# CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

## 1.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

La biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos, con la utilización de bacterias degradadoras exige una exhaustiva investigación de los parámetros óptimos de crecimiento de dichos organismos para el mejoramiento de los procesos de adaptación en campo de los cuales dependerá la eficiencia de la técnica.

## 1.2 JUSTIFICACIÓN

Las piscinas abandonadas por la empresa TEXACO, causan contaminación al agua subterránea, a las aguas superficiales (ríos, riachuelos, bebederos, vertientes), alejamiento y disminución de la flora y fauna nativa; afectando además la salud de las poblaciones locales (PEPDA, 2006).

PEPDA realiza un proceso de biorremediación, mediante la técnica de biopilas y landfarming en la cual se utiliza un fermentador biológico (BioFlo 5000 marca New Brunswick), donde se cultivan masivamente los microorganismos previamente aislados, formando un consorcio encargado de degradar los hidrocarburos presentes en el suelo.

Un estudio cinético individual de las miembros de un consorcio bacteriano a nivel de laboratorio, determina cuales son las condiciones óptimas de crecimiento, de cada cepa aislada sin la interacción de otras, lo que con la ayuda de pruebas de antagonismo, contribuyen a la selección de las mejores cepas en el consorcio y posteriormente una nueva conformación del mismo de ser necesario.

El estudio del consorcio a nivel de laboratorio ayuda a la obtención de datos de crecimiento entre cepas que están interactuando y que más adelante serán responsables del proceso de degradación.

Los consorcios integrados por bacterias nativas que crecen en un suelo con las mismas condiciones tienen ventajas en términos de adaptabilidad a los factores de crecimiento como la competencia por los nutrientes (Bulock J., Kristiansen, B. 1987).

Al hacer un estudio cinético de cada uno de los miembros de un consorcio nativo, las condiciones cardinales (mínima, óptima y máxima) tanto del pH, temperatura y concentración de oxígeno, tendrían puntos de relación entre cada una de las cepas, haciendo posible aplicar las condiciones individuales tanto de las cepas como del consorcio determinadas a nivel de laboratorio, en el posterior crecimiento del consorcio en el biofermentador.

Otro aspecto importante es la contribución al mejoramiento de la eficiencia del fermentador ya que brinda información acerca de las condiciones óptimas aplicables, en las cuales los microorganismos pueden desarrollarse y adaptarse de mejor manera cuando sean llevados al campo para cumplir con el proceso de degradación.

Adicionalmente, los datos obtenidos en este estudio significaran, a futuro, una mejora en el manejo de recursos disponibles para el proceso de degradación, además una disminución del tiempo requerido para la producción de inóculo, lo que hará que el proceso de biorremediación, por ende, se acorte dando como resultado un beneficio económico para la empresa.

El ámbito social, definitivamente importante en la realización de este tipo de procesos, será beneficiado ya que la población adyacente al proyecto podrá evidenciar la disminución de tiempo, lo que les brindará confianza y apoyo hacia los promotores del mismo.

## 1.3 OBJETIVOS

### 1.3.1 Objetivo General

- Determinar la Cinética bacteriana de cinco cepas degradadoras de hidrocarburos y su consorcio, en diferentes condiciones de pH y temperatura, a nivel de laboratorio y biofermentador para la producción piloto semindustrial.

### 1.3.2 Objetivos Específicos

1. Realizar pruebas de antagonismo entre las cepas previamente aisladas.

2. Establecer los parámetros óptimos de temperatura y pH para el crecimiento bacteriano individual y del consorcio a nivel de laboratorio.

3. Ensayar los parámetros de pH y temperatura, obtenidos a nivel de laboratorio en el biofermentador para el consorcio.

4. Comprobar la presencia individual en el tiempo de las cepas en el consorcio.

5. Comparar el rendimiento en el biofermentador del crecimiento del consorcio en las condiciones óptimas obtenidas en el laboratorio, con el rendimiento bajo las condiciones de operación anteriores.

## 1.4 MARCO TEÓRICO

### 1.4.1 Bacterias degradadoras de hidrocarburos

Existe una gran variedad de microorganismos identificados en la degradación de compuestos derivados del petróleo. Interesantemente, casi todos son eubacterias, aunque en algunos casos se encontraron arqueobacterias y eucariotes (Valderrama y Téllez-Sosa, 2000).

Aunque no han sido caracterizados en su totalidad, muchos de estos microorganismos poseen actividades de peroxidasas y oxigenasas, que permiten la oxidación más ó menos específicas de algunas fracciones del petróleo. Esta oxidación cambia las propiedades de los compuestos, haciéndolos susceptibles de ataques secundarios y facilitando su conversión a bióxido de carbono y agua. En algunas ocasiones no es necesario llegar a la mineralización, sino que basta una oxidación para disminuir notablemente su toxicidad o aumentar su solubilidad en agua, incrementando su biodisponibilidad (Vazquez & Duhalt, 2000).

Para entender la capacidad de estos microorganismos para degradar compuestos a los que nunca han estado es expuestos hay que tener en consideración que para cualquier organismo (inclusive para los humanos) lo más importante es reproducirse y perpetuar sus genes, por lo que cualquier condición ambiental o nutricional que reduzca su probabilidad de reproducirse despertará una reacción inmediata a nivel metabólico y, en segunda instancia, a nivel genético (Valderrama y Téllez-Sosa. 2000)

Algunas de las estrategias que se han observado en respuestas de este tipo de retos son:

**1.-Reclutamiento.** Cuando un organismo se encuentra ante una condición ambiental completamente desconocida de manera abrupta sólo puede utilizar lo que ya tiene. Es decir, que puede explotar alguna actividad enzimática existente para degradar un compuesto nuevo y sobrevivir al reto. Ejemplo de esto es la utilización de enzimas dedicadas a la degradación de lignina (un componente de la corteza de los árboles) para degradar HPAs por algunos hongos (Barr & Aust, 1994; Bezalel, Hadar & Cerniglia, 1996).

**2.-Transferencia horizontal**. En base a los estudios realizados por Davison (1999) sabemos que es común entre bacterias la incorporación de material genético de organismos similares por medio de mecanismos celulares de transferencia (conjugación), pero también pueden incorporarlo de organismos distantes e inclusive completamente diferentes por medio de virus (transducción) o directamente del medio (transformación).

El material genético incorporado puede integrarse al de la bacteria, el mismo que enriquece su repertorio metabólico con nuevas funciones, entre las que se incluyen aquellas que le permitan degradar compuestos xenobióticos. Un ejemplo de esto es la transferencia en suelo de los genes para degradar fenol entre diferentes especies de *Pseudomonas* (Peters, et al., 1997).

Las bacterias utilizadoras del petróleo están muy extendidas; pueden aislarse de todos los suelos de cultivo, bosques o praderas. Además, la capacidad de utilizar el petróleo como fuente energética no está limitada a unos pocos microorganismos, si no que se da a numerosos hongos y bacterias. Muchos microorganismos tienen hidrocarburos y son sintetizados continuamente por bacterias y plantas; pertenecen aparentemente a las sustancias céreas, que cubren las hojas de las plantas. (Hangs, 1972).

### 1.4.2 Principales Géneros

#### 1.4.2.1 Pseudomonas

Las bacterias del grupo al que pertenecen *Pseudomonas* está constituido por microorganismos Gram-negativos, siempre móviles con flagelación polar. Se encuentran normalmente en el suelo, aunque pueden ser patógenos oportunistas en animales (*Ps. aeruginosa)* y patógenos de plantas como *Ps. syringae* (Todar,2000).

Su metabolismo es siempre respiratorio, o bien aerobio (la mayoría usa como aceptor de electrones $O_2$) o anaerobio (algunos usan $NO^-$). Presentan una versatilidad metabólica muy grande que se traduce en su capacidad de utilizar como fuente de carbono substratos muy variados (hay especies, como *Ps. cepacia*, que pueden utilizar como nutrientes más de 100 compuestos químicos diferentes). Por otra parte, hay algunos individuos del grupo que son quimiolitotrofos usando $H_2$ o CO como donadores de electrones (Todar, 2000).

El metabolismo central de azúcares en este grupo se desarrolla por la vía de Etner-Doudoroff, y disponen de un ciclo de Ácidos Tricarboxílicos normal.

Algunas *Pseudomonas* por ejemplo *Ps. aeruginosa* son capaces de llevar a cabo procesos de desnitrificación ($NO_3^-$, $NO_2^-$, $N_2$) con lo que se empobrecen los suelos de nitrógeno utilizable desde el punto de vista agrícola. El proceso de reducción del nitrógeno (que actúa como aceptor de electrones en un proceso de respiración anaerobia) se denomina reducción disimilatoria del nitrógeno (Todar, 2000).

La versatilidad metabólica del grupo se debe a la presencia de un gran número de plásmidos que contienen operones inducibles para la síntesis de enzimas específicas que permitan catabolizar los compuestos presentes en el medio. Lo confiere una importancia grande a las bacterias del género *Pseudomonas* como digestores aerobios de materiales animales y vegetales, lo que contribuye al reciclaje biológico de materia orgánica (Todar, K.,2000).

Algunas bacterias producen pigmentos fluorescentes de colores amarillo-verdosos fácilmente solubles en agua. Dichos pigmentos actúan como sideróforos: moléculas cuya función es capturar el hierro del medio necesario para el metabolismo del microorganismo (Todar, 2000).

El grupo de las *Pseudomonas fluorescens* son bacterias saprofitas no patógenas que también producen un pigmento, particularmente bajo condiciones de disponibilidad baja del hierro. El pigmento soluble, verdoso, fluorescente, lo que condujo al nombre de grupo. Presentan flagelos polares múltiples que asistan a su movimiento. Porque tienen requisitos alimenticios simples, "crecen bien en los medios de las sales mineral suplidos con cualesquiera de una gran cantidad de fuentes del carbón" (GAMA, 2000). Se investiga la explotación de *P. fluorescens* para la degradación parcial o total de agentes contaminadores tales como estireno, TNT e hidrocarburos aromáticos policíclicos. Varias cepas de estas bacterias también tienen la capacidad de suprimir enfermedades de plantas "protegiendo las semillas y las raíces contra la infección fungicida" (GAMA,2000).

Esta capacidad es debido a los metabolitos secundarios producidos por estas bacterias tales como antibióticos, y cianuro de hidrógeno también como la capacidad de estas bacterias de colonizar rápidamente la rizosfera y competir con algunos patógenos (GAMA,2000).

#### 1.4.2.1.1 Ecología

Las bacterias *Pseudomonas* pueden ser encontradas en suelo, pantanos, hábitats marinos costeros, y el tejido fino de las plantas y animales; generalmente, estas bacterias pueden tolerar una variedad de condiciones físicas. Algunas de estas especies, tales como *Pseudomonas aeruginosa* son patógenos oportunistas. Los pacientes de la fibrosis enquistada, las víctimas de quemaduras, la gente con cáncer, y los pacientes que están en las unidades de cuidado intensivo por períodos de tiempo extendidos están expuestos a un posible riesgo de contraer una enfermedad causada por una infección de *P.aeruginosa* (GAMA, 2000)

#### 1.4.2.1.2 Su aplicación como agentes descontaminantes ambientales

La gran versatilidad metabólica de las bacterias del género *Pseudomonas* las han hecho candidatas para el tratamiento de contaminaciones ambientales producidas por la acumulación de metales pesados o por la acumulación de compuestos xenobióticos (Todar, 2000).

Varias especies de *Pseudomonas* contienen plásmidos en los que se encuentran codificadas enzimas capaces de degradar, al menos parcialmente, compuestos orgánicos derivados del petróleo o compuestos organoclorados u organofosfatados. Estas enzimas suelen ser inducibles y la selección de las cepas adecuadas puede permitir reducir los niveles de contaminación por estos compuestos xenobióticos (Todar, 2000).

La biodegradación de hidrocarburos y de otros compuestos orgánicos es realizada con eficiencia variable dependiendo de la estructura del hidrocarburo (lineal o ramificado, alifático o aromático) y de la presencia de átomos substituyentes. Algo similar ocurre con la biodegradación de compuestos insecticidas, herbicidas y detergentes y emulgentes (Todar, 2000).

Por otra parte, el tratamiento de la contaminación originada por la acumulación de metales pesados también es posible mediante la utilización de bacterias de este género. El efecto tóxico de los metales pesados suele estar asociado a la presencia de formas ionizadas (cationes) de los metales en cuestión. Ciertas bacterias de este género presentan enzimas capaces de reducir los cationes metálicos a las formas neutras que son mucho menos tóxicas. Los operones que controlan la producción de estos enzimas reductores suelen ser inducibles por la presencia del metal pesado (GAMA, 2000).

#### 1.4.2.2 Aeromonas

Las características del género refieren que son bacilos cortos 0.3-1.0 x 1.0-3.5 µm, Gram-negativos, todas las especies excepto *Aeromonas salmonicida* y *Aeromonas media* son móviles gracias a un flagelo polar, son aerobios facultativos, oxidasa y catalasa positivos, reducen nitrato a nitrito y fermentan la D-glucosa como fuente principal de carbono y energía.

Pueden crecer en medios que contienen 3% de NaCl, pero no en 6%. Los miembros de este género producen varias exoenzimas como: proteasas, DNasas, RNasas, elastasas, lecitinasas, amilasas, gelatinasas y lipasas, entre otras, muchas de ellas consideradas factores de virulencia (Altwegg, 1999).

Las *Aeromonas* se pueden dividir en dos grandes grupos en base a la temperatura óptima de crecimiento y la capacidad de movilidad de las especies. El primer grupo es amplio y heterogéneo genéticamente y está formado por especies mesófilas y móviles que crecen óptimamente a 28ºC. El segundo es un grupo más reducido y homogéneo genéticamente, se designa como el grupo psicrófilo cuya temperatura óptima de crecimiento se define entre 22-25ºC, está constituido por una sola especie: *Aeromonas salmonicida* y de ésta se han reportado cinco subespecies: *A. salmonicida* ssp. *salmonicida, A. salmonicida* ssp. *masoucida, A. salmonicida* ssp. *achromogenes, A. salmonicida* ssp. *smithia* y *A. salmonicida* ssp. *Pectinolytica* (Pavan, 2000).

#### 1.4.2.2.1 Ecología

El género *Aeromonas* se reconoce desde hace más de 100 años como patógeno de reptiles y de otros animales de sangre fría (poiquilotermos); sin embargo, en los años 70 los miembros de este género se consideraron enteropatógenos y causantes de infecciones cutáneas y diseminadas (infecciones de heridas, septicemia, mionecrosis, meningitis, peritonitis, endocarditis) principalmente en personas inmunodeprimidas pero también en pacientes sin deficiencias inmunológicas aparentes (Janda, 2001).

Dichos microorganismos considerados autóctonos del medio acuático se encuentran ampliamente diseminados en hábitats naturales como suelo, agua potable, aguas negras, aguas contaminadas, ríos, lagos y mar (Borrell, Figueras y Guarro, 1998). Lo que es significativo, ya que se han descrito varios casos de infecciones primarias o secundarias de heridas superficiales o cutáneas después del contacto con agua contaminada con *Aeromonas* (Janda, 1991; 1998, 2001).

Las manifestaciones clínicas de las infecciones cutáneas son muy variables desde una celulitis moderada a una mionecrosis masiva fulminante (Joseph et al., 1979). Un hecho de trascendencia es que *Aeromonas* se ha aislado en aguas potables cloradas o no cloradas e incluso en aguas embotelladas (Kühn et al., 1997).

La mayoría de los sistemas de tratamiento de agua potable son capaces de reducir la concentración de *Aeromonas* por debajo de 1UFC/ 100 mL (Pettibone, 1998; Massa et al., 1999) no obstante, cuando los niveles de materia orgánica aumentan se inactivan los niveles de cloro y estas bacterias pueden crecer e incluso colonizar los sistemas de abastecimiento, formando biofilms. En el agua tratada, pueden llegar a alcanzar concentraciones de 103 UFC/100 ml (Massa et al., 1999).

El aislamiento del género *Aeromonas* de muestras de agua depende de diversos factores, algunos de ellos son: la estación del año, la concentración de materia orgánica, el oxígeno disponible, los niveles de cloro y la salinidad (McClure, Cole & Davies, 1994).

### 1.4.2.3 Burkholderia

Hasta 1980, *Burkholderia cepacia* (B.c) previamente, *Pseudomonas cepacia*, P *multivorans, P kingii*, fue conocida como una fitopatógena por Burkholder en 1950 causante de la pudrición suave en la cebolla. En 1992 en base al análisis de secuencias 16 de los RNA- ribosonales (rRNA), la homología DNA-DNA, lípidos celulares, composición de ácidos grasos en la membrana celular y las características fenotípicas descritas (Balandrau et al., 2001; Marín et al., 2001).

En 1980 se reportó la multiresistencia de Bc aislada de pacientes inmunocomprometidos, con ataque preferencial sobre sus pulmones. El primer caso se conoció al iniciar los setenta e incluso, se le asoció con pneumonía y septicemia derivada de problemas en las vías respiratorias. A las infecciones causadas por esta bacteria se les llamó el "síndrome de Burkholderia cepacia" (Govan y Deretic, 1996).

Por los problemas de salud señalados en humanos se impuso en Estados Unidos de Norteamérica (EUA) en 1999. Una moratoria a la aplicación de productos de Bc, para controlar enfermedades de la raíz en plantas por el peligro el potencial de esta bacteria, para causar enfermedades respiratoria en el hombre (Balandreau et al., 2001). Lo cual llevó a la necesidad de investigación sobre las características fisiológicas diferenciales de Bc aislada, de pacientes con fibrocis cística y de Bc de productos agrícolas que se aplican en el campo para diversos fines: romoción y protección de plantas.

Por ello se señalan diferencias críticas entre ambos tipos de Burkholderia, ya que mientras la Bc clínica no supervive en el suelo, ni colonizan tejidos vegetales; posee propiedades de virulencia genética, lo cual le permite invadir tejido pulmonar humano (Coenye et al., 2001).

A nivel de un simple diagnóstico de laboratorio, no se detectan diferencias bioquímicas entre estos tipos de *Burkholderia*. Si se realiza el análisis molecular fino es posible separar una Bc de origen clínico, de la que se encuentra en las plantas (Balandreau et al., 2001; Coenye, et al., 2001).

Otros aspectos que se consideran de interés en Bc, además de la salud y el ambiente. Es su capacidad para eliminar compuestos tóxicos y recalcitrantes en el suelo y el agua. Lo que conduce a que la investigación en ecología microbiana, proponga estrategias para que su potencial de biorremediación, se utilice en la eliminación de una numerosa lista de hidrocarburos que contaminan suelos, agua y el aire. En contraste con los inconvenientes de su peligro potencial para la salud humana (Dobereiner, 1993; Dimock et al., 1989).Con lo antes expuesto es evidente que Bc tiene una de las características esenciales para su explotación en la naturaleza: su capacidad de colonizar y dominar diversos ambientes (Coenye et al., 2001).

La especialización de *Burkholderia* no parece ser es una característica fisiológica general, si no más bien la excepción. Lo cual es lógico si se considera que la vida microbiana en la naturaleza es complicada y que se requiere de una flexible capacidad de adaptación a diversos retos del ambiente, como los causados por compuestos tóxicos y recalcitrantes (Estrada de los Santos et al., 2001). En el caso de *Burkholderia* se sugiere que el enfoque que se ha dado al comportamiento de esta bacteria, es más resultado de una mínima investigación realizada, que de hechos reales, tal y como se supone sucede en la naturaleza.

### 1.4.2.4 Bacillus

Los bacilos en general están clasificados dentro de los microorganismos aeróbicos o facultativos y productores de catalasa. Tienen un DNA (mol% G+C) de 32 - 8. Pueden ser Gram positivos o Gram variables, en general producen endosporas o sea esporas que se forman dentro de la célula (BIOBAC-AG, 2006**).**

#### 1.4.2.4.1 Características del género *BacilIus*

Las características generales del género *Bacillus* son:

-Producen endosporas, las que son termoresistentes y también resisten a agentes perjudiciales como la desecación, la radiación, los ácidos y los desinfectantes químicos (BIOBAC-AG, 2006**).**

-Muchos bacilos producen enzimas hidrofílicas extracelulares que descomponen polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, permitiendo que el organismo emplee estos productos como fuentes de carbono y donadores de electrones. Muchos bacilos producen antibióticos y son ejemplos de estos la bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina y circulina ( BIOBAC-AG, 2006**).**

-Los bacilos en general crecen bien en medios sintéticos que contienen azúcares ácidos orgánicos, alcoholes, entre otros, como las únicas fuentes de carbono y el amonio como única fuente de nitrógeno ( BIOBAC-AG, 2006**).**

-Viven dentro de los límites de temperatura de 55 a 70°C, el límite inferior de pH para *Bacillus* es de 2 a 3 ( BIOBAC-AG, 2006**).**

#### 1.4.2.4.2 Bacillus megaterium

Las características de *Bacillus megaterium* son:

- son bacterias gram positivas,
- son mesófilas,
- producen esporas ovales o cilíndricas,
- son bacterias fermentativas, usualmente hidrolizan caseína y almidón,
- los esporangios no son hinchados,
- la pared de la espora es delgada

### 1.4.3 Cinética Microbiana

Después de la inoculación de una porción de medio con unas pocas células, transcurre un período de tiempo (fase de latencia) antes de que se establezca una velocidad constante de crecimiento, debido a que el microorganismo tiene una intensa actividad metabólica para adaptarse al nuevo medio de cultivo antes de poder duplicarse. Cuando el cultivo alcanzó una velocidad constante de crecimiento se dice que está en la fase exponencial debido a que el número de células se puede expresar como función de 2**n**, donde n es el número de ciclos de duplicación experimentado por la población (Rose, 1977).

Una bacteria originará cuatro células después de dos ciclos, dieciséis después de cuatro ciclos, y así sucesivamente. Cada célula de bacteria o levadura da, por escisión o gemación, dos células y el número inicial Xo de células (en el instante to=0) se convierte, después de n generaciones en un tiempo t, en X = Xo. 2n

Como n representa el número de divisiones celulares durante el intervalo de tiempo t, el tiempo de generación g = t/n, y X = Xo.2t/g o sea ln X = ln Xo + t.ln 2/g *.

El término ln 2/g es la velocidad específica de crecimiento (m) de la población o sea m= 0,69/g.

La ecuación * puede escribirse bajo la forma lnX - lnXo = m.t por lo tanto X = Xo.emt y dX/dt = mX

En el curso de la fase exponencial la velocidad específica de crecimiento alcanza su valor más elevado (µmáx).

