V4, 1982.
- 7. Schauer, Christian. Niessner, Reinhard. Poschl, Ulrich.** Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Urban Air Particulate Matter: Decadal and Seasonal Trends, Chemical Degradation and Sampling Artifacts. En: *Environ. Sci. Technol.* Vol. 37 (2003); p. 2861-2868.
- 8. Soobadar, A. Umrit, G. Kee, K.** Characterization of Organic Pollutants in Sewage Sludge in Sugar Cane fields in Mauritius. En: *Mauritius Sugar Industry Research Institute*, 2002.
- 9. Zhao, H. Wang, L. Ren, J. Li, Z. Li, M. Gao, H.** Isolation and Characterization of phenanthrene-degrading strains *Sphingomonas* sp. ZP1 and *Tistrella* sp. ZP5. En: *Journal of Hazardous Materials*. Vol. 152 (2007); p. 1293-1300.
- 10. Weast, Robert.** Handbook of Chemistry and Physics. 51<sup>st</sup> Edition. CRC Press INC. CA. USA, 1970.

11. **Juansz, A. Naidu, R.** Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo(a)pyrene. En: International Biodeterioration & Biodegradation. Vol. 45 (2000): p. 57-88.
12. **Gustafson, P. Ostman, C. Sallsten, G.** Indoor Levels of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Homes with or without Wood Burning for Heating. En: Environ. Sci. Technol. 42 (14) (2008); p. 5074-5080.
13. **Yun. Y. Guo, H. Wang. Z. Jiang, Y. Liu, Y. Huang, K.** An Integrated Risk Assessment and Intercity Comparison Model of PAHs in Ambient Air of Six Metropolitans in China. En: ISEIS. Vol.5 (2007); p. 27-35.
14. **EPA.** Chemical Hazard Data Availability Study: High Production Volume (HPV) Chemicals and SIDS Testing. Office of Pollution Prevention and Toxics, Washington, DC, 1998.
15. **Lang, C. Tao, S. Liu, W. Zhang, Y. Simonich, S.** Atmospheric Transport and Outflow of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from China. En: Environ. Sci. Technol. Vol. 42 (14) (2008); p. 5196-5201.
16. **Giger, Walter. Blumer, Max.** Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Environment: Isolation and Characterization by Chromatography, Visible, Ultraviolet and Mass Spectrometry. En: Analytical Chemistry. Vol. 46 (12) (1974); p. 1663.
17. **Perwak, J., M. Byrne, S. Coons, et al.** An Exposure and Risk Assessment for Benzo[a]pyrene and Other Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Volume IV. U.S. EPA, Office of Water Regulations and Standards, Washington, DC. EPA 440/4-85-020-V4, 1982.
18. **Schauer, Christian. Niessner, Reinhard. Poschl, Ulrich.** Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Urban Air Particulate Matter: Decadal and Seasonal Trends, Chemical Degradation and Sampling Artifacts. En: Environ. Sci. Technol. Vol. 37 (2003); p. 2861-2868.
19. **Chen, Baoliang. Zhou, Dandan. Zhu, Lizhong.** Transitional Adsorption and Partition of Nonpolar and Polar Aromatic Contaminants by Biochars of Pine Needles with Different Pyrolytic Temperatures. En: Environ. Sci. Technol. Vol. 42(14)(2008); p. 5137-5143.
20. **Reyes, Guillermo.** Contaminación con Hidrocarburos Poliaromáticos en el Estero de Urias, Mazatlán, Sinaloa y sus efectos en camarones. Investigación. Universidad Autónoma de Sinaloa. Facultad de Ciencias del Mar, 2006.

21. Detección de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en los aceites de oliva y en los aceites de orujo de oliva comestibles. Resolución No. RES-1/93-IV/05 del Consejo Oleícola Internacional.
22. **ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry).** Reseña Toxicológica de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (en inglés). Atlanta, GA: Departamento de Salud Pública y Servicios Humanos de EE.UU, 1995
23. **Gammon, M.** Environmental Toxins and Breast Cancer on Long Island. I. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon DNA Adducts. En: Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention. Vol.11 (2002); p. 677-685.
24. **Pérez, Judith. Hernández, Raúl.** Inducción de la fragmentación del DNA por antraceno y Benzo(a)Pireno en Leucocitos polimorfonucleares humanos "in vitro". En: Interciencia: *Revista de ciencia y tecnología de América.* [online] ISSN 0378-1844. Vol. 30 (7) (2005); p. 419-423.
25. **Carballo, Graciela. Ambasch, Germán. Peralta, Nora.** Rojo neutro: Nuestra experiencia de diagnóstico en micosis superficiales en cinco pacientes. En: Rev. Chil. Infectol. [online]. ISSN 0716-1018. Vol. 19 (5) (2002); p. 167-270.
26. **Lozano, Ana. Rovira, Teresa.** Evaluación a escala laboratorio de procesos de eliminación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) en suelos y aguas subterráneas: Integración de procesos de adsorción. Trabajo de grado. Universidad Politécnica de Cataluña. Departamento de Ingeniería Química, 2003.
27. **Constantino J.P., Redmond C.K., Bearden A.** Occupationally Related Cancer Risk Among Coke Oven Workers: 30 Years of Follow-Up. En: JOEM. Vol. 37(1995); p. 597-602.
28. **Hansen E.S.** Cancer incidence in an occupational cohort exposed to bitumen fumes. En: Scand J. Work Environ Health. Vol. 15 (1989); p. 101-105.
29. **Weston, A. Bowman, E. Shields, P. Trivers, G. Poirier, M. Santella, R. Manchester, D.** Detection of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-DNA Adducts in Human Lung. En: Environmental Health Perspectives. Vol. 99 (1993); p. 257-259.
30. **Sasaki, J. Arey, J. Eastmond, D. Parks, K. Grosovsky, A.** Genotoxicity induced in human lymphoblasts by atmospheric reaction products of naphthalene and phenanthrene. En: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. Vol. 393 (1997); p. 23-25.
31. **Dávila, Figueruelo.** Química Física del ambiente y de los procesos medioambientales. Reverté, España (2004). p: 301-915.

- 32. Ames, Bruce. Lee, Frank & Durston, William.** An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens. En: PNAS. Vol. 70 (1973); p. 782-786.
- 33. Phousongphouang, P. Grosovsky, A. Eastmond, D. Covarrubias, M. Arey, J.** The genotoxicity of 3-nitrobenzanthrone and the nitropyrene lactones in human lymphoblasts. En: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. Vol. 472 (2000); p. 93-103.
- 34. Skoog, Douglas. West, Donald.** Fundamentos de Química Analítica. Octava Edición. Thomson, 2003. p. 931-936, 940.
- 35. Organización Consultiva Marítima Intergubernamental.** Contaminación por Hidrocarburos: Convenio Internacional para prevenir la contaminación de las aguas, 1962.
- 36. Bosco, Marta.** Seguimiento cuantitativo de procesos de degradación de contaminantes orgánicos fotosensibles mediante fluorescencia molecular y métodos de análisis de dptos de múltiples vías. Trabajo de grado. Universitat Rovira I Virgili. Departamento de Química Analítica i Química Orgánica, 2007.
- 37. Mascolo, Giuseppe. Ciannarella, Ruggero. Balest, Lydia. Lopez, Antonio.** Effectiveness of UV-based advanced oxidation processes for the remediation of hydrocarbon pollution in the groundwater: A laboratory investigation. En: Journal of Hazardous Materials. Vol.152 (2008); p. 1138-1145.
- 38. Wen, S. Zhao, J. Sheng, G. Fu, J. Peng. P.** Photocatalytic reactions of pyrene at TiO<sub>2</sub>/water interfaces. En: Chemosphere. Vol. 50 (2003); p. 111-119.
- 39. Zang, Shuyan. Li, Peijun. Li. Wenxiu. Zhang, Dong. Hamilton. Andrew.** Degradation mechanisms of benzo[a]pyrene and its accumulated metabolites by biodegradation combined with chemical oxidation. En: Chemosphere. Vol. 67(2007); p. 1368-1374.
- 40. Garoma, T. Gurol, M. Osibodu, O. Thotakura, L.** Treatment of groundwater contaminated with gasoline components by an ozone/UV process. En: Chemosphere. Vol. 73 (2008); p. 825-831.
- 41. García, Jesús.** Los hidrocarburos policíclicos aromáticos asociados a combustibles fósiles: caracterización, análisis y remediación. Ingeniería Química y Combustibles. Trabajo de grado. Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Minas, 2005.

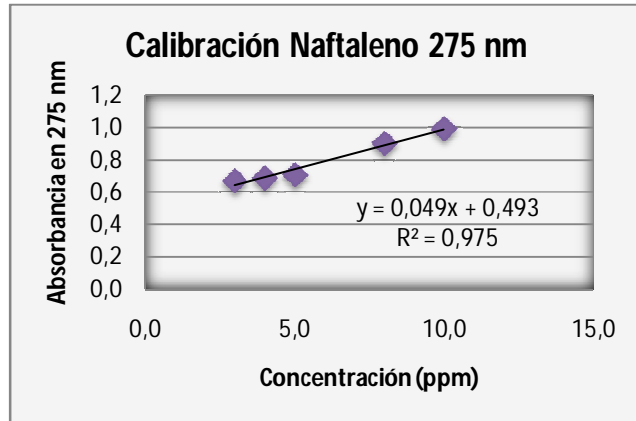
- 42. Madigan, M. Martinka, J. Parker, J. Brock.** Biología de los Microorganismos. 8ª Edición, Prentice Hall. 2003. p. 213-214.
- 43. Ruiz, M. Prieto, J.** Características generales de los microorganismos. Nomenclatura y taxonomía. Departamento de Microbiología, Universidad Complutense de Madrid.
- 44. Todar, Kenneth. The Microbial World.** Departamento de Bacteriología, Universidad de Wisconsin-Madison.
- 45. Santos, E. Jacques, R. Bento, F. Peralba, M. Selbach, P. Sá, E. Camargo, F.** Anthracene biodegradation and surface activity by an iron-stimulated *Pseudomonas* sp. En: Bioresource Technology. Vol. 99 (2008). p. 2644-2649.
- 46. Mrozik, A. Piotrowska-Seget, Z. Labuzek, S.** Bacterial Degradation and Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. En: Polish Journal of Environmental Studies. Vol. 12 (2003). p. 15-25.
- 47. Barriault, D. Sylvestre, M.** Catalytic activity of *Pseudomonas putida* strain G7 naphthalene 1,2-dioxygenase on biphenyl. En: Internacional Biodeterioration & Biodegradation. Vol 44 (1999). p. 33-37.
- 48. Williams, P. Catterall, F. Murray, K.** Metabolism of naphthalene, 2-methylnaphthalene, salicylate, and benzoate by *Pseudomonas* PG: regulation of tangential pathways. En: Journal of Bacteriology. Vol. 127 No. 2 (1975). p. 679-685.
- 49. Valencia, H.** Manual de prácticas de microbiología básica. Universidad Nacional. Bogotá, 2003. p. 59-62. 67-76. 171-180. 194-199. 200-206.
- 50. Bergey, D. Breed, R.** Bergey's Manual of determinative bacteriology. Williams & Wilkins Co. Baltimore, 1957. p. 217-243.
- 51. MSC12001.** Manual de procedimientos técnicos. Laboratorio de biotecnología ICP. Piedecuesta, Santander. 2007.
- 52. Method 1654.** Revision A: PAH Content of Oil by HPLC/UV.
- 53. Avramova, T. Sotirova, A. Galabova, D. Karpenko, E.** Effect of Triton X-100 and rhamnolipid PS-17 on the mineralization of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. cells. En: International Biodeterioration % Biodegradation. Vol. 62 (2008). p. 415-420.
- 54. Instituto Nacional de Salud.** Manual de Procedimientos de Electroforesis para proteínas y ADN. Seria de Normas Técnicas N°38. Lima, 2003.