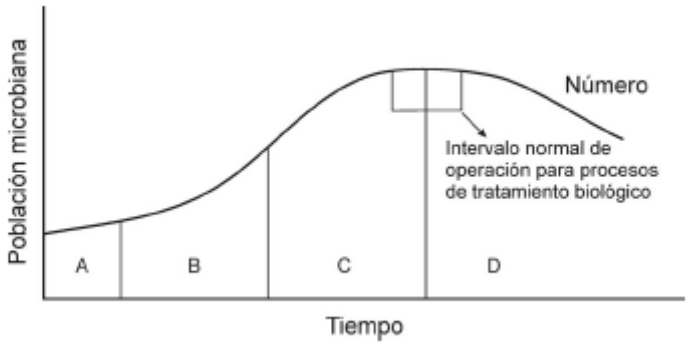



Figura.1.1 Curva del Crecimiento bacteriano A. Fase de latencia, B. Fase exponencial, C. Fase estacionaria y D. Fase de muerte (Henry, 1999).

En condiciones ideales el tiempo de generación de las bacterias puede ser de 20 minutos, así una única célula producirá 2.097.152 bacterias al cabo de 7 horas.

Finalmente el cultivo entra en la fase estacionaria del crecimiento, en la que permanece constante el número de células. Dicha fase puede durar mucho tiempo, por ejemplo décadas en el caso de las bacterias endosporuladas, pero siempre será seguida, más temprano o más tarde, por la fase de muerte (Rose, 1977).

#### 1.4.3.1 Influencia del pH

El pH del medio puede influir sobre la expresión de genes y regular el transporte de protones, la degradación de los aminoácidos, la adaptación a condiciones ácidas o básicas y aún la virulencia. Las células perciben los cambios del pH en su hábitat a través de diferentes mecanismos. La protonacíón y desprotonación de los aminoácidos inducida por el pH, puede alterar la estructura proteínica secundaria y por lo tanto la función que señala el cambio. La célula puede responder sólo a una de las formas de las moléculas de señal. Por ejemplo, los ácidos orgánicos atraviesan la membrana citoplasmática solamente en la forma protonada y un aumento en la concentración intracelular indicaría un incremento en la acidez ambiental. El gradiente de protones a través de la membrana puede servir, por sí mismo, como un sensor para ajustar los procesos dependientes de la energía (Saier, 1997).

El pH intracelular puede ser mantenido sobre un valor crítico en el cual las proteínas internas se desnaturalizan irreversiblemente. En *Salmonella typhimurium* hay tres mecanismos para mantener el pH interno compatible con la vida: la respuesta homeostática, la respuesta de tolerancia al ácido y la síntesis de proteínas de 'shock' acídico (Montville, 1997).

A pH mayor que 6,0 las células bacterianas ajustan su pH interno a través de la respuesta homeostática modulando la actividad de las bombas de protones, antiportes y simportes, para aumentar la velocidad a la cual los protones son expelidos del citoplasma. El mecanismo homeostático es constitutivo y funciona en presencia de inhibidores de la síntesis proteica (Saier, 1997).

La respuesta de tolerancia al ácido es iniciada por un pH externo de 5,5 a 6,0. El mecanismo es sensible a los inhibidores de la síntesis proteica y puede mantener el pH interno por sobre 5,0 teniendo el pH externo con valores tan bajos como 4,0. La pérdida de la actividad ATPasa, causada por las mutaciones que desorganizan genes o los inhibidores metabólicos, anula la respuesta de tolerancia al ácido pero no el

mecanismo homeostático. Dicha respuesta también puede conferir protección cruzada frente a otros agentes ambientales de estrés.

La síntesis de proteínas de 'shock' acídico es la tercera vía por la que la célula regula el pH interno. Además la síntesis generada por un pH en el hábitat de 3,0 a 5,0 proveyendo un conjunto de proteínas reguladoras distintas de las proteínas de la respuesta de tolerancia al ácido (Carrillo, 2003).

Cuadro 1.1 Rangos de pH para el crecimiento, (Carillo,2003).

| | Rango de pH para el crecimiento (2) | | |
|---|---|---|---|
| **Bacterias** | **límite inferior** | **óptimo** | **límite superior** |
| *Thiobacillus thiooxidans* | 0,5 | 2,0-3,5 | 6,0 |
| *Azotobacter* sp. | 5,5 | 7,0-7,5 | 8,5 |
| *Erwinia carotovora* | 5,6 | 7,1 | 9,3 |
| *Clorobium limicola* | 6,0 | 6,8 | 7,0 |
| *Thermus aquaticus* | 6,0 | 7,5-7,8 | 9,5 |
| *Nitrobacter* spp. | 6,6 | 7,6-8,6 | 10,0 |
| **Hongos** | | | |
| *Aspergillus oryzae* | 1,6 | | 9,3 |
| *Fusarium oxysporum* | 1,8 | | 11,1 |
| *Penicillium italicum* | 1,9 | | 9,3 |
| *Rhizoctonia solani* | 2,5 | | 8,5 |
| *Botrytis cinerea* | <2,8 | | 7,4 |
| *Aspergillus niger* | 2,8 | | 8,8 |

Aunque para la mayoría de las bacterias el pH óptimo para el crecimiento se encuentra entre 8,5 y 7,5; pocas especies son acidófilas *(Thiobacillus),* algunas son ácidotolerantes (lactobacilos), pero muchas crecen en condiciones alcalinas (nitrificadores, rizobios, actinomicetos y bacterias ureolíticas). Por su parte, los hongos prefieren valores bajos de pH, y predominan cuando se siembra una muestra de suelo en un medio de pH 5, pero no a pH 8 (Carillo,2003).

### 1.4.3.2 Influencia de la Temperatura

En muestras de agua recogidas en las proximidades inmediatas a las surgencias termales se han hallado hasta 108 - 109 células bacterianas por mL. Las bacterias

adaptadas a elevadas presiones hidrostáticas (250–260 bares o sea 25-26 MPa) muestran además una notable adaptación a las altas temperaturas, por ejemplo unas bacterias metanogénicas tenían tiempos de duplicación entre 37 y 65 minutos a 100°C bajo tales presiones (Prieur, 1985).

Cuadro 1.2 Temperaturas cardinales en $^{o}$C para microorganismos procarióticos (ICMSF, 1983).

| Temperaturas cardinales en °C para microorganismos procarióticos (17) | | | |
|---|---|---|---|
| **grupo** | **mínima** | **óptima** | **máxima** |
| termófilos | 40-45 | 55-75 | 60-90 |
| mesófilos | 5-15 | 30-45 | 35-47 |
| psicrotrofos | -5-+5 | 25-30 | 30-35 |
| psicrófilos | -5-+5 | 12-15 | 15-20 |

Los valores de las temperaturas cardinales (mínima, óptima, máxima) varían ampliamente entre las bacterias como se muestra en el cuadro siguiente, pero algunas tienen una amplitud mayor, como por ejemplo *Clostridium perfringens* que crece entre 12 y 50°C. Los organismos aislados de ambientes fríos crecen a temperaturas por debajo de 0°C si las altas concentraciones de solutos impiden la congelación del medio (Madigan, Martinko & Parker, 2003).

Cuadro 1.3 Temperaturas en $^{o}$C para el crecimiento bacteriano (Madigan, Martinko & Parker, 2003).

| Temperaturas en °C para el crecimiento de bacterias (1) | | | |
|---|---|---|---|
| **especie** | **mínima** | **óptima** | **máxima** |
| *Listeria monocytogenes* | 1 | 30-37 | 45 |
| *Pseudomonas maltophila* | 4 | 35 | 41 |
| *Escherichia coli* | 10 | 37 | 45 |
| *Clostridium kluyveri* | 19 | 35 | 37 |
| *Bacillus flavothermus* | 30 | 60 | 72 |
| *Thermus aquaticus* | 40 | 70-72 | 79 |
| *Sulfolobus acidocaldarius* | 70 | 75-85 | 90 |
| *Pyrobacterium brockii* | 80 | 102-105 | 115 |

La velocidad de crecimiento se ve afectada por los cambios de temperatura y en los rangos inferiores el tiempo de generación puede sobrepasar las cien horas. Los microorganismos eucarióticos, por ejemplo protozoos, son más sensibles a las bajas temperaturas que los procarióticos, y entre estos últimos los gram negativos son más afectados que los gram positivos (ICMSF, 1983).

### 1.4.4 Biodegradación de hidrocarburos.

El crudo de petróleo es una mezcla variable de cientos de componentes. Su composición química y sus propiedades físicas varían según su origen. Todos ellos son una mezcla de alcanos, cicloalcanos, aromáticos, policíclicos y cantidades variables de nitrógeno, azufre y compuestos oxigenados.

La composición puede determinar las tasas de biodegradación. En general se considera que los crudos de petróleo ricos en azufre y en aromáticos son los de más difícil degradación. La composición tampoco es constante a lo largo del tiempo y varía en el proceso de envejecimiento debido a procesos bióticos y abióticos (evaporación entre 40 y 50% se evapora en unas horas o pocos días, solubilización, fotooxidación, dispersión emulsión, adsorción a partículas, sedimentación). Una vez envejecido se enriquece en ceras, asfaltenos y metales pesados, y es mucho más viscoso (Lalucat, Cladera y García, 2000).

La secuencia en la eliminación natural de un vertido de crudo de petróleo es: (1) La desaparición de volátiles en horas o días; éstos son los más tóxicos y al mismo tiempo los más fáciles de mineralizar por las bacterias. (2) Durante el primer año se alcanza el máximo de la degradación biológica y al cabo de 4-6 años acostumbra a ser difícil detectar la contaminación. Es el resultado de la actuación de comunidades microbianas sobre los componentes del crudo en un ambiente de características variables. (3) La flora y fauna desaparecida por causa de un vertido se recupera en un proceso de recolonización que dura hasta 10 años (Lalucat, Cladera y García, 2000).

#### 1.4.4.1 Factores necesarios para la degradación de hidrocarburos

El número de bacterias, es influenciado en los periodos de biodegradación por factores como: el estado físico del aceite en el ecosistema, temperatura ambiental, disponibilidad de oxígeno, y concentraciones de nutrientes, especialmente oxigeno, fósforo y hierro. (Dible y Bartha, 1976); (Gibbs y Andrews, 1975).

El crecimiento de un microorganismo o el tamaño y productividad de una comunidad están limitados por estos factores biológicos y ambientales. Al tener condiciones apropiadas los microorganismos se multiplican y compiten por el espacio, la cantidad total de espacio en el suelo disponible por lo general no está limitada, pero hay un número limitado de micro- hábitats apropiados que contienen nutrientes, oxigeno, entre otros. En estas condiciones es posible que haya más competencia por espacio utilizable que por espacio total. (Campbell, 1987).

Entonces, si la proporción del área superficial y el volumen del suelo son los adecuados hay más área disponible para la colonización y, por ende, el ataque de enzimas degradadoras de petróleo es mayor y se descompone aceleradamente. Por otra parte la disponibilidad de oxígeno molecular es considerado como un factor limitante para la degradación del petróleo, por ejemplo en los casos de grandes acumulaciones de aceite en los suelos de en regiones de intensa descomposición o en cuerpos de agua. El desarrollo de las condiciones anóxicas puede limitar severamente la biodegradación de hidrocarburos (Atlas, 1987; King, et al., 1992).

También es importante mencionar que el petróleo crudo aporta carbono que sirve como nutriente orgánico y energía a los microorganismos degradadores, pero es deficiente en nutrientes como: nitrógeno, fósforo y hierro los cuales son necesarios para el soporte del crecimiento microbiano. En la degradación del petróleo los microorganismos deben obtener sus nutrientes minerales esenciales del ambiente.

Muchos ecosistemas están limitados en nutrientes y minerales, y no soportan una biodegradación rápida y extensa de hidrocarburo (Atlas y Bartha 1972).

#### 1.4.4.2 Biodegradación de crudo de petróleo mediante cepas aisladas

La elevada complejidad de la composición del crudo de petróleo y derivados, implica la existencia de una amplia capacidad enzimática si se quiere conseguir una degradación significativa del crudo. La mayor parte de los estudios realizados se han llevado a cabo con cepas bacterianas individuales o con la combinación de diferentes cepas aisladas (Bayona *et al*., 1986; Palittapongarnpim *et al*., 1998; Solanas *et al*., 1984). En la mayoría de los casos, son degradadoras de alcanos, debido a que los alcanos son los componentes más abundantes del crudo de petróleo.

No obstante en algunos casos, estas cepas tienen la capacidad de oxidar selectivamente las cadenas alquílicas de ciertos HAPs alquilados, compuestos abundantes en el crudo (Davis y Raymond, 1961).

Recientemente, se han descrito algunas cepas con la capacidad de degradar tanto HAPs de elevado peso molecular como alcanos (Churchill *et al*., 1999), pero ésta, no parece que sea una norma general. De hecho los degradadores de alcanos citados habitualmente en la bibliografía generalmente no son capaces de romper el anillo aromático de los HAPs, mientras que los degradadores de HAPs generalmente no crecen con alcanos (Foght *et al*., 1990).

#### 1.4.4.3 Biodegradación de crudo de petróleo por cultivos mixtos

La alternativa a la utilización de cepas individuales es la obtención y utilización de cultivos mixtos, los cuales pueden ser consorcios definidos y consorcios no definidos. Los consorcios definidos se caracterizan por ser una combinación de cepas aisladas con capacidades degradativas conocidas que son complementarias entre sí. (Komukai- Nakamura *et al*., 1996; Casellas *et al*., 1998; Foght *et al*., 1998; Foght *et al*., 1999). Los consorcios no definidos se caracterizan por ser el resultado de procesos directos de enriquecimiento a partir de muestras ambientales con historia previa de

contaminación (Venkateswaran *et al*., 1995; Sugiura *et al*., 1997; Budzinski *et al*., 1998) y por lo tanto no son el resultado de una combinación de cepas previamente aisladas.

### 1.4.5 Formación de consorcios bacterianos.

#### 1.4.5.1 Consorcios definidos

Los consorcios definidos están bien caracterizados y son repetitivos pero tienen ciertas desventajas. En primer lugar, se necesitaría un gran número de cepas distintas para conseguir una degradación extensa del crudo de petróleo, debido a la gran cantidad de componentes presentes y al espectro metabólico limitado de una cepa bacteriana (Leahy *et al*. 1990). De hecho, tal y como se ha descrito anteriormente, muchos degradadores de alcanos no utilizan HAPs parentales, y entre los degradadores de HAPs, se ha descrito que, o bien degradan hidrocarburos monoaromáticos, o bien degradan HAPs de 2 a 3 anillos o de 3 a 4 anillos (Gibson y Subramanian, 1984; Van Hamme *et al*., 2003).

Existe poca información acerca de cepas que crezcan en los HAPs alquilados de 3 o más anillos aromáticos (Gilewicz *et al*., 1997; Sabaté *et al*., 1999), muy abundantes en los crudos de petróleo. Además, habitualmente no se describe una degradación significativa de la parte no resuelta por cromatografía (UCM), constituida por componentes aún no identificados.

Otra desventaja que podemos encontrar en los consorcios definidos es la posible formación de metabolitos intermediarios que sean tóxicos para la misma cepa o para otras cepas existentes en el mismo (Casellas *et al*., 1998; Kazunga & Aitken, 2000; Kazunga *et al*.,2001). De hecho, se ha descrito que durante la degradación de mezclas de hidrocarburos se pueden formar intermediarios de persistencia y toxicidad desconocidas, por fenómenos de cometabolismo (Grifoll *et al*., 1995).

#### 1.4.5.2 Consorcios no definidos

Los consorcios no definidos, especializados en la degradación de hidrocarburos, se obtienen a partir de enriquecimientos de muestras ambientales donde hayan existido episodios previos y recurrentes de contaminación por hidrocarburos. El resultado es una población microbiana seleccionada de forma natural por su cooperación metabólica en la degradación de la mezcla en cuestión, la cual potencialmente dispone de una mayor eficiencia en la degradación de compuestos conocidos y desconocidos que un consorcio definido. Por lo tanto, es más probable que en un consorcio no definido se hayan seleccionado degradadores de productos finales que se acumulan como resultado de procesos cometabólicos (Grifoll *et al*., 1995).

#### 1.4.5.3 Competencia

Se puede definir competencia como el desigual comportamiento de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás. Un factor esencial para que exista competencia es que haya "escasez" de un elemento, si hay exceso no hay competencia. La competencia más común es por nutrientes, oxígeno o espacio (UMMS, 2000).

La "competencia" requiere complejos cambios fisiológicos que ocurren en determinadas etapas de crecimiento y está asociada a diversos fenómenos en distintas especies de bacterias. En *Bacillus subtilis* la competencia se produce durante la fase estacionaria cuando la síntesis de ácidos nucleicos está disminuída (Tyler & Miller, 2000).

*Competencia intraespecífica*: en algunos casos puede resultar en una reducción del crecimiento y de las tasas de reproducción, en otros casos puede excluir algunos individuos de los mejores hábitats, o bien causar la muerte de otros organismos. Cuando una población se aglomera y los recursos comienzan a escasear las poblaciones pueden implementar alguna de las siguientes estrategias: la primera de ellas consiste en

repartir los recursos entre los individuos de la población hasta que estos se agoten del todo, la segunda implica competir de manera directa por el recurso, de manera que los individuos más fuertes tendrán acceso al recurso limitante, asegurando su reproducción, mientras que aquellos más débiles al no acceder al recurso morirán sin dejar descendencia. En el primero de los casos la población llega de manera irremediable a la extinción, mientras que en el segundo la población mantiene su número estable (Tyler & Miller, 2000).

*Competencia interespecífica*: afecta a los individuos de la misma forma, pero además, una especie entera puede ser apartada de su hábitat ya que no puede competir exitosamente. En casos extremos, un competidor puede causar la extinción de otra especie. Cuando dos especies compiten puede que coexistan en el ambiente o que una especie excluya a la otra del mismo.

Según Gause (2000) las especies podrán coexistir sólo si los recursos mínimos que necesitan para subsistir, o la manera de aprovechar dichos recursos se diferencian, si estos no lo hacen, el competidor más fuerte ocupará por completo el nicho del competidor más débil conllevando a la exclusión de este último del ambiente.

#### 1.4.5.4 Mutualismo

Designa la relación en la cual ambos participantes reciben un beneficio. Si ambos organismos conservan la facultad de poder vivir en forma independiente, la relación se denomina *protocooperación* (un subtipo de *mutualismo*). En el caso de que la relación sea esencial para ambos participantes, la denominamos *mutualismo* propiamente (Osorio, 2006).

En estos casos el mutualista y el hospedero son metabólicamente interdependientes. Existen varios ejemplos de este tipo de relación: un protozoo flagelado que vive en el intestino de termitas y produce celulasas, que degradan la madera; líquenes (relación entre hongos ascomicotas y algas verdes o cianobacterias); microorganismos del rumen de animales herbívoros (Osorio, 2006).

Las relaciones de mutualismo pueden ser facultativas si es que ambas especies pueden vivir normalmente sin la interacción con la otra (aunque se beneficien en caso de interactuar) u obligatorias, cuando los individuos de ambas especies no pueden vivir sin la otra (Facchinello, García y Massei, 2006).

Un ejemplo de mutualismo obligado es el caso de la flora bacteriana (conjunto de especies de bacterias y hongos) presente en el tracto digestivo de la mayoría de las especies, por ejemplos de mamíferos (incluyendo al hombre), que permite que estos organismos puedan hacer una digestión normal de ciertos alimentos, a la vez que producen ciertas sustancias que resultan ser esenciales para el organismo que les hace de hospedador como vitaminas y aminoácidos (Facchinello, García y Massei, 2006).

Las bacterias no pueden vivir fuera del tracto digestivo y dependen de la ingestión de elementos por parte de mamífero para poder obtener su alimento. Las situaciones de mutualismo obligadas son denominadas simbiosis y simbiontes a cada uno de los organismos o especies (Facchinello, García y Massei, 2006).

#### 1.4.5.5 Parasitismo

Ocurre cuando la asociación es perjudicial para el huésped. En este caso, el desarrollo de las bacterias produce alteraciones, las bacterias son patógenas (parásitos en sentido restringido) y el huésped pone en marcha diversos mecanismos reactivos de defensa, dando como resultado la aparición de una infección o una enfermedad infecciosa(Pumarola,1999).

Esto no implica que el parásito produzca necesariamente graves trastornos al huésped, sino que en los estados de parasitismo bien adaptados, que generalmente sólo se logran al cabo de mucho tiempo de esta asociación, se puede llegar a un estado de

equilibrio, que sin apenas trastornos para el huésped ambos aseguren su supervivencia y propagación. Por el contrario, en los comienzos de la asociación parasitaria, cuando el parásito está poco adaptado al huésped, el organismo produce fenómenos reactivos que son tan perjudiciales para el huésped como para el parásito (Duguid & Old, 1980).

De estos modelos de interacción, en microbiología médica interesa fundamentalmente el conocimiento de la flora microbiana normal del organismo humano, compuesta por una mayoría de comensales, cierto número de mutualistas y escasos parásitos, y el estudio de las bacterias parásitas o patógenas capaces de desarrollar en el hombre una acción nociva y producir enfermedades infecciosas, que en su mayoría se encuentran entre los parásitos (Kellenius, Molby, & Svenson, 1981).

#### 1.4.5.6 Antagonismo

Los microorganismos presentes en un alimento pueden inhibirse entre si a través de diferentes mecanismos, que en algunos casos son letales. Este fenómeno se ha encontrado entre distintas bacterias, entre bacterias y levaduras, levaduras y mohos y entre bacterias y mohos. Los microorganismos ejercen su acción antagonista mediante diferentes productos metabólicos (Ray, B. 2001).

### 1.4.6 Procesos de fermentación y teoría de Fermentadores

Un fermentador es un recipiente de vidrio o acero inoxidable si el uso es farmacéutico, o de material menos noble, como acero al carbono, en el caso de aplicaciones menos exigentes en pureza. Por lo general, el reservorio tiene una altura 2.5 a 4 veces superior a su diámetro, y en función de la aplicación, su volumen varía entre 1000-10 000 lt en el caso de un producto farmacéutico, a 1500000 lt, y más en el caso de la producción de microorganismos como fuente de proteína animal (Mönckeberg,1988**).**

El diseño de un fermentador, aparte de asegurar que la operación sé

desempeñe en forma aséptica, debe responder a tres requisitos principales: Mezcla adecuada, buena transferencia del oxígeno del aire al microorganismo y remoción del calor. Este último imperativo explica que, a pesar de las bajas temperaturas a que operan los procesos biológicos con respecto a la catálisis química; sea necesario considerar superficies importantes de intercambio térmico dentro del fermentador para mantener la temperatura de crecimiento (Bjurstrom, 1985).