- 55. Bradford, M.** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of protein-Dye Binding. En: Analytical Biochemistry. Vol 72 (1976). p. 248-254.
- 56. Prácticas de Microbiología Clínica.** Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca. p. 26-30.
- 57. Stainer, R. Ingraham, J.** Microbiología. 2ª Ed. Reverté (1996). p.285.
- 58. Dinkla, I. Gabor, E. Janssen, D.** Effects of Iron Limitation on the Degradation of Toluene by Pseudomonas Strains Carrying the TOL (pWWO) Plasmid. En: Applied and Environmental Microbiology. Vol. 67 No.8 (2001). p. 3406-3412.
- 59. Iwabuchi, T. Harayama, S.** Biochemical and Molecular Characterization of 1-Hydroxy-2-naphthoate Dioxygenase from *Nocardioides sp.* KP7. En: The Journal of Biological Chemistry. Vol. 273. No. 14 (1998). p. 8332-8336.
- 60. Pau, M. Lipscomb, J. Solomon, E.** Substrate activation for O<sub>2</sub> reactions by oxidized metal centers in biology. En: Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol. 104 No. 47 (2007). p. 18355-18362.
- 61. Ensley, B. Gibson, D.** Naphthalene Dioxygenase: Purification and Properties of a Terminal Oxygenase Component. En: Journal of Bacteriology. Vol. 155 No.2 (1983). p.505.511.

## ANEXO 1- Calibraciones en el UV-VIS para los HAP en n-hexano

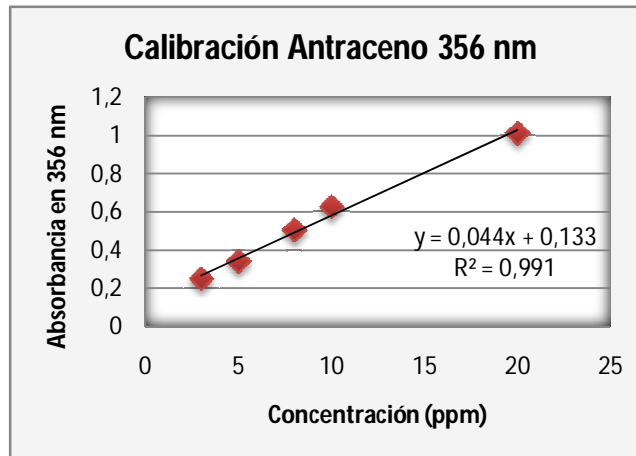
### Datos y gráfica para la calibración del Naftaleno en 275 nm

Concentración (ppm)	Absorbancia a 275 nm
3,00	0,668
4,00	0,686
5,00	0,705
8,00	0,900
10,0	0,991



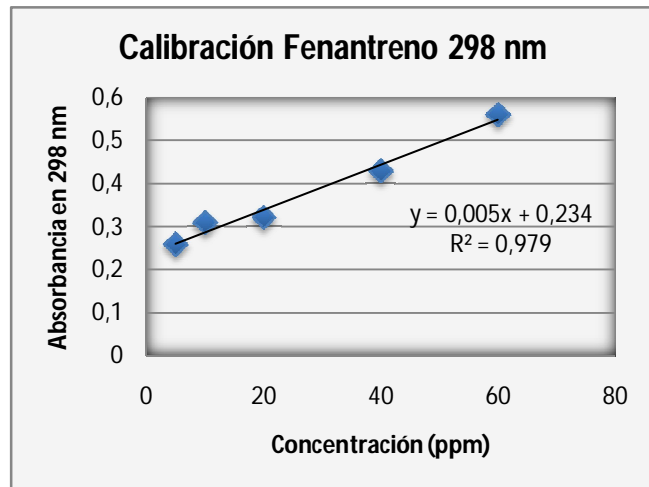
### Datos y gráfica para la calibración del Antraceno en 356 nm

Concentración (ppm)	Absorbancia a 356 nm
3,00	0,249
5,00	0,340
10,0	0,625
8,00	0,503
20,0	1,009



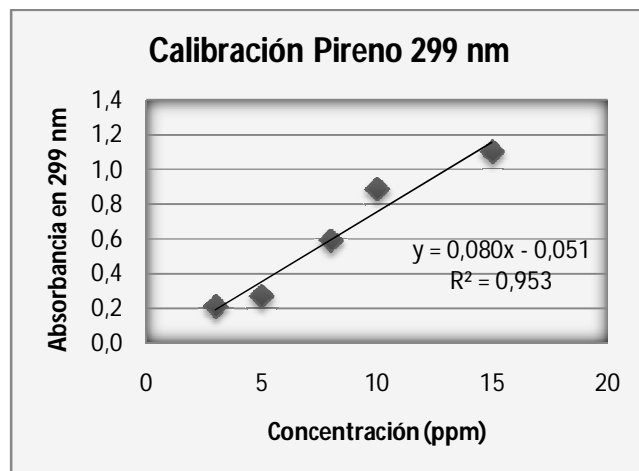
Datos y gráfica para la calibración del Fenantreno en 298 nm

Concentración (ppm)	Absorbancia a 298 nm
5,00	0,258
10,0	0,309
20,0	0,321
40,0	0,429
60,0	0,560



Datos y gráfica para la calibración del Pireno en 299 nm

Concentración (ppm)	Absorbancia a 299 nm
3,00	0,209
5,00	0,268
8,00	0,580
10,0	0,885
15,0	1,100

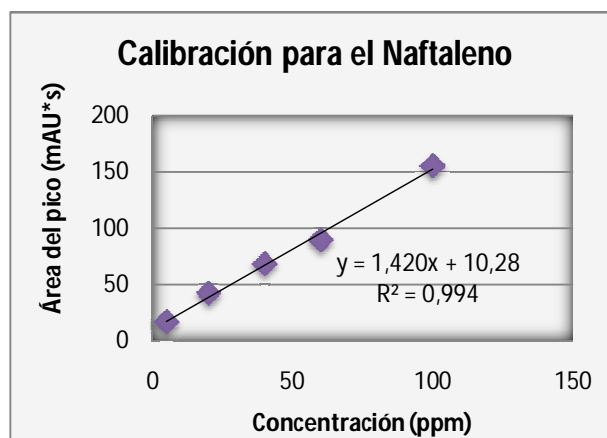


## ANEXO 2. Calibraciones por HPLC-UV en 254 nm para los HAPs en acetoniitrilo

Datos y gráfica para la calibración del Naftaleno por HPLC

Concentración (ppm)	Área del pico (mAU*s)*
5,00	16,51975
20,0	42,11552
40,0	68,10513
60,0	89,27329
100	155,0958

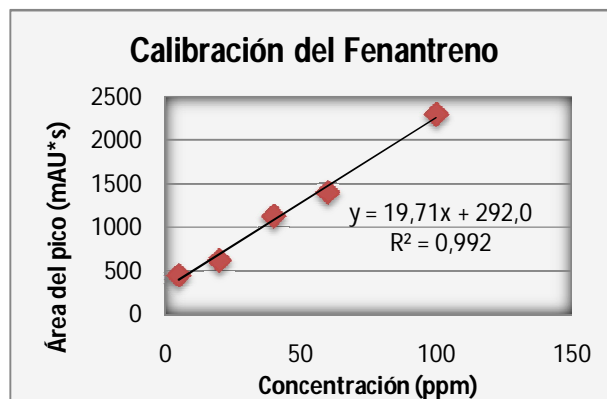
\*t<sub>R</sub>= 12,432-12,560



Datos y gráfica para la calibración del Fenantreno por HPLC

Concentración (ppm)	Área del pico (mAU*s)*
5,00	448,07617
20,0	618,25745
40,0	1128,5227
60,0	1402,6589
100	2298,4246

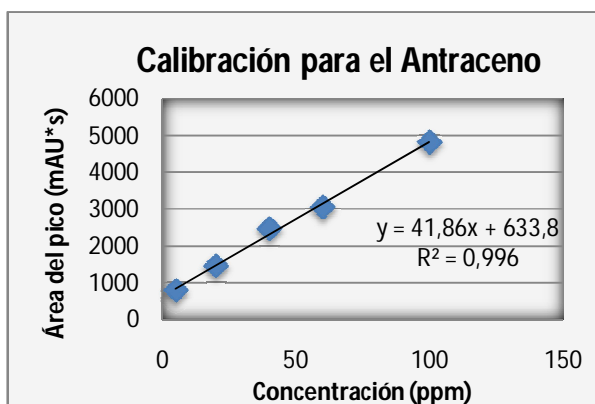
\*t<sub>R</sub>= 14,598-14,654



Datos y gráfica para la calibración del Antraceno por HPLC

Concentración (ppm)	Área del pico (mAU*s)*
5	792,08325
20	1458,2261
40	2469,5808
60	3051,1443
100	4817,9146