También, es una explicación en parte el interés que presentan los microorganismos termófilos, capaces de trabajar a temperaturas más elevadas que otros microorganismos, lo cual reduce por una parte los problemas de remoción de calor durante la fermentación y, por otra parte, los riesgos de contaminación por los microorganismos mesófilos (Mönckeberg, 1988). En forma general existen tres tipos principales de fermentadores para cultivos aeróbicos (Fig. 1.2)

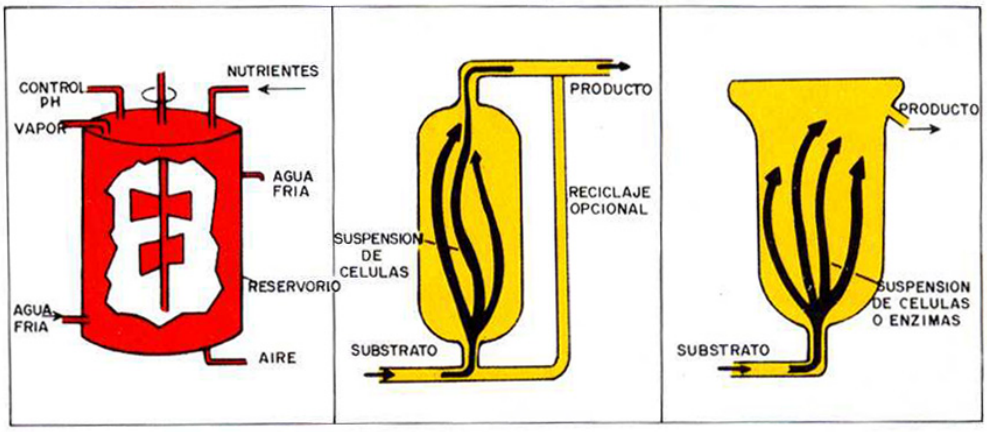



Figura 1.2 Tres modelos básicos de fermentadores.
Fuente: Mönckeberg, 1988.

- Fermentador por lotes (o batch) compuesto de un tanque agitado termoregulado y varias entradas para nutrientes, vapor, aire, etc.

- Fermentador compuesto de células o enzimas inmovilizadas sobre un soporte fijo en su interior. El sustrato fluye a través de las células y el producto es reciclado o recolectado según el caso.

- Fermentador o lecho fluidizado. Como en el caso anterior, las células o enzimas están inmovilizadas. Sin embargo, éstas se encuentran en suspensión, gracias a la combinación velocidad de flujo – geometría del reactor.

**1.4.6.1 Estanques aireados agitados**.

Son los más tradicionales y tuvieron un gran desarrollo durante los años 50 y se usan para la producción de antibióticos como la penicilina a escala industrial. El diseño implementado en aquella época se ha mantenido hasta hoy, a pesar que se han efectuado varias modificaciones importantes, en particular en el sistema de agitación (Preuss, 1985).

El fermentador agitado consiste en un cilindro vertical que posee varios deflectores para prevenir la formación de un torbellino durante la agitación. El aire estéril penetra por la base del reservorio, a través de un distribuidor circular. El eje vertical lleva una o varias hélices en función de la relación altura/diámetro. En los últimos veinte años, varias compañías han modificado los agitadores de sus fermentadores, con el fin de disminuir los gastos en energía de agitación (Preuss, 1985).

A pesar de que este modelo de fermentador no es el más económico de instalar ni de operar, sigue siendo el más corrientemente utilizado desde los últimos treinta años. La razón de su éxito reside en su gran versatilidad para ser usado a cualquier escala de producción y para un gran número de procesos sin modificaciones del diseño. Por lo tanto, los costos relativamente elevados de inversión y operación se encuentran compensados por su flexibilidad (Mönckeberg, 1988).

**1.4.6.2 Reactores tubulares (Air-1ift).**

Se trata de un reactor en forma de torre o columna, en el cual el aire es introducido en la base del tubo, y la ascensión de las burbujas de aire constituye el único tipo de agitación existente. A pesar de que el modelo agitado permite concentraciones superiores de biomasa, el fermentador tubular, por su simplicidad y costos inferiores de energía, manutención e instalación, es preferido en algunos procesos al anterior. Estos fermentadores son utilizados en la producción de cerveza, vinagre y ácido cítrico (Mönckeberg,1988).

**1.4.6.3 Estanques a recirculación**.

Dichos fermentadores tienen en común el flujo del medio de cultivo en una dirección definida. Se ha logrado gracias a la incorporación de tubos de aspiración en el diseño, lo cual permite una recirculación interna del fluido, o por el uso de un conducto de recirculación, el que permite una recirculación externa (Yanchinski, 1987.).

La fuerza motora se desarrolla por el efecto de ascensión de las burbujas de aire (air lift) o por un sistema de flujo hidrodinámico. Existe gran polémica sobre las virtudes de este tipo de sistema, el cual para muchos, es tan eficiente a más que el tanque agitado con respecto a la transferencia de masa, y con una economía sustancial de energía (Yanchinski, 1987.).

**1.4.7 Contaminación de la Industria Petrolera**

La utilización masiva de combustibles fósiles ha provocado cambios sustanciales en el clima. De manera natural, el clima del planeta está determinado por el equilibrio entre la fracción de la energía solar absorbida por la superficie y la restante, que es mandada de vuelta al espacio. El clima se balancea en función de cuanta de ésta energía se almacena en la atmósfera al calentar a algunos de los componentes gaseosos. Existe un grupo de gases conocidos como invernadero que comprende al bióxido de carbono, al bióxido nitroso, al metano, los clorofluoro-carbones, otros compuestos halogenados y al vapor de agua. Dichos gases absorben la radiación reflejada provocando el caliento global de la atmósfera baja y cambiando dramáticamente el

clima del planeta. Los gases invernadero provienen tanto de fuentes naturales como antropogénicas, entre las cuáles se encuentra la utilización de combustibles fósiles. Nuestro planeta contiene alrededor de 1.5 x $10^{12}$ millones de toneladas de carbono y alrededor de 15% de éste se encuentra en yacimientos subterráneos. Hemos extraído una pequeña parte (menos del 0.4% de todo el carbono del planeta) para usarlo como combustible, sin embargo cada año estamos incorporando 2,800 millones de toneladas de bióxido de carbono a las 76,000 millones de toneladas existentes en nuestra atmósfera (Tsutsumi, et al., 2000).

La acumulación de bióxido de carbono provoca actualmente una incremento de 1% adicional al calor generado por las radiaciones solares y sigue aumentando. Sólo existe una vía para incorporar el bióxido de carbono atmosférico a otras formas de menor impacto ambiental y es a través de la fotosíntesis, un proceso exclusivo de las plantas y algunas bacterias. La mayor parte de la fotosíntesis se lleva a cabo en el mar, donde se asimilan 2,500 millones de toneladas de carbono al año, mientras que en la tierra se incorporan 500 millones de toneladas de carbono al año. La contaminación de los mares y la tala inmoderada de los bosques, especialmente en las zonas tropicales, reduce nuestras reservas de fotosíntesis y agrava el problema (Bredehoeft, 1994).

Una medida que ha tenido un éxito significativo es la aplicación de técnicas de biorremediación. Como un ejemplo bien documentado al respecto, recomendamos la revisión de un caso de contaminación accidental por petróleo crudo en la costa de Japón recientemente publicado que se remedia con una preparación microbiana (Tsutsumi, et al., 2000).

La biorremediación utiliza generalmente microorganismos (bacterias, hongos, levaduras y algas), y recientemente han comenzado a utilizarse plantas superiores para algunas aplicaciones. Aunque nuevos enfoques en la biorremediación han surgido basados en la biología molecular y la ingeniería de bioprocesos, la biorremediación clásica continúa siendo el enfoque favorito para procesar desechos biológicos y evitar la

propagación de bacterias patógenas (Barbee, Brown & Donnelly, 1992; Bouwer & Zehnder. 1993; Hoff, 1993; Leahy & Colwell . 1990).

La biorremediación también juega un papel cada vez más importante en la concentración de metales y en la recuperación de materiales radioactivos (Brim, 2000; Robinson & Tuovinen. 1984).

Algunos microorganismos pueden degradar de manera natural compuestos orgánicos y esta capacidad se explota para facilitar la degradación de contaminantes y para operaciones de limpieza de desechos *in situ*. La aplicación de ensayos de monitoreo sencillos y de alta resolución ha permitido identificar aquellas especies capaces de degradar contaminantes mientras que el uso de sondas génicas específicas permite determinar la abundancia relativa de estos microorganismos (Roling, Milner, Jones, Lee, Swannell & Head. 2002).

De las diferentes fracciones del petróleo, los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) son los de mayor toxicidad y al mismo tiempo los más recalcitrantes a los métodos convencionales de remediación. Los HPAs son un grupo de compuestos aromáticos conteniendo dos o más anillos bencénicos fusionados en arreglos angulares, lineales o agrupados, contaminantes ubicuos que se forman naturalmente en el curso de algunas reacciones geológicas incluyendo la fosilización de plantas o antropogénicamente en relación a las industrias del petróleo, de la producción de gas y de la preservación de madera. Los HPAs de bajo peso molecular son susceptibles de biorremediación, sin embargo, los de alto peso molecular son recalcitrantes a la degradación biológica (Cerniglia, 1993; Park, Sims & Dupont. 1990; Wilson & Jones, 1993).

Una variación interesante es la identificación de organismos que degraden tanto los compuestos contaminantes como los surfactantes, de manera de no acumular otros compuestos xenobióticos al suelo (Finnerty, 1994.). Es importante considerar que

los productos de degradación de los HPAs no son necesariamente menos tóxico que las moléculas parentales, por lo que es imprescindible incorporar procedimientos de monitoreo de toxicidad en las diferentes etapas de la biorremediación (Valderrama y Téllez-Sosa, 2000).

## 1.5 HIPÓTESIS

El presente estudio tiene como objetivo el determinar el rango óptimo de temperatura y pH para el crecimiento de cinco cepas degradadoras y su consorcio. Al tomar en cuenta, que el tipo de bacterias sujetas a la investigación son mesófilas se espera encontrar que este rango se encuentra entre 25 y 35$^{o}$C. Además al analizar las condiciones de crecimiento ya determinadas y el tipo se suelo de donde fueron aisladas, el pH a determinar estará entre 6.5 y 7.5.

Una vez establecidas las condiciones óptimas individuales de las cepas, se pretende determinar que las mismas serán también las que se apliquen al consorcio formado.

Las condiciones óptimas de crecimiento determinadas a nivel de laboratorio para el consorcio, son extrapolables a nivel de biofermentador.

Luego de realizada la producción semindustrial en el biofermentador se realizará un aislamiento de las cepas formadoras del consorcio para evaluar la permanencia en el tiempo de las mismas, cual se cree será probada.

Finalmente se intentará definir si las condiciones de operación del biofermentador utilizadas, son las óptimas o si las posibles nuevas condiciones pueden mejorar el proceso de bioaumentación.

## CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

## 2.1 PARTICIPANTES

La investigación se realizó previa a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología, otorgado por la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, mediante convenio de la Escuela Politécnica del Ejército y Petroecuador, por medio del cual se tuvo acceso al Proyecto de Eliminación de piscinas y Limpieza de derrames en el Distrito Amazónico (PEPDA) de Petroproducción en donde se coordinó los trabajos con el Ing. Daniel Hidalgo, Coordinador Laboratorio de Ciencias Biotecnológicas.

## 2.2 ZONA DE ESTUDIO

El estudio se realizó en el Laboratorio de Ciencias Biotecnológicos del PEPDA, ubicado en el Campo Sacha de Petroproducción, Cantón Joya de los Sachas, Provincia de Orellana.

## 2.3 PERIODO DE TIEMPO DE INVESTIGACIÓN:

**Inicio:** 20 de Marzo del 2007
**Final:** 20 de Septiembre del 2007

## 2.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

El Diseño experimental propuesto fue DCA con arreglos factoriales, luego de lo cual se efectuó un Análisis de variancia y Pruebas de significancia.

## 2.5 MÉTODOS

### 2.5.1 Reactivación de cepas

Las bacterias previamente asiladas e identificadas, fueron reactivas para poder ser utilizadas, mediante el cultivo de las mismas en agar nutritivo con estriado de asa para aislamiento de colonias, y luego incubados por 12 horas a 30$^{o}$C (Hidalgo, Serrano, Recto, y Cordones, 2006).

Una vez aisladas las colonias en las cajas de agar nutritivo, se procedió a hacer una tinción gram y con la ayuda de un microscopio se realizó la comprobación de su pureza y morfología (Wolin, et al. 1973).

Posteriormente se inoculó el cultivo en un tubo de 10 ml de caldo nutritivo y se lo dejó incubar por 12 horas a 30$^{o}$C, finalmente se comprobó que el crecimiento sea de escala de Mc Farland 2, correspondiente a 60x10$^{7}$ UFC (Smibert & Kreig, 1994).

### 2.5.2 Preparación de medios de Cultivo

#### 2.5.2.1 Medio mineral de Mills

Para la realización de las diferentes pruebas de crecimiento se utilizó la siguiente formulación para 1L.

Cuadro 2.1 Formulación medio mineral de Mills.

| | |
|---|---|
| Cloruro de Sodio | 2,4 g |
| Cloruro de Potasio | 0,7 g |
| Fosfato diácido de Potasio | 2,0 g |
| Sulfato de Magnesio heptahidratado | 1,0 g |
| Fosfato ácido di sódico | 3,0 g |
| Nitrato de Amonio | 1,0 g |
| Agua destilada | 1000 Ml |
| Petróleo crudo | 10 Ml |
| pH final | 7.0 |

Fuente: LACIB, 2006

### 2.5.2.1 Medio mínimo de Goldman

Para determinar la actividad emulsificante de cada cepa se utiliza el medio mínimo de Goldman, el cual presenta la siguiente formulación para un litro.

Cuadro 2.2 Formulación medio mínimo de Goldman

| | |
|---|---|
| Fosfato ácido dipotásico | 18 g |
| Fosfato diácido de Potasio | 6 g |
| Sulfato de Magnesio | 0,02 g |
| Sulfato diamónico | 1,0 g |
| Etanol | 20 ml |
| Extracto de levadura | 3% P/V |

Fuente: LACIB, 2006.

### 2.5.3 Inoculación del Cultivo

Una vez reactivadas las cepas en el caldo nutritivo, se procedió a la inoculación en el medio de cultivo añadiendo un 1% de cultivo reactivado de la cepa correspondiente , bajo el concepto de simular en lo posible las condiciones ambientales, debido a que teorícamente todos los ecosistemas naturales poseen microorganismos

capaces de metabolizar los compuestos tóxicos y xenobióticos, los mismos que suelen encontrarse en proporciones menores al 1% de la comunidad microbiana (Fotúrbel e Ibáñez, 2004).

Posteriormente se realizó un contaje para definir el número inicial de bacterias en tiempo cero al inicio del periodo de incubación.

### 2.5.4 Contaje por profundidad

Una vez tomados los 10 ml de muestra se las colocó en 90 ml de agua peptona al 0.1%, efectuando la dilución $10^{-1}$, luego se tomó un 1ml y se colocó en un tubo de 9 ml de agua peptonada, se realizó este proceso sucesivamente hasta que la dilución sea la adecuada para el contaje (Prescott, Harley & Klein, 2004).

Alcanzada la dilución deseada, se tomó 1ml del último tubo y se lo colocó en una caja petri estéril, para posteriormente añadir 25ml de agar nutritivo estéril que debe tener una temperatura de 45$^{o}$C (Prescott, Harley & Klein, 2004), lo que se pudo lograr con la ayuda de un baño maría.

Con un movimiento circular y en paralelo se mezcló las bacterias con el agar, luego de lo cual se dejó solidificar y se incubó de 18 a 24 horas a 30$^{o}$C.

Posteriormente se realizó el contaje visual de las colonias presentes luego del periodo de incubación, para aceptar un crecimiento como significativo el unidades formadoras de colonias debe estar entre 30 y 300 (Manacorda, Cuadros y Alvarez, 2006).

### 2.5.5 Tinción Gram

Se realizó un frotis con agua destilada del cultivo a analizar y se fijó con calor, el Frotis fijado se tiñó 1 minuto con Violeta Cristal, se lavó con agua, se cubrió con solución Yodada durante 1 minuto y se lavó nuevamente con agua, se decoloró con mezcla alcohol etílico/acetona. Se escurrió y cubrió con Safranina (color de contraste) durante 20 segundos. Se hizó el lavado con agua y se dejó secar al ambiente (Reynolds, 2005).

### 2.5.6 Análisis estadístico

Los distintos ensayos de pH y temperatura se realizaron con tres repeticiones para garantizar la confiabilidad de los resultados (Bahamonde, 1985).

Para el tratamiento estadístico se utilizó un DCA con arreglos factoriales para el procesamiento de los datos obtenidos de pH y temperatura.

Posteriormente todos los datos fueron sometidos a un análisis de variancia y a pruebas de significancia.

Las hipótesis planteadas son:

**Tratamientos**

Ho: $t_1=t_2= t_3= t_4= t_5= t_6=t_7= t_8= t_9=t_{10}= t_{11}= t_{12}= t_{13}= t_{14}..... t_n$

Ha: $t_1\neq t_2\neq t_3\neq t_4\neq t_5\neq t_6\neq t_7\neq t_8\neq t_9\neq t_{10}\neq t_{11}\neq t_{12}\neq t_{13}\neq t_{14}.....t_n$

**Cepas**

Ho: $C_1=C_2=C_3= C_4= C_5=$ Consorcio

Ha: $C_1 \neq C_2 \neq C_3 \neq C_4 \neq C_5 \neq$ Consorcio

**Temperatura**

Ho: $X_1 = X_2 = X_3 = X_4 = X_5$

Ha: $X_1 \neq X_2 \neq X_3 \neq X_4 \neq X_5$

**pH**

Ho: $P_1 = P_2 = P_3 = P_4 = P_5$

Ha: $P_1 \neq P_2 \neq P_3 \neq P_4 \neq P_5$

**Horas de muestreo**

Ho: $H_1 = H_2 = H_3 = H_4$

Ha: $H_1 \neq H_2 \neq H_3 \neq H_4$

## 2.6 PROCEDIMIENTOS

### 2.6.1 Cinética Bacteriana

#### 2.6.1.1 Curvas de Crecimiento

Se inoculó la bacteria seleccionada y previamente reactivada en caldo nutritivo a una concentración del 1% (Fotúrbel e Ibáñez, 2004), y se procedió a incubar a 30$^{o}$C, en una incubadora con agitación.

Se tomó una muestra de 10 ml cada periodo de tiempo que va desde cada hora, hasta cada seis horas hasta concluir las 36 horas de incubación.

Finalmente se realizó un contaje por profundidad de las muestras, para determinar el crecimiento bacteriano en el tiempo.

Los datos obtenidos fueron tabulados y con la ayuda de un programa informático se procedió a la realización de las respectivas curvas de crecimiento, en las cuales se identificó los tiempos de crecimiento máximos necesarios para la realización de las pruebas de pH y temperatura respectivas.

#### 2.6.1.2 Crecimiento bacteriano con variación de temperatura.

Con la cepa reactivada, se inóculo en medio mineral a un pH de 7 en una concentración del 1% (Fotúrbel e Ibáñez, 2004).

Se incubó a diferentes temperaturas que van de 20 a 38$^{o}$C con la ayuda de una incubadora con agitación.

Se tomó muestras de 10 ml en los tiempos determinados como inicio y final de la fase exponencial, las cuales serán procesadas mediante la técnica de contaje por profundidad para determinar el número de colonias viables a la temperatura indicada (Manacorda, Cuadros y Alvarez, 2006).

Los datos obtenidos son tabulados y mediante un programa informático se procedió a la elaboración de gráficos en columnas, que representen gráficamente los resultados obtenidos.

#### 2.6.1.3 Crecimiento bacteriano con variación de pH

El pH del medio mineral de Mills fue variado con la utilización de ácido clorhídrico 6.5% e hidróxido de sodio 0,2 N en un rango que va de 6 a 8.

La cepa previamente reactivada fue inoculada al 1% (Fotúrbel e Ibáñez, 2004) en cada uno de los medios con los diferentes puntos de pH de prueba.

Se tomó una muestra de 10 ml en cada uno de los tiempos determinados como de crecimiento exponencial (Capitulo III).

Las muestras fueron procesadas con el método de contaje por profundidad e incubadas a 30$^{o}$C por 24 horas, tiempo luego del cual se procedió al conteo de colonias para su posterior reporte.

Los datos obtenidos son tabulados y mediante un programa informático se procedió a la elaboración de gráficos en columnas, que representen gráficamente los resultados obtenidos.

### 2.6.2 Cinética del consorcio

#### 2.6.2.1 Pruebas de Antagonismo

Las cepas seleccionadas para la prueba se cultivaron en caldo nutritivo, durante 12 horas a 30°C.

Para iniciar las pruebas de antagonismo, se sembró masivamente cada uno de los microorganismos en agar nutritivo con la ayuda de un hisopo estéril y se enfrentó a las diferentes cepas con la ayuda de discos de papel estéril sumergidos en el caldo nutritivo con la cepa reactiva y se los impregnó en el agar nutritivo, de modo tal que cada una de las cepas fueran enfrentadas entre si, se incubó por 24 horas a 30$^{o}$C.

El efecto antagónico se evalúo midiendo el diámetro de cada uno de los halos de hidrólisis alrededor de los discos estériles, tomando como antagonismo positivo a las cepas que enfrentándose entre sí, inhiben el crecimiento de las otras, presentando un halo de inhibición mayor de 5 mm, y determinándose un antagonismo negativo a las cepas que presenten entre si, un halo de inhibición < 5 mm (Rodríguez, Rueda, Pedroza y Poutou, 2002)

#### 2.6.2.2 Actividad emulsificante

Se realizó la reactivación de las cepas seleccionadas para la prueba en caldo nutritivo.

Siguiendo el método propuesto por Goldman et al., (1982):

Se mezcló 18 ml de medio mínimo de Goldman con 2 ml del cultivo reactivado y, se incubó por 72 horas a 30$^{o}$C con agitación constante.

Luego de transcurridas las 72 horas, procedió a centrifugar la muestra a 5000 rpm por 30 minutos.

Se obtuvo 10 ml del sobrenadante, al cual se le añadió 0.1 ml de petróleo crudo, y se agitó por cinco minutos.

Trasvasado 5ml de la muestra se procedió a leer la absorbancia en un espectrofotómetro UV a 540 nm, en donde el blanco se preparó con medio de cultivo con crudo sin incubación.

La equivalencia es de 0.816 de absorbancia= 1 UAE/ml que corresponde a Unidad de Actividad Emulsificante por mililitro (Goldman et al.,1982).

#### 2.6.2.3 Formación del consorcio

Una vez realizadas las pruebas de antagonismo y actividad emulsificante para cada una de las cepas se determinó cuales de estas pasaran a formar parte del consorcio, tomando en cuenta un antagonismo positivo lo que hará que no formen parte del consorcio y una actividad emulsificante menor a 1, en cuyo caso tampoco fueron incluidas.

Debido a que no se tiene datos individuales sobre la eficacia de cada una de las cepas en campo, se procedió a poner la misma cantidad de inóculo de cada una en el medio de cultivo (LACIB, 2006).