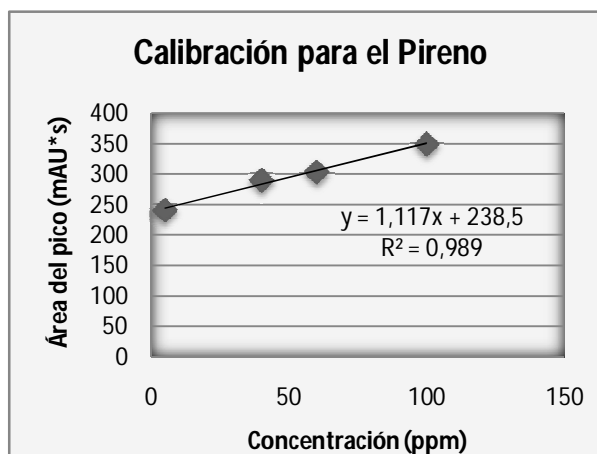
\*t<sub>R</sub>=14,894-14,937



Datos y gráfica para la calibración del Pireno por HPLC

Concentración (ppm)	Área del pico (mAU*s)*
5	240,73743
40	289,98264
60	303,46390
100	348,97025

\*t<sub>R</sub>= 15,919-15,970



**Anexo 3. Cromatograma HPLC/UV a 254 nm para 5,00 ppm de cada HAP estudiado (en orden de elución: naftaleno, fenantreno, antraceno y pireno)**