#### 2.6.2.4 Curva de Crecimiento

Se inoculó las cepas en caldo nutritivo en proporciones iguales en una concentración del 1% (Fotúrbel e Ibáñez, 2004), y se procedió a incubar a 30$^{o}$C, en una incubadora con agitación (LACIB, 2006).

Se tomó una muestra de 10ml cada periodo de tiempo que va desde cada hora, hasta cada seis horas hasta concluir las 36 horas de incubación.

Las muestras fueron procesadas mediante la técnica de contaje por profundidad (Prescott, Harley & Klein, 2004).

Los datos obtenidos fueron tabulados y con la ayuda de un programa informático se procede a la realización de las respectivas curvas, en las cuales se identificará los en los cuales existe un crecimiento estable del cultivo.

#### 2.6.2.5 Crecimiento con variaciones de pH

Al medio mineral de Mills, se procede a variar el pH, con la utilización de ácido clorhídrico e hidróxido de sodio en un rango que va de 6 a 8.

Determinado el tiempo en el cual existe un crecimiento estable del consorcio, se toma muestras de 10 ml en estos, en el medio mineral con el pH de prueba, para su posterior procesamiento.

#### 2.6.2.6 Crecimiento con variaciones de Temperatura

Con el consorcio formado previamente, fué incubado a diferentes temperaturas con la ayuda de una incubadora con agitación.

En los tiempos de crecimiento determinados en la curva en donde se observó un equilibrio entre las cepas se tomó muestras de 10 ml, las cuales fueron procesadas para determinar el número de colonias viables a la temperatura indicada, mediante contajes por profundidad (Manacorda, Cuadros y Alvarez, 2006).

## 2.7 Pruebas de Crecimiento en el fermentador

### 2.7.1 Ensayo de las condiciones de pH y temperatura determinadas en el laboratorio.

Una vez concluidas las pruebas de crecimiento, se hizo al escalado de las mismas en un fermentador biológico, el cual posee controles de pH y temperatura.

La producción fue de 40 litros, por lo que en primer lugar se realizó un preinóculo al 1% de 400 ml de medio mineral + extracto de levadura y peptona de carne, el cual fue incubado por 24 horas a 30$^{o}$C (LACIB, 2006).

Se encendió el equipo y se procedió al armado de los electrodos y la polarización de los sensores 24 horas antes de empezar la prueba.

Se preparó el medio mineral con la adición de extracto de levadura y peptona de carne y se colocó en el fermentador, para iniciar el proceso de esterilización que se da a 121$^{o}$C por 15 minutos, una vez concluido se dejó enfriar hasta alcanzar la temperatura deseada de 30$^{o}$C, paralelamente se activaron los controles de pH propios del equipo para que este se mantenga en 7.

Con las condiciones de crecimiento reguladas y colocado el preinóculo en el fermentador se inició el proceso.

Se tomó muestras cada 4 horas previa esterilización del puerto de muestreo, a las que se les realizó contajes hasta concluir el proceso, luego de lo cual se vació el producto en biotanques previamente esterilizados para su posterior bombeo en las plataformas de landfarming (PEPDA, 2006).

### 2.7.2 Determinación de la permanencia en el tiempo de las cepas formadoras del consorcio

Una vez efectuada la producción, se tomó una última muestra al final del proceso y se sembró en superficie en agar nutritivo y se dejó incubar por 12 horas a 30$^{o}$C.

Luego se realizó el aislamiento de colonias mediante sembrado por estrias en agar nutritivo, que consiste en el agotamiento progresivo y continuo del inóculo sobre un medio sólido para obtener un número reducido de bacterias distribuidas individualmente sobre la superficie de la placa de Petri que al incubar, cada una originará una colonia (Henríquez y Donado, 2005).

La pureza de las mismas, fue comprobada mediante tinción gram y observación de sus características morfológicas (Wolin, et al. 1973).

#### 2.7.2.1 Características Macroscópicas

Una vez obtenidos los cultivos puros se procedió a la observación en agar nutriente para su identificación deacuerdo a la siguiente tabla:

Cuadro 2.3 Características microscópicas de algunos microorganismos degradadores de hidrocarburos

| **Microorganismo** | **Forma** | **Color** | **Tamaño** | **Contextura-borde** | **Elevación** |
|---|---|---|---|---|---|
| *Aeromonas hydrophila* | Irregular | Verdosa | Grande | Lobulado | Plana |
| *Bacillus megaterium* | Dispersa | Blanca | Grande | Irregular | Plana |
| *Burkholderia cepacia* | Irregular | Verdosa | Grande | Irregular | Plana |
| *Pseudomonas fluorescens* | Irregular | Verdosa | Grande | Irregular | Plana |

Fuente: LACIB, 2006.

### 2.7.2.2 Características Microscópicas

Por medio de tinción gram, se realizó la identificación de los cultivos puros y a la comparación con las características ya conocidas.

Cuadro 2.4 Características microscópicas de microorganismos degradadores de hidrocarburos.

| **Microorganismo** | **Forma** | **Tinción Gram** |
|---|---|---|
| *Aeromonas hydrophila* | Bacilo | - |
| *Bacillus megaterium* | Bacilo | + |
| *Burkholderia cepacia* | Bacilo | - |
| *Pseudomonas fluorescens* | Bacilo | - |

Fuente: LACIB, 2006.

### 2.7.2.3 Pruebas Bioquímicas

Con las características macroscópicas y microscópicas establecidas, se procedió a la identificación bioquímica a través de las diferentes pruebas.

Cuadro 2.5 Pruebas bioquímicas de identificación de microorganismos degradadores de hidrocarburos.

| Microorganismo | TSI | Lisina | Citrato | Urea | MR | VP | SIM | OXIDASA |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Aeromonas hydrophila* | K/A | +/- | - | - | - | + | $H_2S$ + Indol + Motilidad+ | - |
| *Burkholderia cepacia* | K/K | - | + | - | - | - | $H_2S$ - Indol + Motilidad+ | + |
| *Pseudomonas fluorescens* | K/K | -/+ | + | + | - | - | $H_2S$ - Indol - Motilidad+ | - |

FUENTE: (Bergey, D. ,1994)

Cuadro 2.6 Pruebas bioquímicas para la identificación de microorganismos del género *Bacillus.*

| Microorganismo | Catalasa | Almidón | Gelatina | BHI+NaCl 5% |
|---|---|---|---|---|
| *Bacillus sp.* | + | + | + | + |

FUENTE: (Bergey, D. 1994)

## CAPITULO III: RESULTADOS

### 3.1 Cinética Bacteriana

#### 3.1.1 Curvas de Crecimiento

Una vez preparados los inóculos al 1% de las diferentes cepas, se procedió al contaje de colonias en 36 horas para la conformación de la curva de crecimiento, en la correspondiente a *Aeromonas hydrophila* se pudo observar las diferentes fases de crecimiento, además de diferenciar el tiempo de crecimiento máximo que va de la hora 20 a la 24 y una finalización de su crecimiento o fase de muerte a la hora 28 (Figura 3.1).

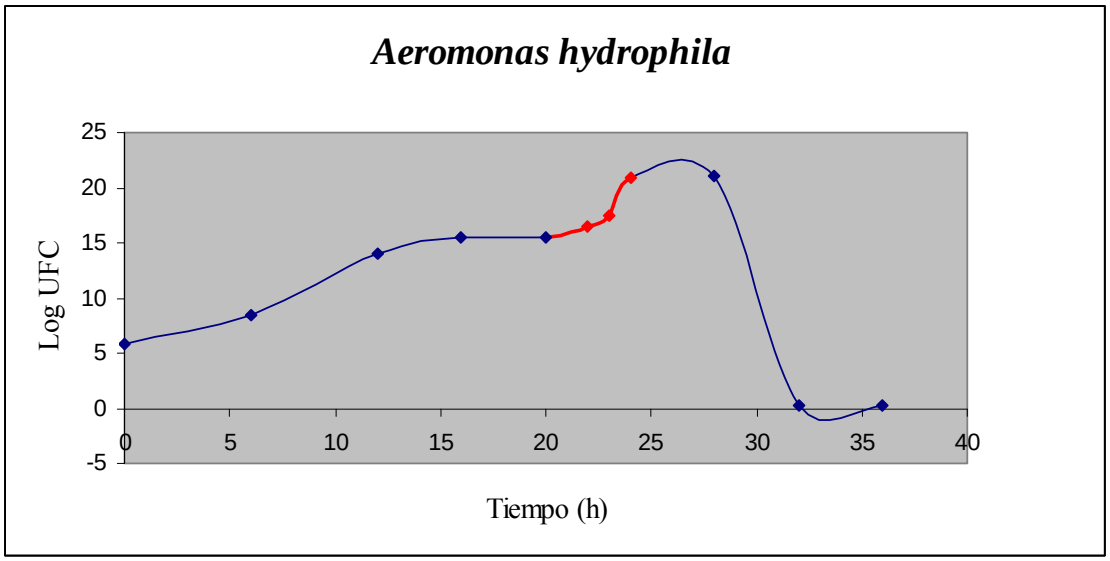



Figura 3.1 Curva de crecimiento *Aeromonas hydrophila,* crecimiento exponencial en rojo hora 20 a 24.

En la curva de crecimiento realizada para *Bacillus megaterium,* se observó un crecimiento hasta la 20, luego de lo cual comienza la fase de muerte (Figura 3.2). La fase de crecimiento exponencial se encuentra entre la hora 8 y la 14 claramente diferenciada, además se pudo ver que el crecimiento inicial en un tiempo cero es elevado con un exponente $10^6$.

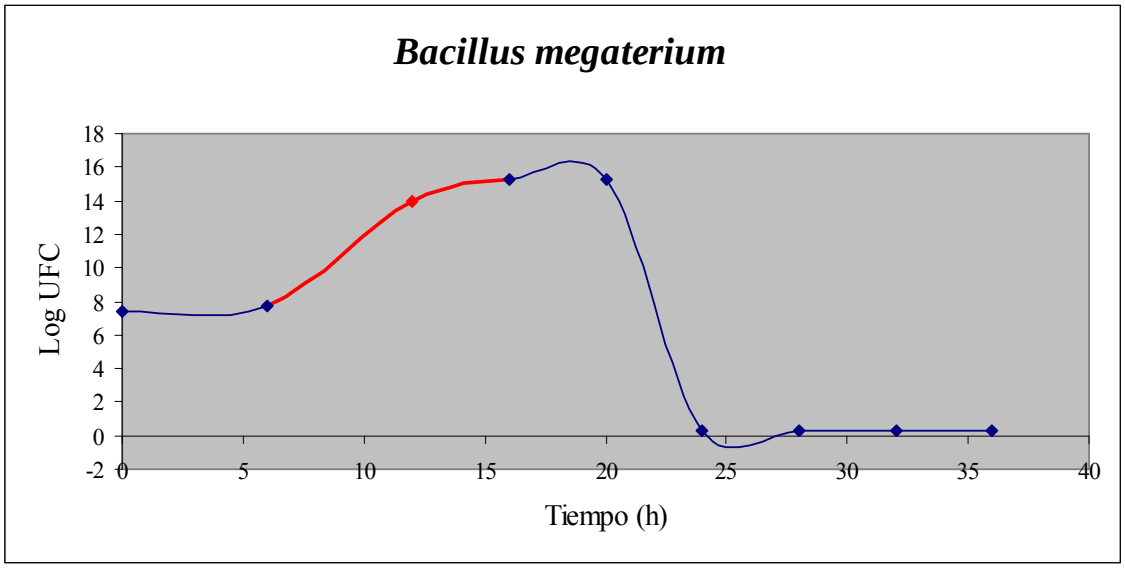



Figura 3.2 Curva de crecimiento *Bacillus megaterium* crecimiento exponencial en rojo hora 8 a 14.

La curva de crecimiento de *Burkholderia cepacia* presenta tiempos máximos de crecimiento en las horas 20 y 24, y un decrecimiento del crecimiento significativo al final de este periodo (Figura 3.3). Se observó además una clara fase de adaptación en las seis primeras horas de crecimiento.

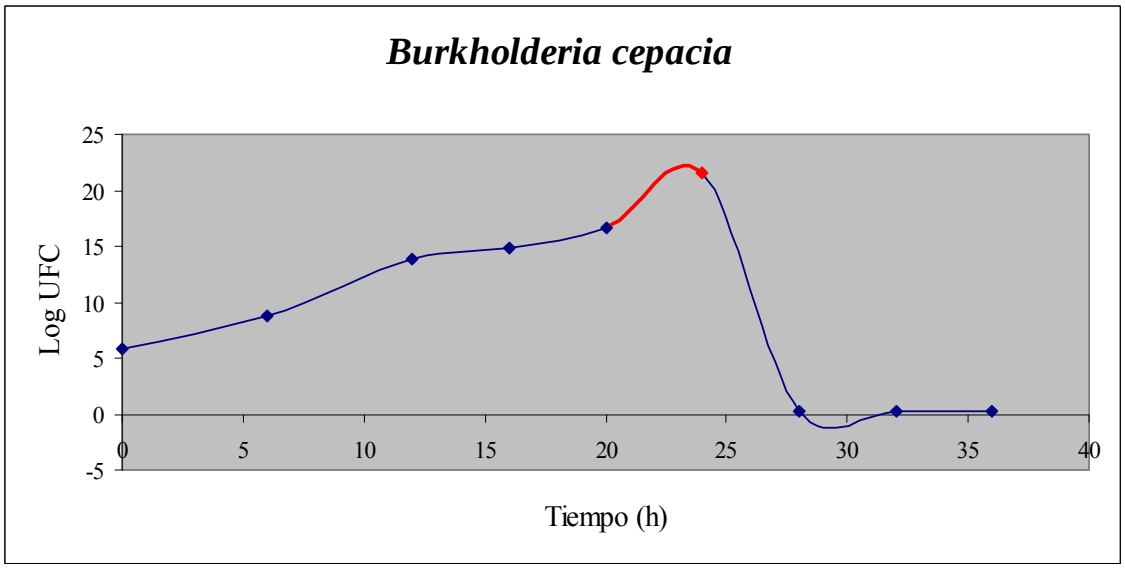



Figura 3.3 Curva de crecimiento *Burkholderia cepacia,* crecimiento exponencial en rojo hora 20 a 24.

*Pseudomonas fluorescens,* presentó un crecimiento prolongado llegando hasta la hora 32, una corta fase de adaptación en las primeras horas y una fase de crecimiento exponencial que se inicia a la hora a la hora 6, teniendo como máximo crecimiento el periodo de la hora 20 a la 24, luego de lo cual se inicia la fase estacionaria culminando con la fase de muerte luego de la hora 32, cuando el crecimiento es no significativo (Figura 3.4).

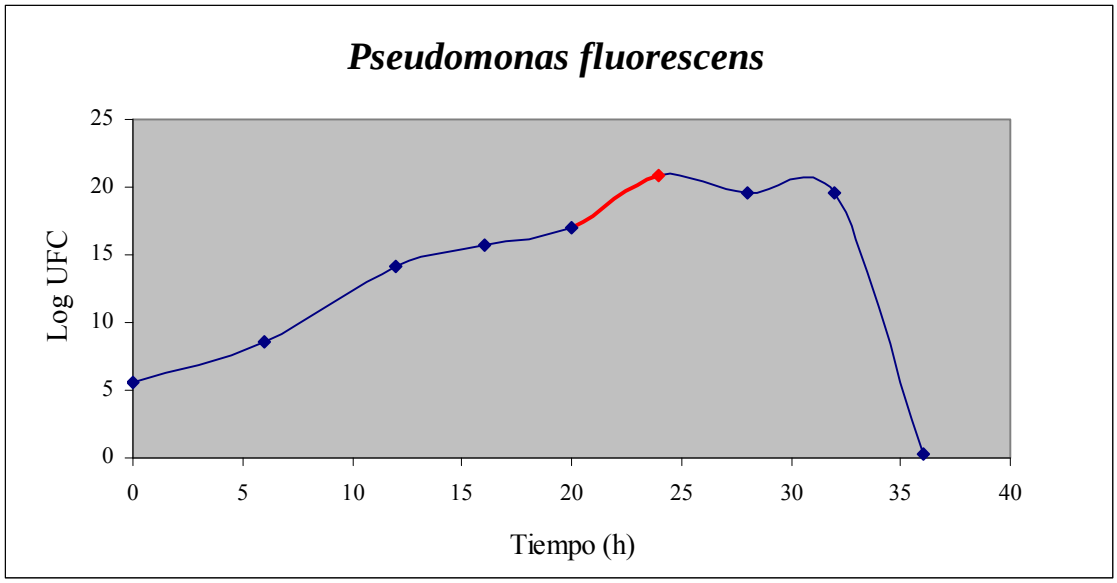



Figura 3.4 Curva de crecimiento *Pseudomonas fluorescens,* crecimiento exponencial en rojo hora 20 a 24.

En el caso de *Pseudomona sp.* se observó un crecimiento exponencial en el lapso de tiempo de la hora 20 a la 24, decayendo en la hora 28, con una corta fase de adaptación en las primeras horas y una fase estacionaria poco diferenciada, pasando prácticamente de crecimiento exponencial a fase de muerte entre las horas 24 y 28 (Figura 3.5).

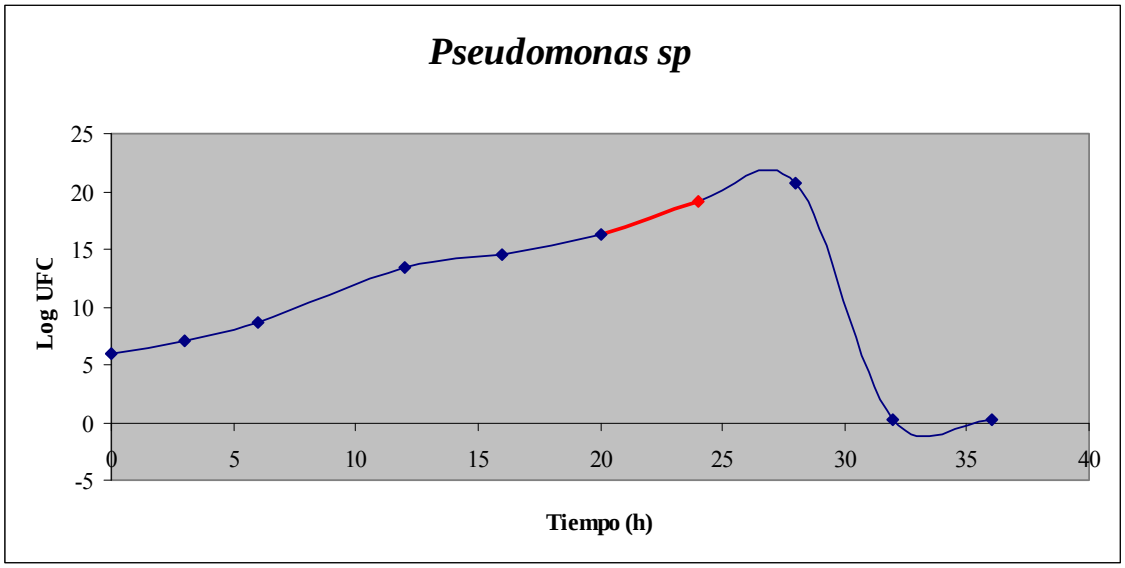



Figura 3.5 Curva de crecimiento *Pseudomonas sp.* crecimiento exponencial en rojo hora 20 a 24.

### 3.1.2 Pruebas de Temperatura

Las pruebas de temperatura realizadas en los tiempos previamente establecidos como de crecimiento exponencial (Figura 3.2, 3.2, 3.3, 3.4 y 3.5) en medio mineral con petróleo como fuente de carbono, en un rango de 20 a 38$^{o}$C con tres repeticiones y un inóculo de 1% para cada una de las cepas.

Mostraron en el caso de *Aeromonas hydrophila* un crecimiento significativo a 30 y 35$^{o}$C, siendo este último el más alto y considerado como óptimo para esta cepa ( Figura 3.6), sin embargo debe tomarse en cuenta el crecimiento a 30$^{o}$C, que es también muy significativo.

En el resto de pruebas realizadas a temperaturas diferentes no se pudo observar un crecimiento significativo.

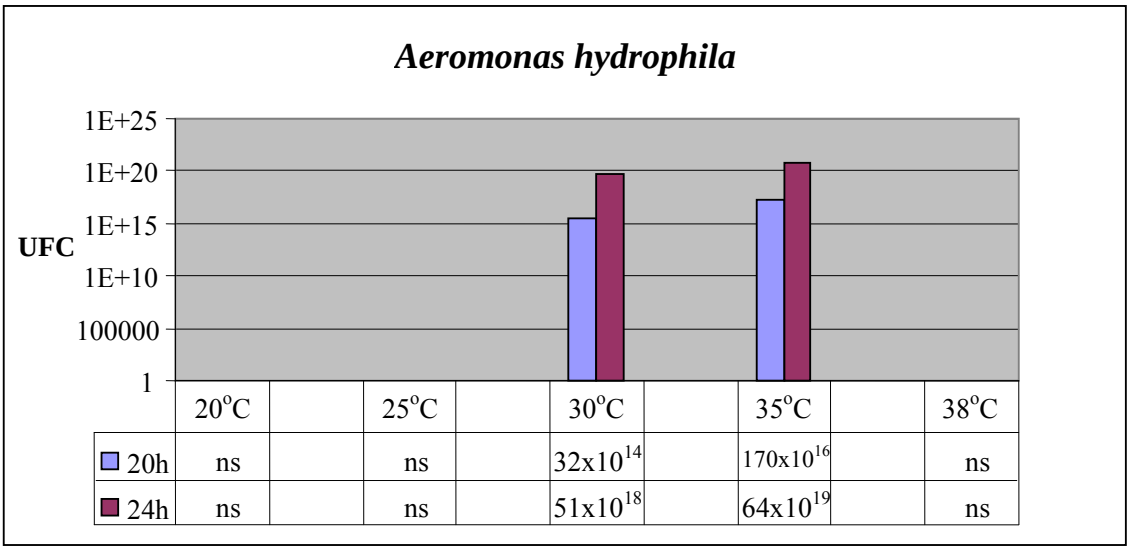



Figura 3.6 Crecimiento a diferentes temperaturas de *Aeromonas hydrophila*, en fase exponencial hora 20 y 24.

Las pruebas realizadas a *Bacillus megaterium,* muestran un crecimiento a 30°C y a 35°C, en el primer muestreo a la hora 8 de incubación a 35°C se observó mayor crecimiento, mientras que a la hora 14 el número de unidades formadoras de colonia es superior a 30°C. A temperaturas superiores o inferiores no se observa crecimiento significativo (Figura 3.7).

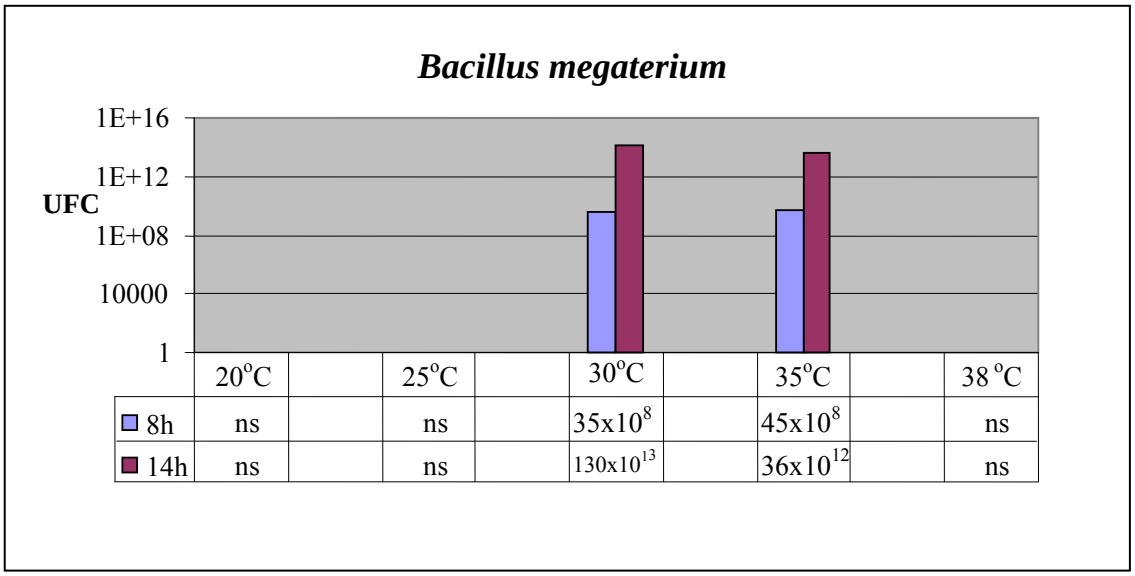



Figura 3.7 Crecimiento de *Bacillus megaterium* a diferentes temperaturas, en fase exponencial hora 8 y 14.

*Burkholderia cepacia,* presenta un crecimiento significativo a una temperatura de 30°C, siendo esta por lo tanto la óptima para su crecimiento, además se observó un crecimiento significativamente alto con un exponente máximo de $10^{18}$ ( Figura 3.8).

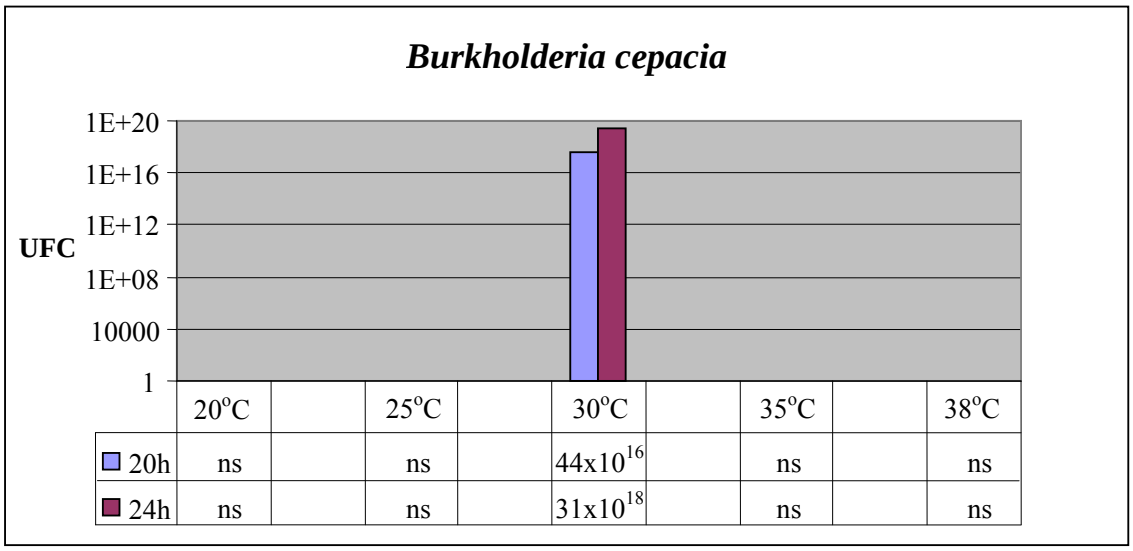



Figura 3.8 Crecimiento significativo de *Burkholderia cepacia* a diferentes temperaturas a las horas 20 y 24 de la fase exponencial.

*Pseudomonas sp.* presentó un crecimiento significativo únicamente a 30°C con exponente de crecimiento máximo de $10^{17}$ en la hora 24 ( Figura 3.9).

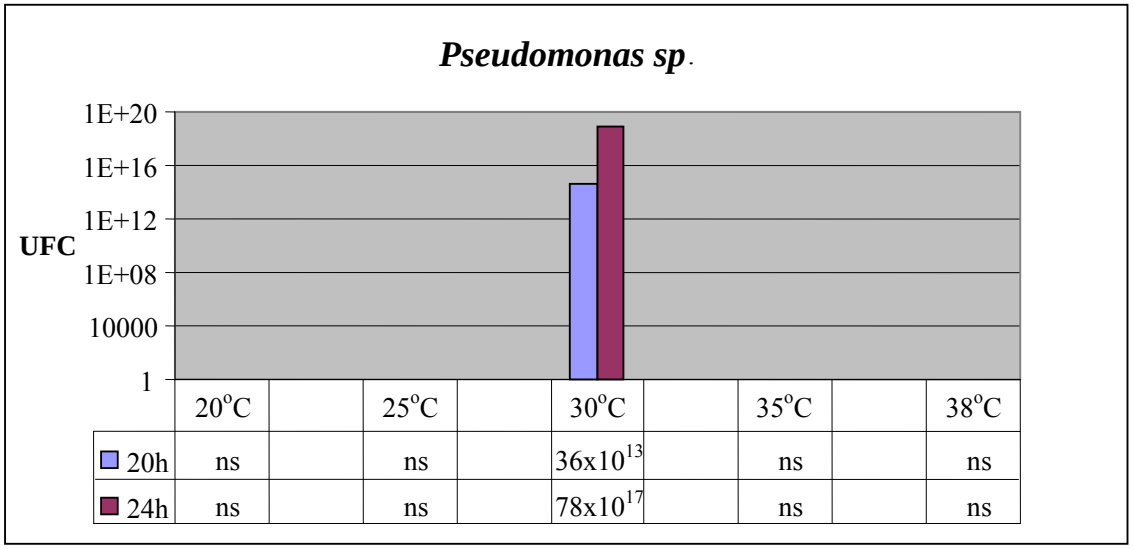



Figura 3.9 Crecimiento significativo de *Pseudomonas sp.* a diferentes temperaturas a las horas 20 y 24 de la fase exponencial.

*Pseudomonas fluorescens,* presenta un crecimiento significativo a 25 y 30°C, siendo esta última en la que mayor crecimiento se pudo registrar en la fase de crecimiento exponencial determinada anteriormente correspondiente a las horas 20 y 24 (Tabla 3.5 y Figura 3.10).

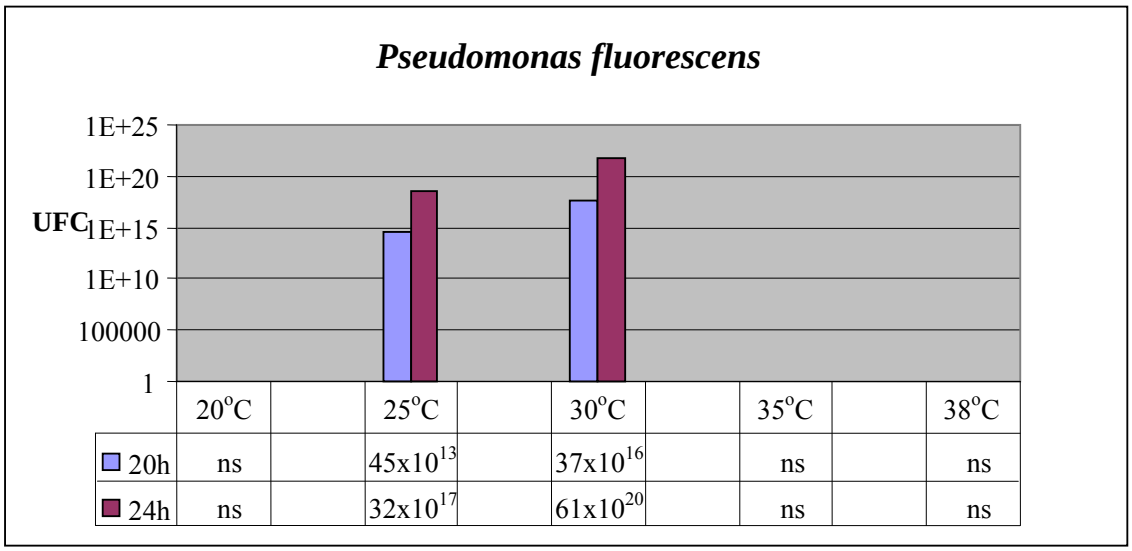



Figura 3.10 Crecimiento significativo de *Pseudomonas fluorescens* a diferentes temperaturas, en fase exponencial hora 20 y 24.

Una vez analizados los crecimientos de todas las cepas se pudo determinar que a 30°C, las cepas que presentan su mayor crecimiento entre las horas 20 y 24 de incubación tienen un comportamiento similar entre ellas, presentando un rango de crecimiento exponencial de $10^{13}$ hasta $10^{20}$, (Figura 3.11).

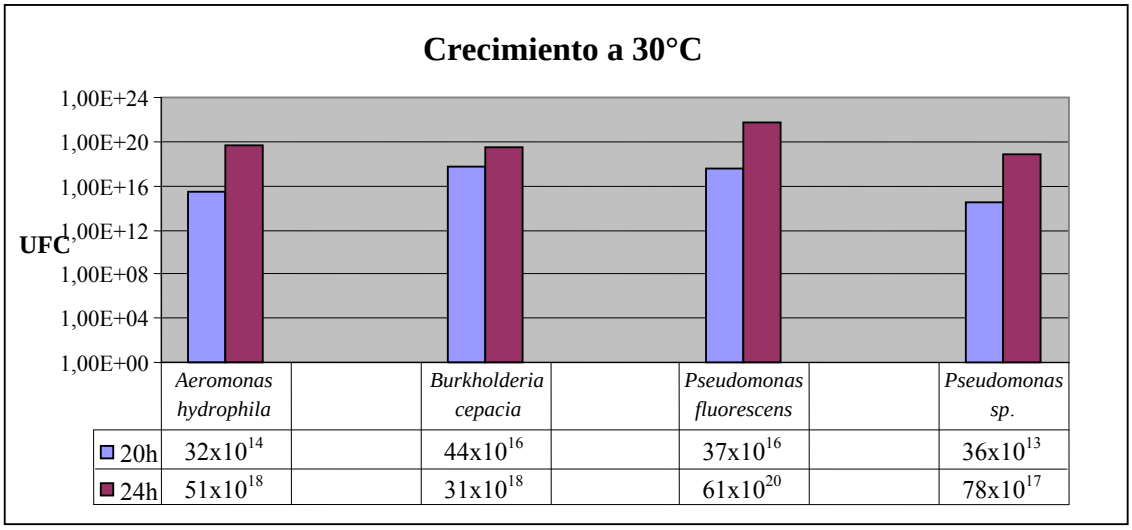



Figura 3.11 Crecimiento de cepas degradadoras de hidrocarburos a 30°C, en fase exponencial hora 20 y 24.

### 3.1.3 Pruebas de pH

Una vez culminadas las pruebas de crecimiento a los diferentes puntos de pH se procedió a la tabulación de los datos y la elaboración de los diferentes gráficos representativos.

En las pruebas realizadas a *Aeromonas hydrophila* se observó un rango de crecimiento importante que va desde pH 6 a 7, siendo este último donde se reporto el más elevado número de UFC (unidades formadoras de colonia) en comparación a los anteriores. En un medio alcalino no se observó un crecimiento significativo (Figura 3.12).

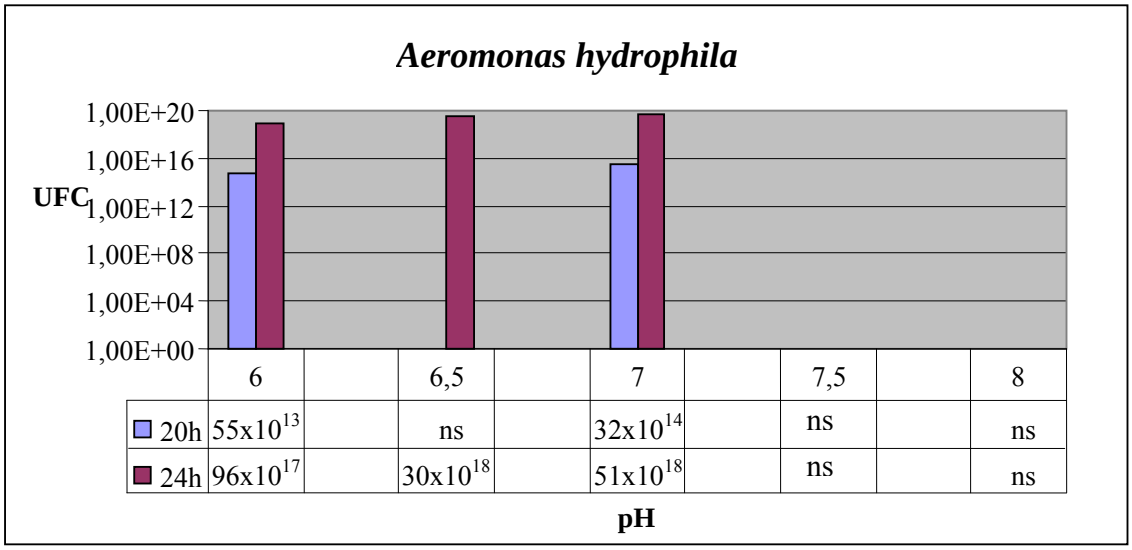



Figura 3.12 Crecimiento significativo de *Aeromonas hydrophila* a diferentes variaciones de pH al inicio y final de su fase de crecimiento exponencial hora 20 y 24.

A pH neutro se observó un crecimiento significativo de *Bacillus megaterium,* mientras que en un medio más ácido o alcalino no se reportó crecimiento, se pudo diferenciar además un alto $10^{12}$ a la hora 14, al final de la fase de exponencial (Figura 3.13).

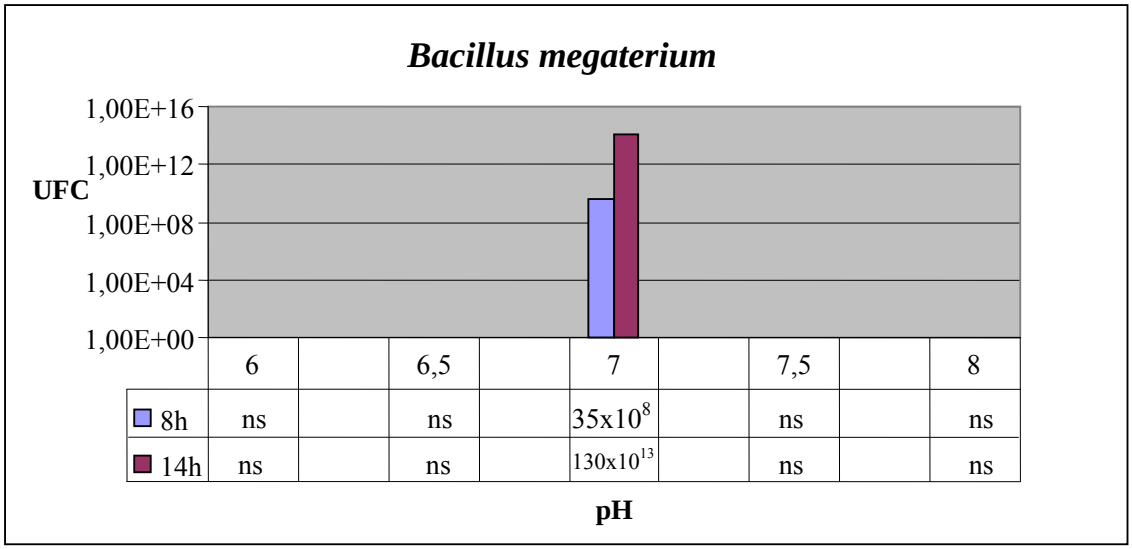



Figura 3.13 Crecimiento significativo de *Bacillus megaterium* a diferentes variaciones de pH al inicio y final de su fase de crecimiento exponencial hora 8 y 14.

Los resultados obtenidos en las pruebas realizadas a *Burkholderia cepacia* muestran un crecimiento significativo únicamente a pH 7, tanto al inicio como al final de la fase de máximo crecimiento antes determinada ( Figura 3.14).

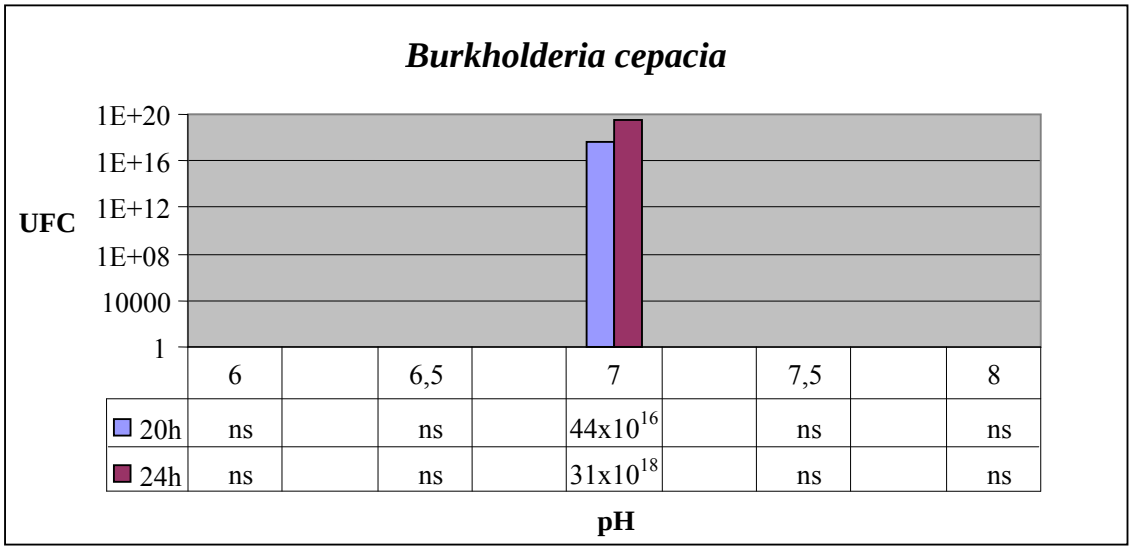



Figura 3.14 Crecimiento de *Burkholderia cepacia* a diferentes variaciones de pH al inicio y final de su fase de crecimiento exponencial hora 20 y 24.

En el reporte de los datos de *Pseudomonas sp.* se pudo comprobar que el crecimiento de esta cepa se da únicamente a pH 7, además se observó que al darse una variación mínima del pH del medio el crecimiento decae esta ser no significativo (Figura 3.15).

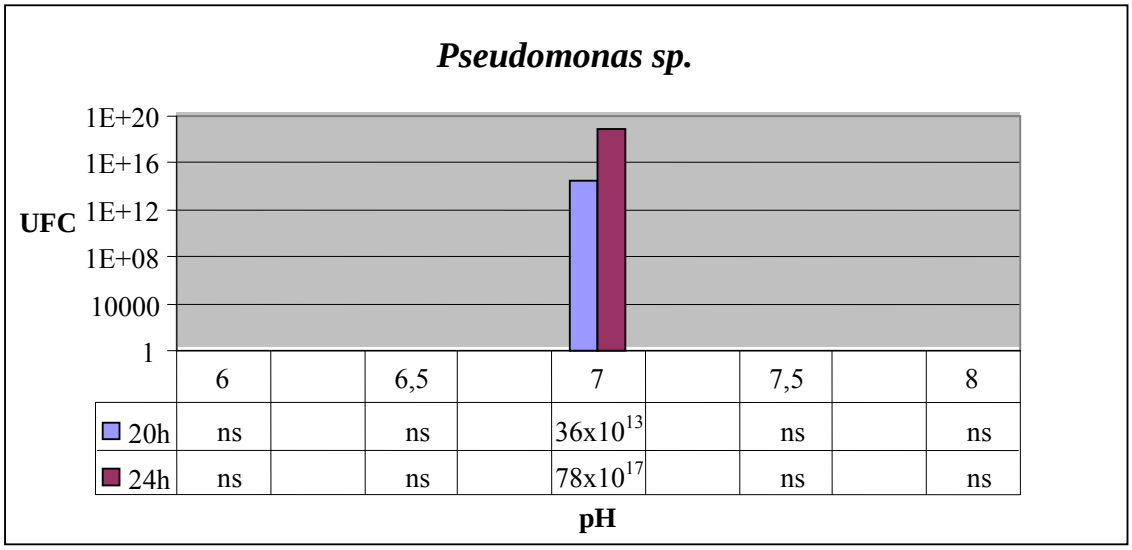



Figura 3.15 Crecimiento de *Pseudomonas sp.* a diferentes variaciones de pH al inicio y final de su fase de crecimiento exponencial hora 20 y 24.

*Pseudomonas fluorescens* presentó un crecimiento a pH 7 y 6,5, sin embargo se pudo observar que el crecimiento a pH 6,5 únicamente se da al inicio de la fase de crecimiento exponencial y al final de la misma no es significativo (Figura 3.16).

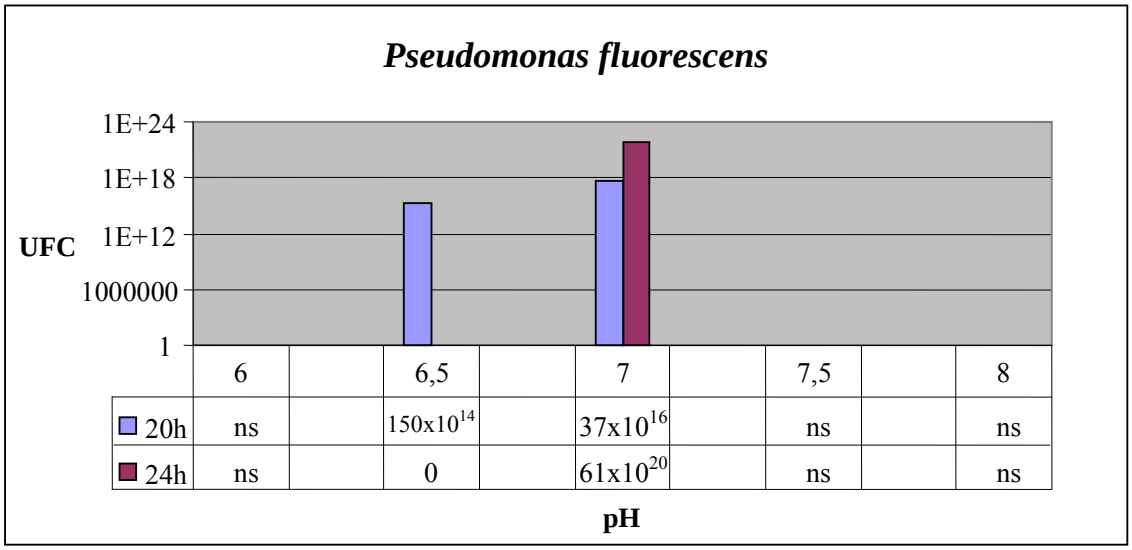



Figura 3.16 Crecimiento de *Pseudomonas sp.* a diferentes variaciones de pH al inicio y final de su fase de crecimiento exponencial hora 20 y 24.