Data File C:\CHEM32\1\DATA\HIDROCARBUROSMAIRA\002-0201.D  
 Sample Name: 5ppm

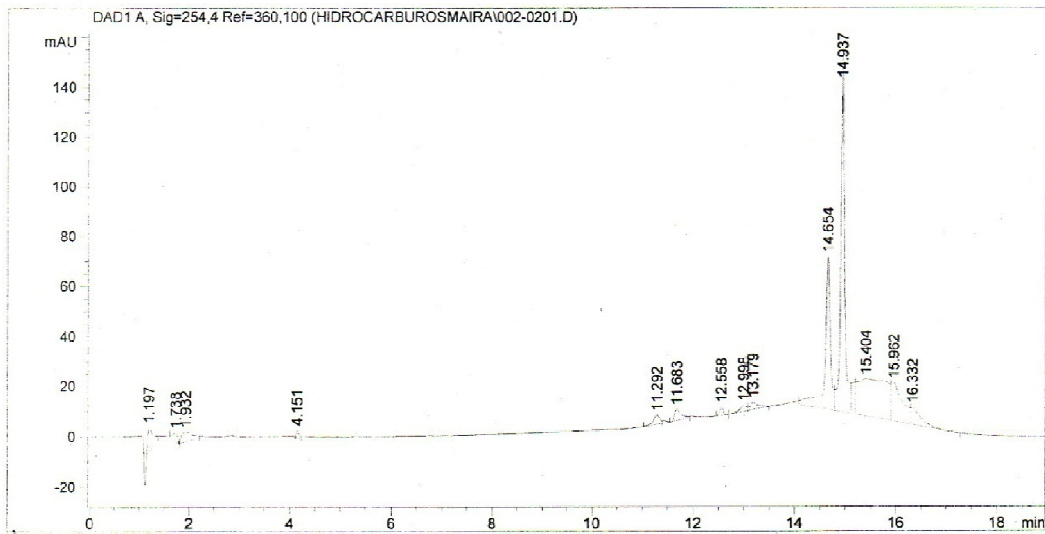
```

=====
Acq. Operator   : maira                      Seq. Line :    2
Acq. Instrument : Instrument 1                Location  : Vial 2
Injection Date  : 21/04/2009 03:29:03 p.m. Inj       :    1
                                           Inj Volume:    1 µl

Acq. Method    : C:\CHEM32\1\METHODS\PAHS.M
Last changed   : 21/04/2009 03:08:04 p.m. by maira
                (modified after loading)

Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\PAHS.M
Last changed   : 21/04/2009 05:00:48 p.m. by maira
                (modified after loading)

Method Info    : Analisis de PAHS
=====
  
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

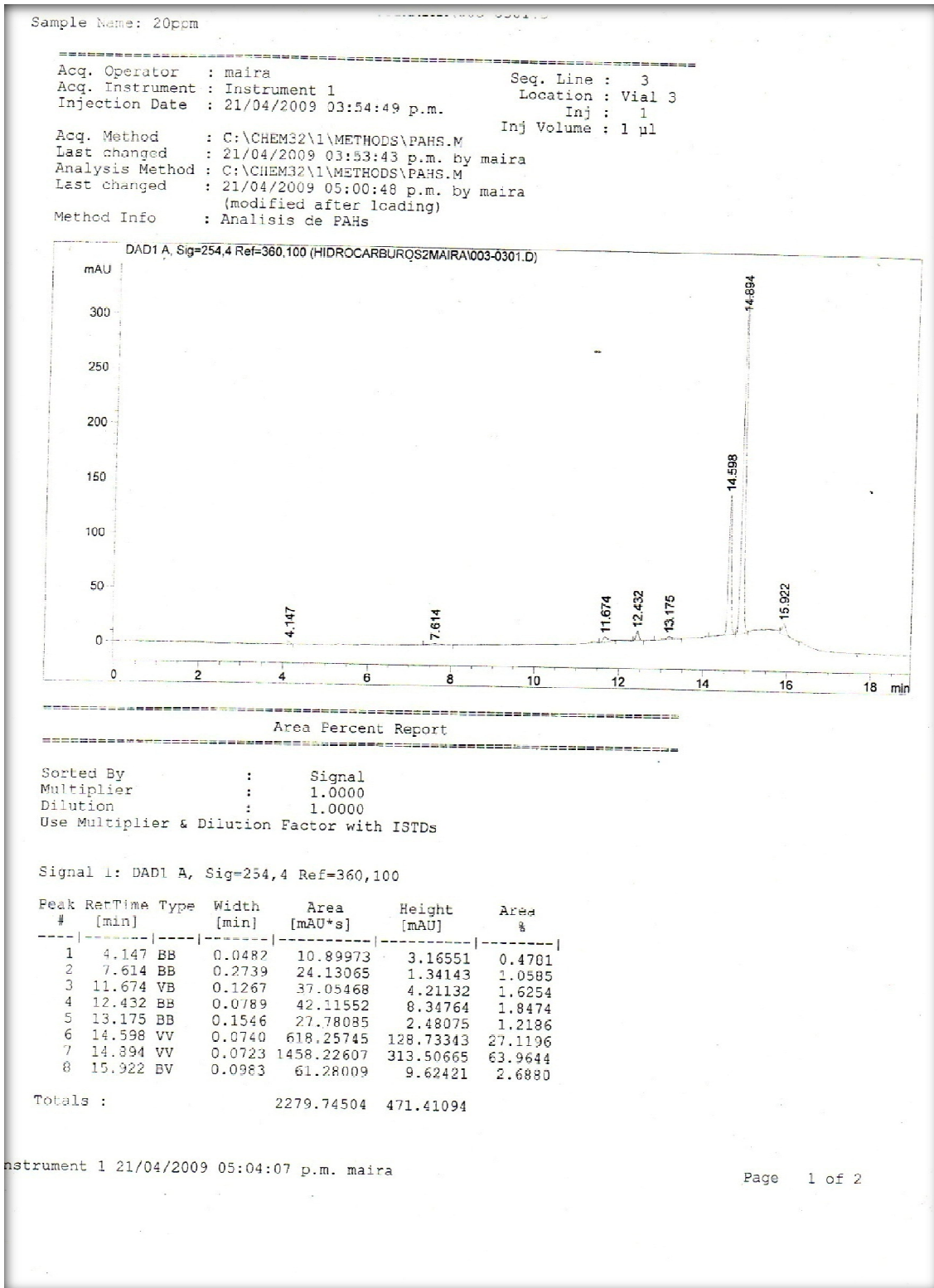
Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.197	BB	0.0847	47.24698	9.39433	1.9096
2	1.738	BV	0.1071	26.04573	3.57078	1.0527
3	1.932	VB	0.1889	58.45882	3.94458	2.3627
4	4.151	BB	0.0473	11.21877	3.32980	0.4534
5	11.292	BV	0.1237	30.12671	3.59693	1.2176
6	11.683	VB	0.1339	41.43480	4.47912	1.6747
7	12.558	BB	0.0746	16.51975	3.40627	0.6677
8	12.998	BV	0.1320	22.68998	2.49765	0.9171
9	13.179	VB	0.1586	35.29772	3.06031	1.4266
10	14.654	BV	0.1053	448.07617	61.26403	18.1099
11	14.937	VB	0.0824	792.08325	143.45131	32.0136

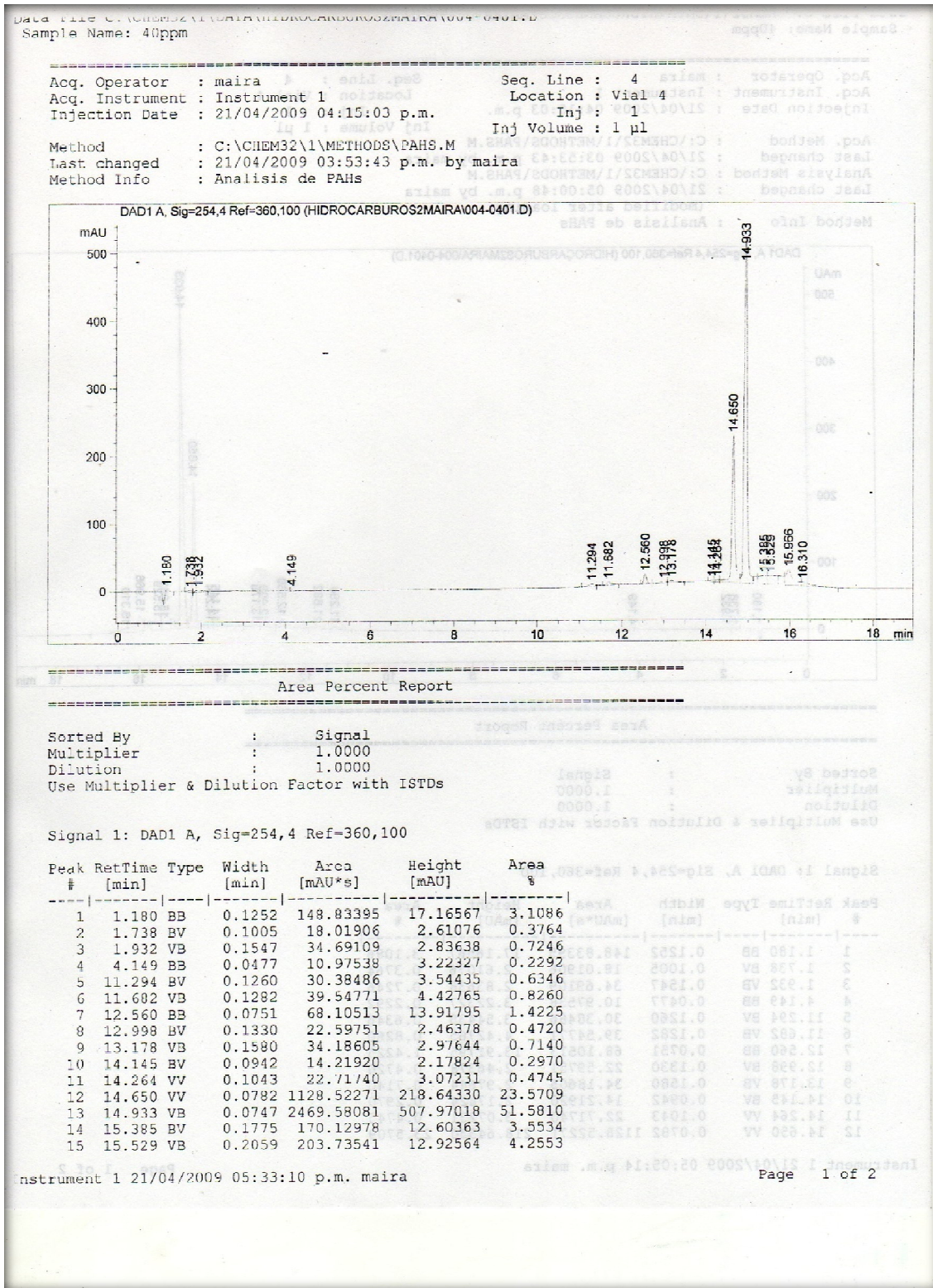
Instrument 1 21/04/2009 05:02:55 p.m. maira

Page 1 of 2

**Anexo 4. Cromatograma HPLC/UV a 254 nm para 20,0 ppm de cada HAP estudiado (en orden de elución: naftaleno, fenantreno, antraceno y pireno)**



**Anexo 5. Cromatograma HPLC/UV a 254 nm para 40,0 ppm de cada HAP estudiado (en orden de elución: naftaleno, fenantreno, antraceno y pireno)**



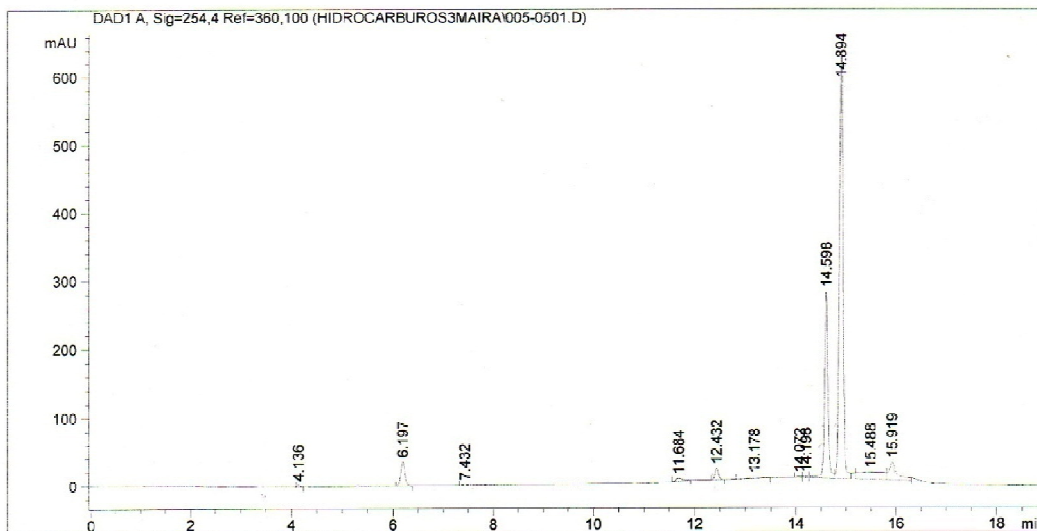
**Anexo 6. Cromatograma HPLC/UV a 254 nm para 60,0 ppm de cada HAP estudiado (en orden de elución: naftaleno, fenantreno, antraceno y pireno)**

Data File C:\Chem32\1\DATA\HIDROCARBUROS3MAIRA\005-0501.D  
 Sample Name: 60ppm