Con todas las pruebas concluidas se pudo observar que el crecimiento significativo es predominante a pH 7 entre las cepas estudiadas, las cepas que presentan su mayor crecimiento entre las horas 20 y 24 de incubación tienen un comportamiento similar entre ellas, presentando un rango de crecimiento exponencial de $10^{13}$ hasta $10^{20}$, (Figura 3.17).

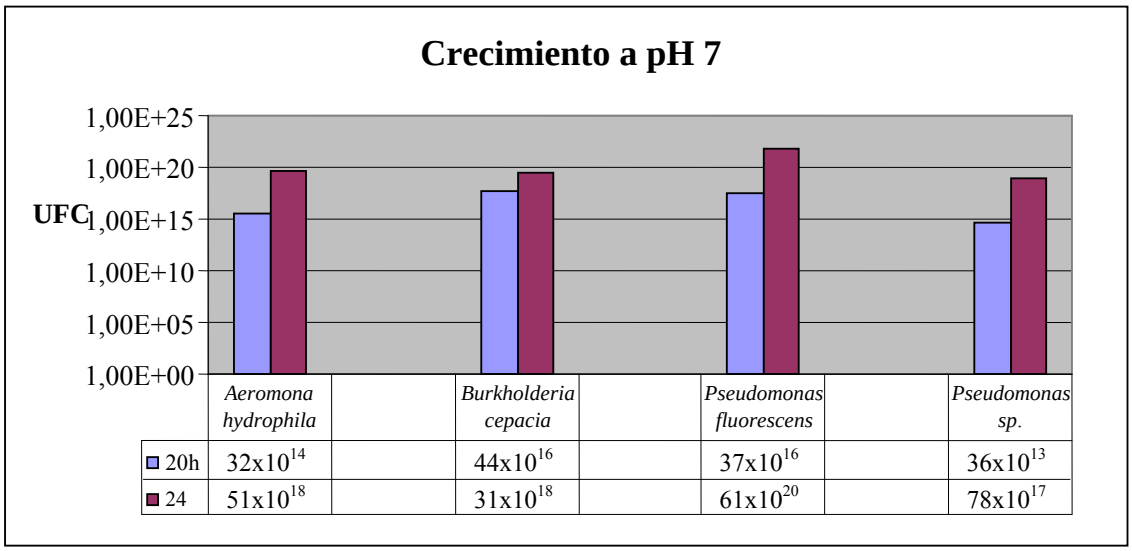



Figura 3.17 Crecimiento de cepas degradadoras de hidrocarburos a pH 7, en fase exponencial hora 20 y 24.

## 3.2 Cinética del Consorcio

### 3.2.1 Pruebas de Antagonismo

Las pruebas de antagonismo realizadas para cada una de las cepas del estudio muestran en el caso de *Aeromonas hydrophila* (cepa 29 en la Figura 3.18) un antagonismo positivo con la *Pseudomona sp.* (cepa 69).

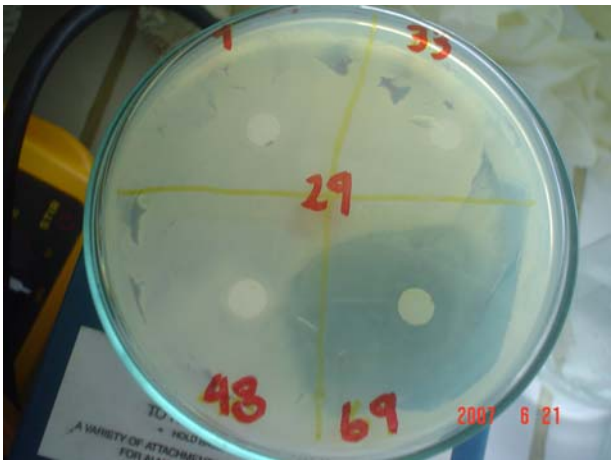



Figura 3.18 Prueba de antagonismo, cepa confrontada *Aeromonas hydrophila*.

El halo de inhibición claramente diferenciado (Figura 3.18), es mayor 5 mm parámetro establecido anteriormente (Capítulo III), mientras que con el resto de cepas confrontadas no se presentaron halos de inhibición (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 Halos de inhibición, cepa confrontada *Aeromonas hydrophila*.

| ***Aeromonas hydrophila* vs** | **I** | **II** | **III** |
|---|---|---|---|
| *Bacillus megaterium* | 0 | 0 | 0 |
| *Burkholderia cepacia* | 0 | 0 | 0 |
| *Pseudomonas fluorescens* | 0 | 0 | 0 |
| *Pseudomonas sp.* | 8 mm | 9 mm | 10 mm |

Al confrontar *Bacillus megaterium* (cepa 1 en la Figura 3.19), se observó la formación de halos de inhibición únicamente con *Pseudomonas sp.*

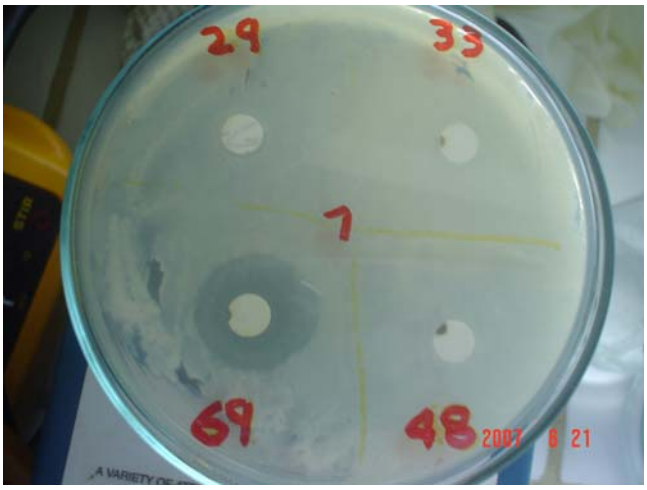



Figura 3.19 Prueba de antagonismo, cepa confrontada *Bacillus megaterium.*

Con un antagonismo positivo ya que los halos formados son mayores a 5 mm, con el resto de cepas no se presentó antagonismo (Tabla 3.2).

Tabla 3.2 Halos de inhibición, cepa confrontada *Bacillus megaterium.*

| ***Bacillus megaterium* vs** | **I** | **II** | **III** |
|---|---|---|---|
| *Aeromonas hydrophila* | 0 | 0 | 0 |
| *Burkholderia cepacia* | 0 | 0 | 0 |
| *Pseudomonas fluorescens* | 0 | 0 | 0 |
| *Pseudomonas sp.* | 8 mm | 11 mm | 7 mm |

Las pruebas realizadas con *Burkholderia cepacia* (cepa 33 en la Figura 3.20) como cepa confrontada dieron como resultado la observación de halos de inhibición únicamente con *Pseudomonas sp.* (cepa 69).

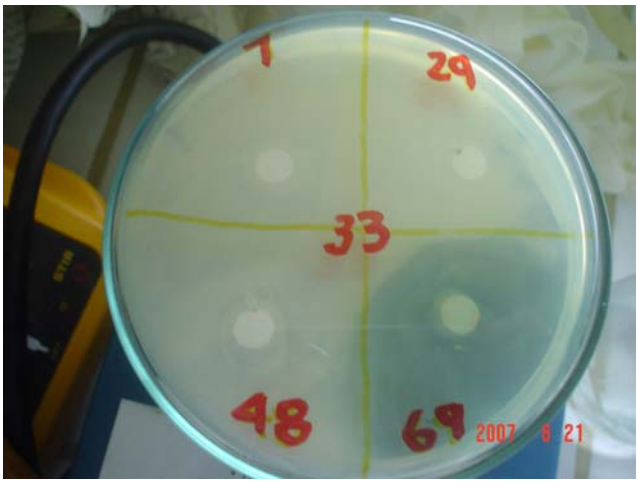



Figura 3.20 Prueba de antagonismo, cepa confrontada *Burkholderia cepacia.*

Con un mínimo de 10 mm y un máximo de 15 mm de diámetro del halo formado en las tres repeticiones, que representó el porcentaje de inhibición más alto registrado como positivo (Tabla 3.3).

Tabla 3.3 Halos de inhibición, cepa confrontada *Burkholderia cepacia.*

| ***Burkholderia cepacia* vs** | **I** | **II** | **III** |
|---|---|---|---|
| *Bacillus megaterium* | 0 | 0 | 0 |
| *Aeromona hydrophila* | 0 | 0 | 0 |
| *Pseudomonas fluorescens* | 0 | 0 | 0 |
| *Pseudomonas sp.* | 10 mm | 15mm | 14mm |

*Pseudomonas fluorescens* (cepa 48 en la figura 3.21), presentó un antagonismo positivo con *Pseudomonas sp.* al producirse halos de inhibición de un diámetro mayor a los 5 mm.

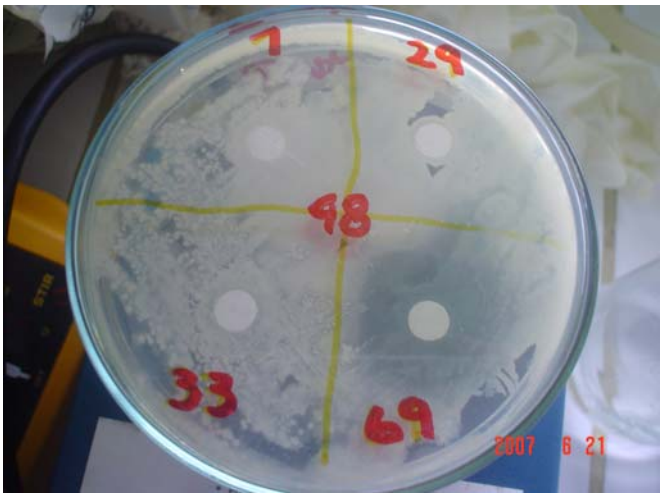



Figura 3.21 Prueba de antagonismo, cepa confrontada *Pseudomonas fluorescens.*

Con el resto de cepas confrontadas no se observó la formación de ningún halo y por tanto se estableció un antagonismo negativo (Tabla 3.4).

Tabla 3.4 Halos de inhibición, cepa confrontada, *Pseudomonas fluorescens*

| ***Pseudomonas fluorescens* vs** | **I** | **II** | **III** |
|---|---|---|---|
| *Bacillus megaterium* | 0 | 0 | 0 |
| *Aeromonas hydrophila* | 0 | 0 | 0 |
| *Burkholderia cepacia* | 0 | 0 | 0 |
| *Pseudomonas sp.* | 9 mm | 10 mm | 11 mm |

Al realizar las pruebas de antagonismo a *Pseudomonas sp.* se pudo observar que no se registra antagonismos con ninguna de las cepas con las que fue confrontadas (Figura 3.22).

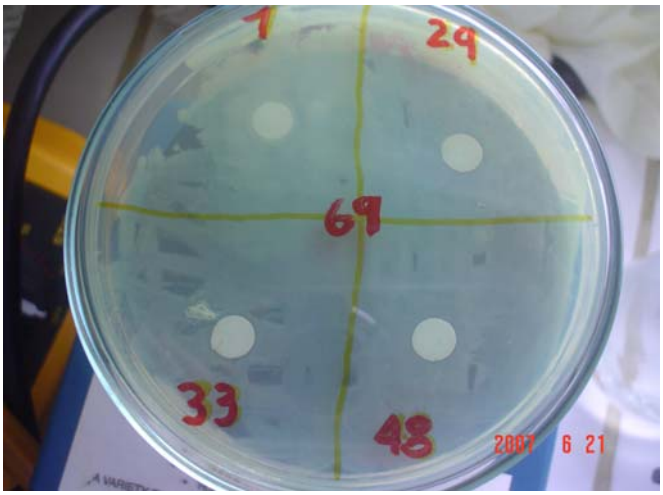



Figura 3.22 Prueba de antagonismo, cepa confrontada *Pseudomonas sp.*

No se reportó la formación de halos de inhibición en ninguna de las repeticiones realizas en esta prueba (Tabla 3.5).

Tabla 3.5 Halos de inhibición, cepa confrontada *Pseudomonas sp.*

| ***Pseudomonas sp.* vs** | **I** | **II** | **III** |
|---|---|---|---|
| *Bacillus megaterium* | 0 | 0 | 0 |
| *Aeromona hydrophila* | 0 | 0 | 0 |
| *Burkholderia cepacia* | 0 | 0 | 0 |
| *Pseudomonas fluorescens* | 0 | 0 | 0 |

### 3.2.2 Pruebas de actividad emulsificante

Luego de culminadas las pruebas de actividad emulsificante, se reportó de cada una de las cepas de estudio las UAE/ml, correspondiente a su respectiva absorbancia. Los valores van desde 1,204 para *Aeromonas hydrophila* siendo el menor registrado hasta 2.379 para *Pseudomonas fluorescens*, la que presenta una mayor actividad registrada, el resto de cepas se encuentra dentro de este rango (Tabla 3.6).

Tabla 3.6 Actividad emulsificante de microorganismos degradadores de hidrocarburos.

| **Bacteria** | **Absorbancia** | **UAE/ml** |
|---|---|---|
| *Aeromonas hydrophila* | 0.983 | 1.204 |
| *Bacillus megaterium* | 1.175 | 1.439 |
| *Burkholderia cepacia* | 1.931 | 2.366 |
| *Pseudomonas fluorescens* | 1.942 | 2.379 |
| *Pseudomonas sp* | 1.872 | 2.294 |

Equivalencia: 0.816 de absorbancia= 1 UAE/ml (Goldman et al., 1982).

### 3.2.3 Curva de Crecimiento

Una vez conformado el consorcio con las cepas *Aeromonas hydrophila, Bacillus megaterium, Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas fluorescens*, se procedió a la conformación de la curva de crecimiento con muestreos sucesivos hasta completar las 36 horas de incubación.

Una vez obtenidos los datos se pudo observar las diferentes fases de crecimiento tanto exponencial como estacionario dentro de la misma curva, propias de la interacción de los distintos organismos (Figura 3.23).

Además se tomó en cuenta el crecimiento entre las horas 20 y 24 en donde se observó una tendencia de crecimiento continuo para la realización de las correspondientes pruebas de pH y temperatura (Figura 3.23).

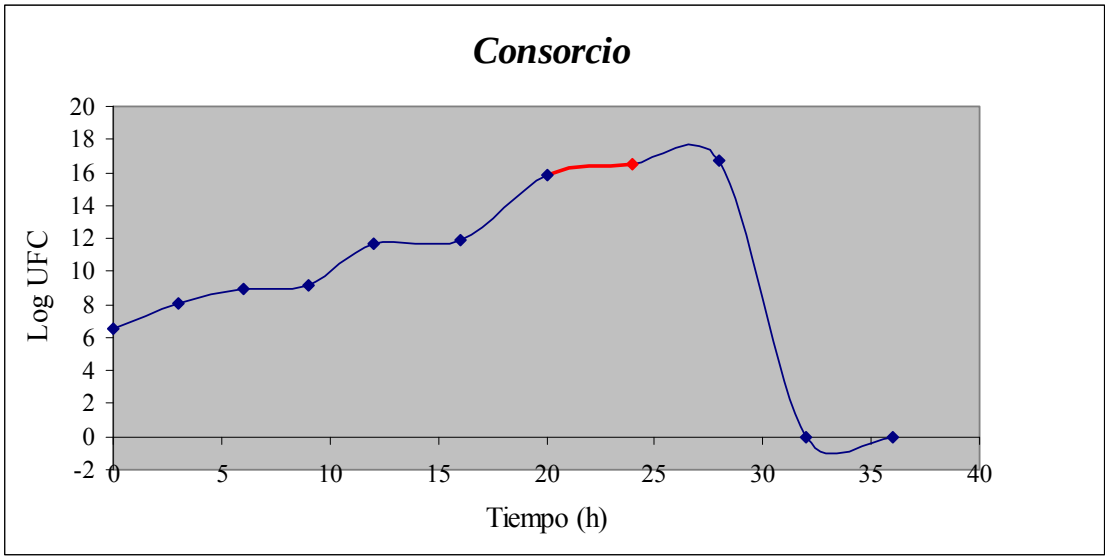
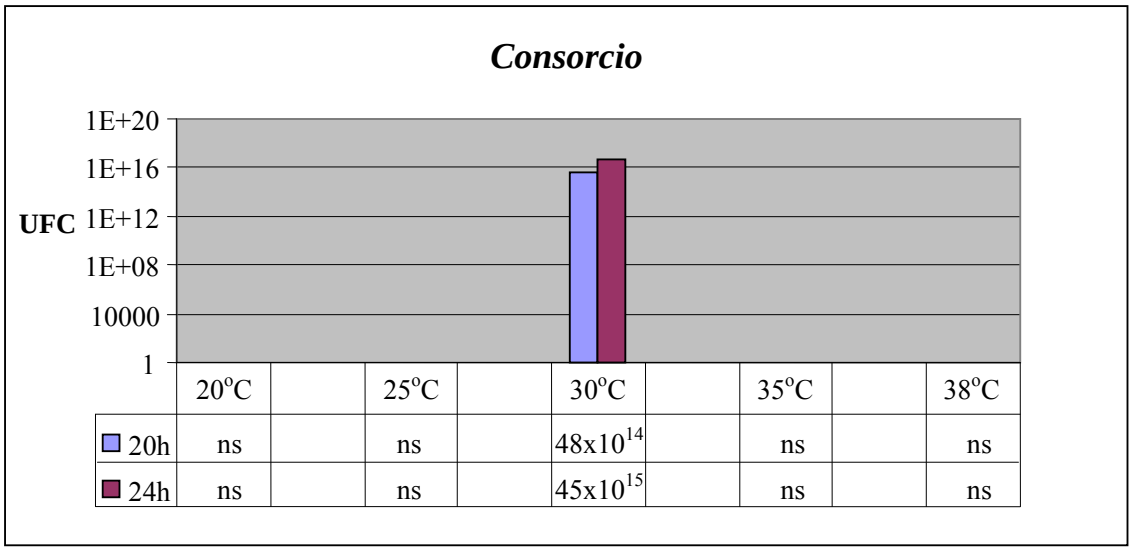



Figura 3.23 Curva de crecimiento consorcio, fase exponencial en rojo horas 20 y 24 de incubación.

### 3.2.4 Pruebas de Temperatura

El crecimiento del consorcio solo fue significativo a 30°C con un crecimiento máximo de $10^{15}$ al final de la etapa de crecimiento seleccionada (Figura 3.24).




| | 20°C | | 25°C | | 30°C | | 35°C | | 38°C |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 20h | ns | | ns | | $48x10^{14}$ | | ns | | ns |
| 24h | ns | | ns | | $45x10^{15}$ | | ns | | ns |

Figura 3.24 Crecimiento del consorcio bacteriano a diferentes temperaturas en su fase exponencial de la hora 20 a la 24.

### 3.2.5 Pruebas de pH

Las pruebas de pH realizas para el consorcio dieron como resultado un crecimiento significativo a pH neutro en la fase de exponencial anteriormente determinada, además se pudo observar que cualquier variación de pH da como resultado un crecimiento no significativo (Figura 3.25).

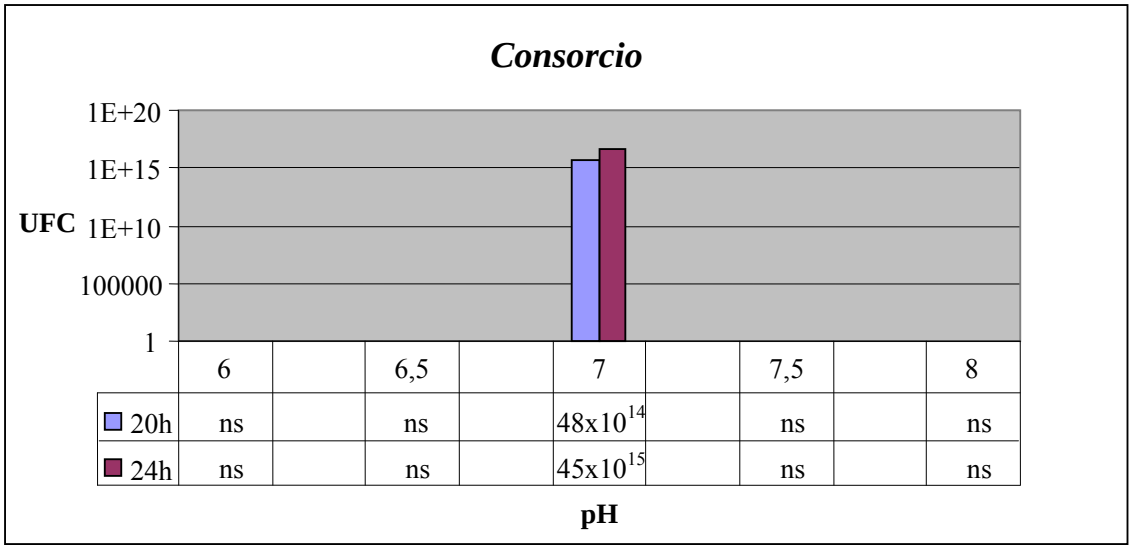



Figura 3.25 Crecimiento del consorcio bacteriano a diferentes variaciones de pH en su fase exponencial de la hora 20 a la 24.

## 3.3 Análisis Estadístico

### 3.3.1 Pruebas de Temperatura

Al establecer los análisis de variancia para las unidades formadoras de colonia de cinco cepas y el consorcio formado por cuatro de ellas bajo el efecto de temperaturas y tiempo, se detectó diferencias estadísticas para tratamientos a nivel del 1% y 5%. Al desglosar los grados de libertad para tratamientos se observó diferencias estadísticas entre las cepas al nivel del 1% y el 5% ; dentro de la cepa 1 (*Aeromonas hydrophila)* se encontró diferencias estadísticas entre temperaturas, tiempo y al mismo nivel significación estadística en la interacción temperaturas por tiempo, igualmente dentro

de la cepa 2 (*Bacillus megaterium)*, en la cepa 4 (*Pseudomonas fluorescens)* se encontró diferencias estadísticas entre temperaturas, tiempo y el mismo nivel de significación estadística en la interacción temperatura por tiempo; los tiempos se diferenciaron dentro de la temperatura 1 a nivel del 1% y 5% en las cepas 3( *Burkholderia cepacia)*, 5 (*Pseudomonas sp.)* y en el consorcio (Tabla 3.7 ).

El promedio general del número de unidades formadoras de colonia fué de $38x10^{19}$ con un coeficiente de variación de 0.22.

Tabla 3.7 Análisis de variancia para las unidades formadoras de colonia de 5 cepas y su consorcio bajo el efecto de temperaturas y tiempo. Transformación Log (x+2)

| **FUENTES DE VARIACION** | **GL** | **SUMA DE CUADRADOS** | **CUADRADOS MEDIOS** | **F** |
|---|---|---|---|---|
| Total | 53 | 590,62 | | |
| Tratamientos. | 17 | 590,57 | 34,7 | 24241,94 ** |
| entre cepas | (5) | 371,93 | 74,39 | 53135,71 ** |
| Consorcio vs C1,C2.C3.C4 | 1 | 0.43 | 0.43 | 296.66 ** |
| Resto | 4 | 371.50 | 92.875 | 66339.28** |
| **Cepa 1** | (3) | 51,77 | 17,26 | 12328,57 ** |
| Temperatura. | 1 | 5,95 | 5,95 | 4250,00 ** |
| Tiempo | 1 | 45,54 | 45,54 | 32528,57 ** |
| Temp. x Tiempo | 1 | 0,29 | 0,29 | 207,14 ** |
| **Cepa 2** | (3) | 54,33 | 18,11 | 12935,7 ** |
| Temperatura. | 1 | 0,15 | 0,15 | 107,14 ** |
| Tiempo | 1 | 53,85 | 53,85 | 38464,28 ** |
| Temp. x Tiempo | 1 | 0,33 | 0,33 | 235,71 ** |
| **Cepa 3** | 1 | 5,16 | 5,16 | 3685,71 ** |
| **Cepa 4** | (3) | 77,76 | 25,92 | 18514,28 ** |
| Temperatura tiempo. | 1 | 28,88 | 28,88 | 20628,57 ** |
| Tiempo | 1 | 48,78 | 48,78 | 34842,85 ** |
| Temp. x Tiempo | 1 | 0,1 | 0,1 | 71,42 ** |
| **Cepa 5** | 1 | 28,21 | 28,21 | 20150 ** |
| **Consorcio** | 1 | 1,41 | 1,41 | 1007,14 ** |
| **Error** | 36 | 0,05 | 0,0014 | |
| **$\bar{x}$( )** | | **REAL:** $38x10^{19}$ | **TRANSFOR:** 16.42 | |
| **CV(%)** | | 0.22 | | |

Los mayores promedios de unidades formadoras de colonia se presentaron con las cepas 3 (*Burkholderia cepacia)*, cepa 1 (*Aeromonas hydrophila)* y cepa 4 (*Pseudomonas fluorescens)*, los menores promedios correspondieron a la cepa 2 (*Bacillus megaterium)*. Vale manifestar que el consorcio presentó un promedio intermedio, las pruebas de significancia mostraron una diferencia estadística entre las cepas (Tabla 3.8).

Tabla 3.8 Promedios de las unidades formadoras de colonia para cada una de las cepas en estudio. Transformación Log (x+2)

| CEPAS | UFC. REAL | UFC.TRANSFOR. | RANGO |
|---|---|---|---|
| C1 *Aeromonas hydrophila* | 174 $x10^{18}$ | 18,31 | b |
| C2 *Bacillus megaterium* | 42 $x10^{12}$ | 11,72 | f |
| C3 *Burkholderia cepacia* | 157 $x10^{17}$ | 18,56 | a |
| C4 *Pseudomonas fluorescens* | 153 $x10^{19}$ | 18,13 | c |
| C5 *Pseudomonas sp.* | 39 $x10^{17}$ | 16,72 | d |
| Consorcio | 249 $x10^{14}$ | 16,17 | e |

Dentro de la cepa 1 (*Aeromonas hydrophila)* a una mayor temperatura se incrementó las unidades formadores de colonia, además se determinó la independencia de cada una de las temperaturas con la prueba de significancia (Tabla 3.9).

Tabla 3.9 Efecto de la temperatura sobre las unidades formadoras de colonia, dentro de *Aeromonas hydrophila.* Transformación Log (x+2)

| TEMPERATURA | UFC. REAL | UFC.TRANSFOR. | RANGO |
|---|---|---|---|
| X1 (30$^{o}$C) | 257 $x10^{17}$ | 17,61 | b |
| X2 (35$^{o}$C) | 32 $x10^{19}$ | 19,01 | a |

A medida que aumentó el tiempo se incrementó el promedio de las unidades formadoras de colonia, cada tiempo es diferente estadísticamente (Tabla 3.10).

Tabla 3.10 Efecto del tiempo sobre las unidades formadoras de colonia, dentro de la cepa *Aeromonas hydrophila.* Transformación Log (x+2)

| TIEMPO | UFC. REAL | UFC.TRANSFOR. | RANGO |
|---|---|---|---|
| H1 (20h) | 85 $x10^{15}$ | 16,36 | b |
| H2 (24h) | 35 $x10^{19}$ | 20,26 | a |

Al analizar el efecto conjunto temperaturas por tiempo se aprecia que dentro de la temperatura 1 se produjo una mayor diferencia de las unidades formadoras de colonia entre los tiempos pero con promedios bajos que dentro de la temperatura 2, donde los promedios son mayores, existe independencia dentro de los ensayos (Tabla 3.11).

Tabla 3.11 Efecto conjunto de la temperatura por tiempo sobre las unidades formadoras de colonia, dentro de *Aeromonas hydrophila.* Transformación Log (x+2)

| TEMPERATURA x TIEMPO | UFC. REAL | UFC.TRANSFOR. | RANGO |
|---|---|---|---|
| X1H1 | 32 $x10^{14}$ | 15,50 | d |
| X1H2 | 166 $x10^{15}$ | 17,22 | c |
| X2H1 | 51 $x10^{18}$ | 19,17 | b |
| X2H2 | 64 $x10^{19}$ | 20,81 | a |

Dentro de la cepa 2 (*Bacillus megaterium)* las temperaturas se diferenciaron estadísticamente mediante la prueba de Tukey al 5%. El mejor crecimiento se presentó a 30$^{o}$C
(Tabla 3.12).

Tabla 3.12 Efecto de la temperatura sobre las unidades formadoras de colonia, dentro de *Bacillus megaterium.* Transformación Log (x+2)

| TEMPERATURA | UFC. REAL | UFC.TRANSFOR. | RANGO |
|---|---|---|---|
| X1 (30$^{o}$C) | 65 $x10^{12}$ | 11,83 | a |
| X2 (35$^{o}$C) | 180 $x10^{11}$ | 11,60 | b |

Con respecto al tiempo existen diferencias significativas entre las dos horas de muestreo, presentado por los rangos de significancia (Tabla 3.13).

Tabla 3.13 Efecto del tiempo sobre las unidades formadoras de colonia, dentro de *Bacillus megaterium.* Transformación Log (x+2).

| TIEMPO | UFC. REAL | UFC.TRANSFOR. | RANGO |
|---|---|---|---|
| H3 (8h) | 40 $x10^{8}$ | 9,6 | b |
| H4 (14h) | 83$x10^{12}$ | 13,91 | a |

Al analizar el efecto conjunto temperaturas x tiempo se puede apreciar dentro del tiempo 3 un leve incremento de las unidades formadoras de colonia al aumentar la temperatura, mientras que dentro del tiempo 4 se produjo una disminución al incrementar la temperatura, los ensayos son independientes estadísticamente (Tabla 3.14).

Tabla 3.14 Efecto conjunto de la temperatura por tiempo sobre las unidades formadoras de colonia, dentro de *Bacillus megaterium.* Transformación Log (x+2).

| TEMPERATURA x TIEMPO | UFC. REAL | UFC.TRANSFOR. | RANGO |
|---|---|---|---|
| X1H3 | 35 $x10^{8}$ | 9,54 | d |
| X2H3 | 45 $x10^{8}$ | 9,65 | c |
| X1H4 | 130 $x10^{12}$ | 14,11 | a |
| X2H4 | 36 $x10^{12}$ | 13,56 | b |

Dentro de la temperatura 1 a medida que se incrementó el tiempo aumentó las unidades formadoras de colonia de la cepa 3 (*Burkholderia cepacia)*, el crecimiento en cada uno de los tiempos es estadísticamente diferente (Tabla 3.15).

Tabla 3.15 Efecto del tiempo sobre las unidades formadoras de colonia, dentro de *Burkholderia cepacia*, en la temperatura 1. Transformación Log (x+2)

| TEMPERATURA 1x TIEMPO | UFC. REAL | UFC.TRANSFOR. | RANGO |
|---|---|---|---|
| X1H1 | 44 $x10^{16}$ | 17,64 | b |
| X1H2 | 31 $x10^{18}$ | 19,49 | a |

A medida que se incremento la temperatura disminuyó las unidades formadoras de colonia dentro de la cepa 4 (*Pseudomonas fluorescens),* los dos ensayos son independientes estadísticamente (Tabla 3.16).

Tabla 3.16 Efecto de la temperatura sobre las unidades formadoras de colonia, dentro de *Pseudomonas fluorescens.* Transformación Log (x+2)

| TEMPERATURA | UFC. REAL | UFC.TRANSFOR. | RANGO |
|---|---|---|---|
| X1 (30°C) | 31 $x10^{20}$ | 19,68 | a |
| X2 (35°C) | 158 $x10^{16}$ | 16,58 | b |

A un mayor tiempo las unidades formadoras de colonia se incrementaron dentro de *Pseudomonas fluorescens*, existen una diferencia estadística en los ensayos mayor al 5% (Tabla 3.17).

Tabla 3.17 Efecto del tiempo sobre las unidades formadoras de colonia, dentro de *Pseudomonas fluorescens.* Transformación Log (x+2)

| TIEMPO | UFC. REAL | UFC.TRANSFOR. | RANGO |
|---|---|---|---|
| H1 (20h) | 187 $x10^{15}$ | 16,11 | b |
| H2 (24h) | 31 $x10^{20}$ | 20,14 | a |

Al analizar el efecto conjunto temperatura por tiempo se encontró que bajo la temperatura 2 y tiempo 2 se logró el mayor promedio de unidades formadoras de colonia, mientras que el menor promedio corresponde a la temperatura 1 bajo el tiempo 2, las temperaturas evaluadas son independientes estadísticamente (Tabla 3.18).

Tabla 3.18 Efecto conjunto temperatura por tiempo sobre las unidades formadoras de colonia, dentro *Pseudomonas fluorescens.* Transformación Log (x+2)

| TEMPERATURA x TIEMPO | UFC. REAL | UFC.TRANSFOR. | RANGO |
|---|---|---|---|
| X2H1 | 37 $x10^{16}$ | 17,57 | c |
| X2H2 | 45 $x10^{13}$ | 14,65 | d |
| X1H1 | 32 $x10^{17}$ | 18,50 | b |
| X1H2 | 61$x10^{20}$ | 21,79 | a |

Dentro de la cepa 5 (*Pseudomonas sp.)* las unidades formadoras de colonia se incrementaron a aumentar el tiempo dentro de la temperatura 1, cada ensayo efectuado presenta diferencias estadísticas (Tabla 3.19).

Tabla 3.19 Efecto del tiempo sobre las unidades formadoras de colonia en la temperatura 1, dentro de *Pseudomonas sp*. Transformación Log (x+2).

| TEMPERATURA x TIEMPO | UFC. REAL | UFC.TRANSFOR. | RANGO |
|---|---|---|---|
| X1H1 | 36 $x10^{13}$ | 14,56 | b |
| X1H2 | 78 $x10^{17}$ | 18,89 | a |

En el consorcio se observó que las unidades formadoras de colonia se incrementaron a aumentar el tiempo dentro de la temperatura 1, los datos son independientes entre sí (Tabla 3.20).

Tabla 3.20 Efecto del tiempo sobre las unidades formadoras de colonia en la temperatura 1, dentro del consorcio. Transformación Log (x+2)

| TEMPERATURA x TIEMPO | UFC. REAL | UFC.TRANSFOR. | RANGO |
|---|---|---|---|
| X1H1 | 44 $x10^{14}$ | 15,68 | b |
| X1H2 | 45 $x10^{15}$ | 16,65 | a |

Al analizar todos los tratamientos se puede manifestar que el mayor número de unidades formadores de colonia se presentaron con el tratamiento T12 con un promedio de 61 $x10^{20}$, mientras que el menor promedio se presento con el tratamiento T5 que

alcanzó $35x10^8$, además se pudo observar que cada uno de los tratamientos es independiente entre si (Tabla 3.21, Anexo 1).

Tabla 3.21 Efecto de los tratamientos sobre las unidades formadoras de colonia. Transformación Log (x+2)

| TRATAMIENTOS | UFC. REAL | UFC.TRANSFOR. | RANGO |
|---|---|---|---|
| T1 | $32\ x10^{14}$ | 15,50 | l |
| T2 | $51\ x10^{18}$ | 19,71 | c |
| T3 | $167\ x10^{15}$ | 17,22 | i |
| T4 | $64\ x10^{19}$ | 20,81 | b |
| T5 | $35x10^{8}$ | 9,54 | r |
| T6 | $130\ x10^{12}$ | 14,11 | o |
| T7 | $45\ x10^{8}$ | 9,65 | q |
| T8 | $36\ x10^{12}$ | 13,56 | p |
| T9 | $44\ x10^{16}$ | 17,64 | g |
| T10 | $31\ x10^{18}$ | 19,49 | d |
| T11 | $37\ x10^{16}$ | 17,57 | h |
| T12 | $61\ x10^{20}$ | 21,79 | a |
| T13 | $45\ x10^{13}$ | 14,65 | m |
| T14 | $32\ x10^{17}$ | 18,50 | f |
| T15 | $36\ x10^{13}$ | 14,56 | n |
| T16 | $78\ x10^{17}$ | 18,89 | e |
| T17 | $48\ x10^{14}$ | 15,68 | k |
| T18 | $45\ x10^{15}$ | 16,65 | j |

### 3.3.2 Pruebas de pH

Al establecer el análisis de variancia para las unidades formadoras de colonia se detecto diferencias estadísticas entre tratamientos. Al desglosar los grados de libertad para tratamientos se detectó diferencias estadísticas a nivel del 1% y 5% entre cepas y en la comparación del consorcio vs las cepas por separado; dentro de la cepa 1 y cepa 4 se encontró diferencias estadísticas entre los pH, tiempos y el mismo nivel significación estadística en la interacción pH por tiempo dentro de las cepas 3, 5.

En el consorcio los tiempos se diferenciaron dentro del pH1. El coeficiente de variación fue de 0,28 (Tabla 3.22).

Tabla 3.22 Análisis de variancia para las unidades formadoras de colonia de 5 cepas y el consorcio formado entre ellas bajo el efecto del pH y tiempo. Transformación Log (x+2)

| FUENTES DE VARIACION | GL | SUMA DE CUADRADOS | CUADRADOS MEDIOS | F |
|---|---|---|---|---|
| Total | 53 | 1862,2 | | |
| Tratamientos | 17 | 1862,14 | 109,53 | 60850 ** |
| entre cepas | 5 | 176,22 | 35,24 | 19577,77 ** |
| Consorcio vs C1,C2.C3.C4 | 1 | 8.25 | 8.25 | 4589.60 ** |
| Resto | 4 | 167.97 | 41.99 | 23329.16 ** |
| **Cepa 1** | 5 | 822,59 | 164,52 | 91400.00 ** |
| pH | 2 | 217,28 | 108,64 | 60355,55 ** |
| Tiempo | 1 | 381,53 | 381,53 | 211961,11** |
| Tiempo x pH | 2 | 223,78 | 111,89 | 62161,11 ** |
| **Cepa 2** | 1 | 31,32 | 31,32 | 17400,00 ** |
| **Cepa 3** | 1 | 5,16 | 5,16 | 2866,66 ** |
| **Cepa 4** | 3 | 364,58 | 121,53 | 67516,66 ** |
| pH | 1 | 22,02 | 22,02 | 12233,33 ** |
| Tiempo | 1 | 90,42 | 90,42 | 50233,33 ** |
| Tiempo x pH | 1 | 266,05 | 266,05 | 147805,55** |
| **Cepa 5** | 1 | 28,21 | 28,21 | 15672,22 ** |
| **Consorcio** | 1 | 1,41 | 1,41 | 783,33 ** |
| **Error** | 36 | 0,0647 | 0,0018 | |
| **$\bar{x}$( )** | | **REAL**: $35x10^{19}$ | **TRANSFOR**: 15.06 | |
| **CV(%)** | | 0.28 | | |

La cepa 4 (*Pseudomonas fluorescens)* presentó el mayor promedio de unidades formadores de colonia con 153 $x10^{19}$, mientras que el menor promedio correspondió a la cepa 2 (*Bacillus megaterium)* con un promedio de 65 $x10^{12}$. El consorcio presentó un promedio intermedio de 249 $x10^{15}$ (Tabla 3.23).

Tabla 3.23 Promedios de las unidades formadoras de colonia para cada una de las cepas y el consorcio. Transformación Log (x+2).

| CEPAS | UFC. REAL | UFC.TRANSFOR. | RANGO |
|---|---|---|---|
| C1 *Aeromonas hydrophila* | 152 $x10^{17}$ | 14,79 | d |
| C2 *Bacillus megaterium* | 65 $x10^{12}$ | 11,83 | f |
| C3 *Burkholderia cepacia* | 157 $x10^{17}$ | 13,96 | e |
| C4 *Pseudomonas fluorescens* | 153 $x10^{19}$ | 18,56 | a |
| C5 *Pseudomonas sp.* | 39 $x10^{17}$ | 16,72 | b |
| Consorcio | 249 $x10^{15}$ | 16,17 | c |

Los tratamientos a pH 7 y 6,5 no difieren estadísticamente ya que comparten el mismo rango de significancia, el crecimiento disminuyó cuando se presentó un descenso de pH (Tabla 3.24).

Tabla 3.24 Efecto del pH sobre las unidades formadoras de colonia, dentro de *Aeromonas hydrophila.* Transformación Log (x+2).

| pH | UFC. REAL | UFC.TRANSFOR. | RANGO |
|---|---|---|---|
| P1 (7) | 155 $x10^{19}$ | 12.00 | a |
| P2 (6,5) | 76 $x10^{17}$ | 12.00 | a |
| P3 (6) | 48 $x10^{17}$ | 6.00 | b |

Cuando se incrementa el tiempo aumenta las unidades formadoras de colonia dentro de *Aeromonas hydrophila*, cada tiempo es independiente estadísticamente (Tabla 3.25).

Tabla 3.25 Efecto del tiempo sobre las unidades formadoras de colonia, dentro de *Aeromonas hydrophila.* Transformación Log (x+2).

| TIEMPO | UFC. REAL | UFC.TRANSFOR. | RANGO |
|---|---|---|---|
| H1 (20h) | 65 $x10^{15}$ | 13,17 | b |
| H2 (24h) | 104 $x10^{19}$ | 16,54 | a |

Dentro del pH1 y el tiempo 2 se presentó el mayor número de unidades formadoras de colonia con un promedio de 31 $x10^{20}$ y mediante la prueba de Tukey al

5% se colocó en el primer rango. Además que se determinó la independencia de los ensayos (Tabla 3.26).

Tabla 3.26 Efecto conjunto de la pH por tiempo sobre las unidades formadoras de colonia , dentro de *Aeromonas hydrophila.* Transformación Log (x+2)

| pH x TIEMPO | UFC. REAL | UFC.TRANSFOR. | RANGO |
|---|---|---|---|
| P1H1 | 188 $x10^{15}$ | 14,74 | d |
| P1H2 | 31 $x10^{20}$ | 20,75 | a |
| P2H1 | 75 $x10^{14}$ | 8,24 | f |
| P2H2 | 152 $x10^{17}$ | 18,98 | b |
| P3H1 | 55 $x10^{13}$ | 9,89 | e |
| P3H2 | 96 $x10^{17}$ | 16,54 | c |

Un mayor número de unidades formadoras de colonia se presento en el tiempo 2 dentro del pH1, en *Bacillus megaterium* (Tabla 3.27).

Tabla 3.27 Efecto del tiempo sobre las unidades formadoras de colonia en el pH1, dentro de *Bacillus megaterium.* Transformación Log (x+2).

| pH x TIEMPO | UFC. REAL | UFC.TRANSFOR. | RANGO |
|---|---|---|---|
| P1H1 | 35 $x10^{8}$ | 9,54 | b |
| P1H2 | 130 $x10^{12}$ | 14,11 | a |

En la cepa 3 *Burkholderia cepacia* el mayor número de unidades formadoras de colonia se presentó en el tiempo 2. Existen diferencias significativas en los ensayos (Tabla 3.28).

Tabla 3.28 Efecto del tiempo sobre las unidades formadoras de colonia en el pH1, dentro de *Burkholderia cepacia.* Transformación Log (x+2)

| pH x TIEMPO | UFC. REAL | UFC.TRANSFOR. | RANGO |
|---|---|---|---|
| P1H1 | 44 $x10^{16}$ | 17,64 | b |
| P1H2 | 31 $x10^{18}$ | 19,49 | a |

En la cepa 4 (*Pseudomonas fluorescens)*, se determinó que el pH en el que existe un mayor crecimiento es 7, y que la diferencia estadística con el pH 2 es significativa (Tabla 3.29).

Tabla 3.29 Efecto del pH sobre las unidades formadoras de colonia, dentro de *Pseudomonas fluorescens.* Transformación Log (x+2).

| pH | UFC. REAL | UFC.TRANSFOR. | RANGO |
|---|---|---|---|
| P1 (7) | 155 $x10^{19}$ | 15,94 | a |
| P2 (6.5) | 67 $x10^{17}$ | 14,19 | b |

Al incrementar el tiempo aumentan las UFC, por tanto se observó una relación directamente proporcional y se determinó que la hora 24 es en la se que presentó el mayor crecimiento, existió una diferencia estadística entre las dos horas de muestreo (Tabla 3.30).

Tabla 3.30 Efecto del tiempo sobre las unidades formadoras de colonia, dentro de *Pseudomonas fluorescens.* Transformación Log (x+2).

| TIEMPO | UFC. REAL | UFC.TRANSFOR. | RANGO |
|---|---|---|---|
| H1 (20h) | 67 $x10^{15}$ | 13,29 | b |
| H2 (24h) | 155 $x10^{19}$ | 16,83 | a |

En el efecto conjunto pH por tiempo se reportó que las unidades formadoras de colonia son mayores en el pH 1 en el tiempo 2. Cada ensayo presenta un rango de significancia diferente (Tabla 3.31).