```

=====
Acq. Operator   : maira                      Seq. Line :    5
Acq. Instrument : Instrument 1                Location  : Vial 5
Injection Date  : 21/04/2009 04:55:21 p.m. Inj       :    1
                                           Inj Volume: 1 µl

Sequence File   : C:\CHEM32\1\SEQUENCE\PAHS.S
Method          : C:\CHEM32\1\METHODS\PAHS.M
Last changed    : 21/04/2009 03:53:43 p.m. by maira
Method Info     : Analisis de PAHs
=====
  
```



=====  
 Area Percent Report  
 =====

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

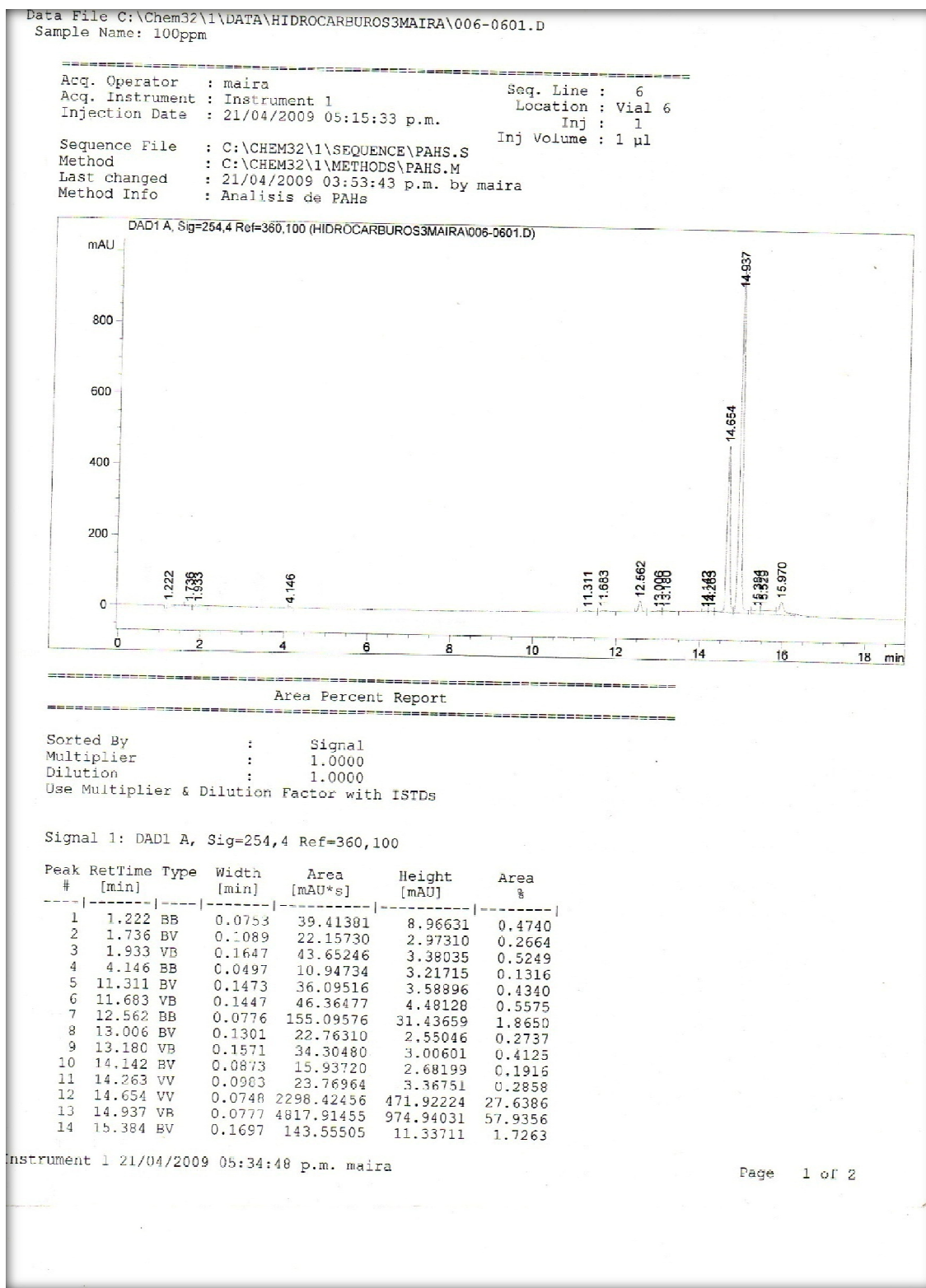
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	4.136	BB	0.0480	9.87788	2.87900	0.1768
2	6.197	BB	0.0937	216.32414	36.20181	3.8718
3	7.432	BB	0.0889	11.70421	2.04022	0.2095
4	11.684	BB	0.1279	37.80021	4.24456	0.6766
5	12.432	BB	0.0790	89.27329	17.65456	1.5978
6	13.178	BB	0.1743	34.74955	2.69667	0.6220
7	14.072	BV	0.0945	12.58306	1.91959	0.2252
8	14.198	VV	0.0992	19.20028	2.75972	0.3436
9	14.598	VV	0.0774	1402.65994	275.31998	25.1049
10	14.894	VB	0.0749	3051.14429	626.08209	54.6096
11	15.488	BV	0.4331	398.41122	11.14433	7.1308
12	15.919	VB	0.1560	303.46390	26.81558	5.4314

Totals : 5587.19098 1009.75811

Instrument 1 21/04/2009 05:14:35 p.m. maira

Page 1 of 2

**Anexo 7. Cromatograma HPLC/UV a 254 nm para 100 ppm de cada HAP estudiado  
(en orden de elución: naftaleno, fenantreno, antraceno y pireno)**



**ANEXO 8.** Datos de las pérdidas abióticas para cada HAP en 24 horas\*.

<b>HAP</b>	<b>Área del pico (mAU*s)</b>	<b>Concentración remanente (ppm)</b>	<b>Pérdida abiótica (ppm)</b>
<b>Naftaleno</b>	55,522900	31,87	28,13
<b>Fenantreno</b>	1396,3276	56,03	3,970
<b>Antraceno</b>	3947,4499	57,66	2,340
<b>Pireno</b>	305,79617	59,93	0,070

\*60 ppm de concentración inicial, pH: 7.0±0.05, 25°C±2.0 y agitación constante.