Tabla 3.31 Efecto conjunto pH por tiempo sobre las unidades formadoras de colonia, dentro de *Pseudomonas fluorescens.* Transformación Log (x+2)

| pH x TIEMPO | UFC. REAL | UFC.TRANSFOR. | RANGO |
|---|---|---|---|
| P1H1 | 126 $x10^{15}$ | 12,92 | b |
| P1H2 | 31 $x10^{20}$ | 20,75 | a |
| P2H1 | 78 $x10^{14}$ | 11,13 | c |
| P2H2 | 0 | 0,301 | d |

Al incrementar el tiempo en la cepa 5 (*Pseudomonas sp.)* dentro del pH1 aumentan las unidades formadoras de colonia. Los rangos de significancia son diferentes entre los ensayos (Tabla 3.32 ).

Tabla 3.32 Efecto del tiempo sobre las unidades formadoras de colonia en el pH1, dentro de *Pseudomonas sp.* Transformación Log (x+2).

| pH x TIEMPO | UFC. REAL | UFC.TRANSFOR. | RANGO |
|---|---|---|---|
| P1H1 | 36 $x10^{13}$ | 14,56 | b |
| P1H2 | 78 $x10^{17}$ | 18,89 | a |

En el consorcio se observó que al incrementar el tiempo dentro del pH1 aumentan las unidades formadoras de colonia, los rangos de significancia mostraron independencia estadística (Tabla 3.33).

Tabla 3.33 Efecto del tiempo sobre las unidades formadoras de colonia en el pH1, dentro del consorcio. Transformación Log (x+2).

| pH x TIEMPO | UFC. REAL | UFC.TRANSFOR. | RANGO |
|---|---|---|---|
| P1H1 | 48 $x10^{14}$ | 15,68 | b |
| P1H2 | 45 $x10^{15}$ | 16,65 | a |

Con el tratamiento T12, se logró el mayor número de unidades formadoras de colonia, mientras que con los tratamientos T3 y T14 se obtuvieron los menores promedios, cada uno de los tratamientos es independiente entre sí (Tabla 3.34, Anexo 2).

Tabla 3.34 Efecto de los tratamientos sobre las unidades formadoras de colonia. Transformación Log (x+2).

| TRATAMIENTOS | UFC. REAL | UFC.TRANSFOR. | RANGO |
|---|---|---|---|
| T1 | $32 \times 10^{14}$ | 15,50 | j |
| T2 | $51 \times 10^{18}$ | 19,70 | b |
| T3 | 0 | 0,30 | o |
| T4 | $30 \times 10^{18}$ | 19,48 | c |
| T5 | $55 \times 10^{13}$ | 14,74 | k |
| T6 | $96 \times 10^{17}$ | 18,97 | d |
| T7 | $34 \times 10^{8}$ | 9,54 | n |
| T8 | $130 \times 10^{12}$ | 14,11 | m |
| T9 | $44 \times 10^{16}$ | 17,63 | f |
| T10 | $31 \times 10^{18}$ | 19,49 | c |
| T11 | $37 \times 10^{16}$ | 17,57 | f |
| T12 | $61 \times 10^{20}$ | 21,78 | a |
| T13 | $150 \times 10^{14}$ | 16,17 | h |
| T14 | 0 | 0,3 | o |
| T15 | $36 \times 10^{13}$ | 14,55 | l |
| T16 | $78 \times 10^{17}$ | 18,89 | e |
| T17 | $48 \times 10^{14}$ | 15,68 | i |
| T18 | $45 \times 10^{15}$ | 16,65 | g |

## 3.4 Prueba de crecimiento en el fermentador biológico

### 3.4.1 Curva de crecimiento

Determinadas las condiciones de pH y temperatura óptimas para el crecimiento del consorcio a nivel de laboratorio, se procedió al escalado de las mismas en el fermentador biológico con una producción de 40 litros.

De los muestreos realizados a lo largo de todo el proceso se obtuvo la curva de crecimiento la cual se puede notar estabilidad en las fases de crecimiento dentro de cultivo en el biofermentador (Figura 3.26), el crecimiento se registró a la hora 28, luego de lo cual fue no significativo, la fase de mayor crecimiento está de la hora 20 a la 24.

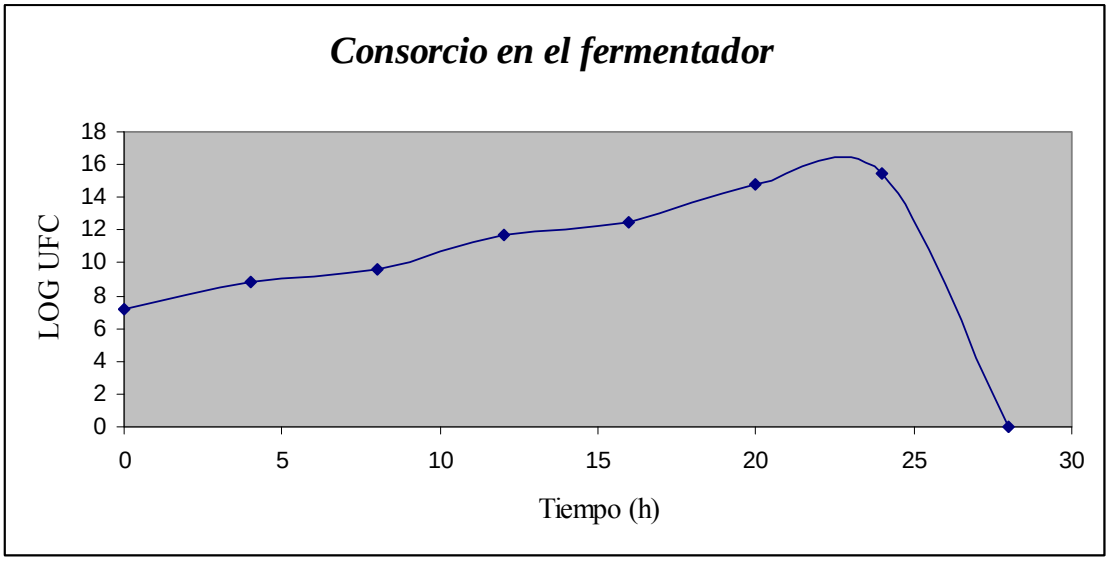



Figura 3.26 Curva de crecimiento de consorcio bacteriano en el fermentador biológico.

### 3.4.2 Determinación de la permanencia en el tiempo de las cepas formadoras del consorcio.

#### 3.4.2.1 Características Macroscópicas

Los cultivos aislados y purificados, luego de la prueba en el fermentador fueron comparados con las características ya establecidas previamente en el laboratorio (Cuadro 2.3), lo que dio como resultados la identificación macroscópica de las mismas.

#### 3.4.2.2 Características Microscópicas

Con la realización de tinción gram, se analizó los cultivos puros obtenidos y se comparó con las características ya establecidas (Cuadro 2.4), dando como resultado la identificación microscópica de las cepas formadoras del consorcio.

#### 3.4.2.3 Pruebas Bioquímicas

Una vez identificadas las características macro y microscópicas de cada uno de los organismos se procedió a la realización de las pruebas bioquímicas establecidas para

cada organismo, lo cual dio como resultado la identificación de las cepas gram – formadoras del consorcio (Cuadro 2.5), ya establecidos anteriormente.

Al ser *Bacillus megaterium*, el único organismo gram +, se procedió a una identificación paralela para las características bioquímicas propias de este género, donde se comprobó la presencia de la cepa del género *Bacillus* al final del proceso de producción (Cuadro 2.6).

# CAPITULO IV: DISCUSIÓN

## 4.1 Curvas de Crecimiento

La realización de curvas de crecimiento es indispensable en cualquier estudio cinético, y en el presente sirvió para determinar los tiempos de generación, dentro de los cuales la fase de crecimiento exponencial de cada una de las cepas y del consorcio formado, tiempo en el cual se realizó las respectivas pruebas de pH y temperatura.

Los contajes realizados en 36 horas, además sirvieron para determinar las diferencias que existen en los tiempos de crecimiento como *Pseudomonas fluorescens* que presentan un crecimiento hasta la hora 32 lo que indica que esta cepa presenta un periodo de degradación indicado por su crecimiento prolongado, además que muestra un aprovechamiento de los nutrientes importante. Mientras que *Bacillus megaterium* presenta un crecimiento menor en el tiempo hasta la hora 20 lo que mostraría lo contrario que con *Pseudomonas fluorescens* sin embargo no se podría asegurar un nivel de degradación significativamente menor (figura 3.2 y 3.4)**.** Estas diferencias deben ser tomadas en cuenta tanto en el momento de la formación de un consorcio, como en la producción, ya que la permanencia en el tiempo de las cepas es un aspecto importante a ser analizado.

Con el resto de cepas analizadas se pudo observar un crecimiento parecido las horas 20 y 24 fueron en las que se presentó el mayor número de unidades formadoras de colonia.

Es importante resaltar que los mayores crecimientos se presentaran en las bacterias gram -, *Bacillus megaterium* al ser la única cepa gram+, presentó menor crecimiento en el tiempo. Estudios anteriores sugieren que las bacterias gram – parecen estar más adaptadas a las fuentes de carbono provenientes de hidrocarburos (Venosa et al., 1999).

En el caso de la curva correspondiente al consorcio se pueden diferenciar varias fases de crecimiento exponencial como fases de latencia (figura 3.6), lo pudo deberse a la interacción propia de varias cepas dentro de un mismo medio de crecimiento, además de la competencia propia por los nutrientes del medio (Bulock J., Kristiansen, B. 1987).

Además se observó un crecimiento menor de las cepas en consorcio con respecto al crecimiento de cepas por separado, posiblemente como resultado de una competencia intraespecífica que en algunos casos tiene como consecuencia la reducción de las tasas de crecimiento (G. Tyler Miller, Jr., 2000).

## 4.2 Pruebas de Temperatura

La realización de pruebas de crecimiento con variaciones de temperaturas ayudó al establecimiento de una condición óptima de crecimiento que en el caso de *Pseudomonas fluorescens, Burkholderia cepacia,* y *Pseudomonas sp.* es de 30$^{o}$C, cabe resaltar que en las dos últimas fué la única temperatura en que se presentó crecimiento, mientras que *Pseudomonas fluorescens* tuvo un crecimiento menor a 25$^{o}$C, (Figura 3.10).

Lo que se explica debido a que el ambiente en el cual las bacterias están adaptadas se encuentra en la región oriental del país, la cual se caracteriza por temperaturas elevadas mayores a 25$^{o}$C (INAMHI, 2007).

Con respecto a *Aeromonas hydrophila* y *Bacillus megaterium,* se puede observar que el mayor crecimiento se da a 35$^{o}$C. A 30$^{o}$C también existe crecimiento, que aunque en menor cantidad (Figura 3.7 y 3.8) no deja de ser significativo.

Podemos además ver que en el caso de *Bacillus megaterium* el crecimiento a la hora 8 tanto a 30 como a 35$^{o}$C, es prácticamente el mismo, mientras que a la hora 14 a 30$^{o}$C, puede notarse una diferencia por lo que se podría decir que la temperatura óptima es de 30$^{o}$C.

Cuando se realizaron las pruebas del consorcio se pudo observar que el crecimiento solo se da a 30$^{o}$C (Figura 3.24), lo que pudo ser deberse a que las cepas que presentan crecimiento solo a esta temperatura son las que predominan en el consorcio, sin que las que presentan crecimiento a otras temperaturas dejen de estar presentes, sino que esta temperatura pueda ser considera la de equilibrio para crecimiento óptimo de todas las cepas juntas.

Numerosos trabajos señalan que la temperatura óptima a que se da la degradación de los hidrocarburos es de 20 a 35$^{o}$C. (Atlas y Bartha, 2002), en el caso de las cepas estudiadas se pudo comprobar que se encuentran dentro de este rango pero en la parte superior del mismo que va de 30 a 35$^{o}$C en la cepas por separado, y que cuando se trata del consorcio esta se estabiliza en 30$^{o}$C.

### 4.3 Pruebas de pH

Las pruebas de pH realizadas en un rango de 6 a 8 dieron como resultado en *Aeromonas hydrophila*, un crecimiento que va desde 6 a 7 siendo 7 el óptimo (Figura 3.12), además cabe resaltar que a un pH de 6.5 a la hora 20, el crecimiento no es significativo, mientras que a la hora 24 si lo es. Algo similar ocurrió en el caso de *Pseudomonas fluorescens*, en este caso el crecimiento se registró al inicio de la fase exponencial, pero no al final hora 24 (Figura 3.13). La comparación entre estas dos cepas implica que las mismas presentan un comportamiento inusual dentro del experimento, ya que su crecimiento varió con respecto al tiempo dentro un mismo pH de prueba, lo que debe ser tomado en cuenta en estudios futuros ya que puede llegar a ser un factor determinante en el proceso de degradación y monitoreo del mismo.

El pH del medio es por lo general modificado por los microorganismos contenidos en este. Según las fuentes de energía disponibles y su metabolismo, el medio puede acidificarse o alcalinizarse. El pH puede disminuir si existe un metabolismo que genere ácidos orgánicos como en el caso de la metabolización de los hidrocarburos puede aumentar si se produce amoníaco tras el consumo de aminoácidos (Prescott ;Harley ; Klein, 2004). Lo que explica porque conforme pasa el tiempo, el crecimiento aumenta o disminuye dependiendo de las variaciones de pH.

Para *Bacillus megaterium, Burkholderia cepacia,* y *Pseudomonas sp.* (Figuras 3.14, 3.25 y 3.16) el pH de crecimiento óptimo y único es de 7, por tanto la mínima variación de este parámetro, tiene como consecuencia, el crecimiento no significativo de la cepa, dato importante a la hora de una producción individual o de consorcio si se presenta el caso.

El comportamiento del consorcio, luego del estudio individual, no es más que la comprobación de que 7 es el pH óptimo de crecimiento (Figura 3.25), y único ya que no se presenta otro crecimiento a un pH diferente, lo que se puede explicar que al igual que la temperatura, el pH funciona como un parámetro de equilibrio para el crecimiento conjunto de las cepas formadoras del consorcio.

Cabe destacar que células bacterianas ajustan su pH interno a través de la respuesta homeostática modulando la actividad de las bombas de protones (Saier MH, 1997), lo que también debe ser tomado en cuenta para explicar este comportamiento.

Los estudios realizados con bacterias degradadoras señalan que en el rango de pH de 5,2 a 7,0 se produce la mineralización del hidrocarburo, siendo el pH óptimo 7,0 (Kastner et al. 1998). Lo último que fue comprobado en esta investigación, no solo en las cepas en crecimiento individual sino también en la formación de un consorcio.

## 4.4 Análisis Estadístico

Una vez procesados los datos de temperatura y pH, los análisis de variancia realizados muestran las diferencias estadísticas entre los tratamientos, las cepas, las diferentes variaciones de pH y temperatura en las que se registró crecimiento y los tiempos de muestreo, reflejadas por la alta significancia al 1 y al 5% (Tabla 3.7 y 3.21), por lo que la hipótesis alternativa plateada es la aceptada.

La transformación logarítmica aplicada ayudó a la normalización de los datos, lo que disminuyó el error experimental y el coeficiente de variación. A pesar de ello pueden considerarse altos lo que se debe a que al estudiar organismos vivos es muy difícil establecer patrones de comportamiento similares, lo que se evidenció a lo largo de toda la experimentación y estadísticamente se ratifica.

La prueba de significancia efectuada estableció claramente las diferencias estadísticas presentes entre el crecimiento de las distintas cepas y el consorcio, además que ayudó a determinar los mejores crecimientos en los diferentes parámetros analizados.

## 4.5 Pruebas de Antagonismo

La confrontación de cada una de las cepas entre si, dio como resultado que solo se presenta una solo cepa antagónica *Pseudomonas sp.* (Figuras 3.18, 3.19, 3.20, 3.21 y 3.22) ya que es la única que presenta un halo de inhibición significativo según la técnica mayor a 5 mm (Rodríguez, Rueda, Pedroza y Poutou, 2002), por tanto es necesario eliminar a esta cepa del consorcio, ya que un antagonismo positivo es equivalente a la muerte de las cepas con las que *Pseudomonas sp.* es antagónica.

El resto de las cepas estudiadas presentó un antagonismo negativo, lo que nos indica que pueden crecer juntas, debido a que han sido aisladas de un mismo ambiente

con condiciones similares (Grifoll *et al*., 1995). Aspecto importante en la formación de consorcio degradador ya que garantizaría el crecimiento de las cepas y por ende el proceso de degradación.

### 4.6 Pruebas de actividad emulsificante

En el caso de la degradación de hidrocarburos, es por lo general necesario la presencia de un emulsificante que facilite el acceso a las moléculas hidrófobas de hidrocarburo (Troquet ; Troquet, 2003).

Por tanto la identificación de cepas bacterianas con actividad emulsificante es importante y a la hora de formar un consorcio pueden ser fundamental a la hora de iniciar el proceso de degradación.

Los microorganismos producen bioemulsificantes, en general, al principio de la fase estacionaria de crecimiento (Ron ; Rosenberg, 2002).

Las cepas que presentan mayor actividad emulsificante son *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia* con 2.379 y 2.366 UAE/ml respectivamente, mientras que *Bacillus megaterium* con 1.439 y *Aeromonas hydrophila* con 1.204 UAE/ml son las que presentan la más baja actividad (tabla 3.16). Sin embargo a pesar de presentar baja actividad deben ser tomadas en cuenta, ya que la actividad emulsificante puede ser complementada con actividad degradativa, (Hidalgo, D. Serrano, P. Recto P., y Cordones, J. 2006) por lo que no pueden ser descartadas, además para que una cepa sea incluida en un consorcio degradador debe tener una actividad emulsificante mayor a 1 UAE/ml (LACIB, 2006).

*Pseudomonas sp.* presentó una actividad de 2.294 UAE/ml (tabla 3.6), que dentro de las cinco cepas del estudio es alta, debe ser tomada en cuenta si no es formando parte del consorcio si puede ser de una manera individual.

## 4.7 Formación del consorcio

Es importante estudiar qué poblaciones existen en el suelo contaminado ya que estas probablemente ya se habrán adaptado al ambiente contaminado (Hanson *et al.*, 1997). Bajo este concepto se decidió la formación de un consorcio para la degradación de hidrocarburos.

Una vez obtenidos los datos tanto de las pruebas de antagonismo (Figuras 3.18, 3.19, 3.20, 3.21 y 3.22) y actividad emulsificante (tabla 3.6), se decidió formar el consorcio con cuatro de las cinco cepas sujetas del estudio*, Aeromonas hydrophila, Bacillus megaterium, Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas fluorescens*, ya que estas presentan un antagonismo negativo, además de una actividad emulsificante mayor a 1 UAEL/ml (LACIB, 2006).

Se utilizó cada una de las cepas en proporciones iguales debido a que no existen datos individuales sobre la degradación de cada una a nivel de campo, por tanto se mantuvo el método utilizado en el laboratorio y que ha dado resultado en campo con la disminución de TPHs (PEPDA, 2006).

Con respecto a la quinta cepa *Pseudomonas sp.* a pesar de su actividad emulsificante de 2.294 UAE/ml, no fue tomada a la hora de formar el consorcio debido a su alto antagonismo, lo que no hace factible utilizarla. Sin embargo puede ser tomada en un estudio individual para su producción y posterior utilización en campo (LACIB, 2006).

Una de las limitaciones de la formación del consorcio fue el no poder comprobar la actividad emulsificante de cada unas las cepas en el consorcio, ya que esto ayudaría a definir el comportamiento real de las cepas y su comportamiento a nivel de campo.

## 4.8 Pruebas de Crecimiento en el fermentador

Cuando los parámetros óptimos de pH y temperatura fueron establecidos, y se definió que el mejor crecimiento se dio a 30$^{o}$C y a pH 7, como sugiere la literatura (Kastner et al. 1998) y (Atlas y Bartha, 2002), se dio el escalado de estas condiciones a nivel de biofermentador.

La prueba efectuada dio una curva, mucho más estable (Figura 3.25), que la obtenida en el laboratorio (Figura 3.24), esto pudo deberse a que en el reactor las condiciones de crecimiento están mejor controladas. Además al iniciar la producción con preinóculo con 24 horas de incubación, tiempo en el cual se da un periodo de adaptación lo que asegura la estabilización y adaptación de las cepas en el biofermentador al el inicio del proceso (Doran, P. 1998).

Con respecto al crecimiento observado tanto a nivel de laboratorio y de biofermentador no se reportó una diferencia importante ya que al final de las 24 horas el crecimiento fue de $10^{14}$ a $10^{15}$ en los dos casos, lo que nos sugiere que el consumo de nutrientes fue similar y que el escalado fue efectivo.

Los estudios en erlenmeyers (a nivel de laboratorio) presentan un inconveniente con respecto a la disponibilidad de oxígeno y la posibilidad de medida de diferentes parámetros. Por el contrario, los cultivos en reactor pueden estudiarse al controlar varios parámetros que permiten determinar la presencia de un crecimiento bacteriano así como de una actividad metabólica de degradación de los hidrocarburos (Wayens, C. 2004).

La permanencia en el tiempo de las cepas formadoras del consorcio comprueba los resultados de las pruebas de antagonismos, además muestran la existencia de competencia intraespecífica (G. Tyler Miller, Jr., 2000), que disminuyó el crecimiento pero no inhibió la presencia de ninguna cepa.

Es importante señalar que a nivel de laboratorio no se comprobó la permanencia en el tiempo, lo que pudo contribuir a estandarizar este procedimiento.

## CAPITULO V: CONCLUSIONES

- La temperatura óptima de crecimiento de las cepas *Bacillus megaterium y Aeromonas hydrophila* es de 35$^{o}$C. De *Pseudomonas fluorescens, Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas sp.* es de 30$^{o}$C. El consorcio presenta un crecimiento significativo a los 30$^{o}$C. La hipótesis establecida para la temperatura fue verdadera.

- El pH óptimo tanto para cada unas de las cepas estudiadas como para el consorcio es de 7 y aunque se puede presentar crecimiento en medio ligeramente ácido o básico, es menor o no significativo. La hipótesis planteada fue comprobada.

- El antagonismo presentado fue registrado únicamente con *Pseudomonas sp.* por lo debe ser utilizada individualmente dentro de un proceso de degradación.

- La actividad emulsificante de las cepas estudiadas está comprobada y registradas como mayores a 1 UAE/ml, siendo *Pseudomonas fluorescens* la que presenta la actividad más alta 2.379 UAE/ml.

- El escalado de las condiciones de crecimiento determinadas en el laboratorio, a nivel de biofermentador es posible con diferencias mínimas en el número de unidades formadoras de colonia.

- La permanencia en el tiempo de cepas no antagónicas, formadoras del consorcio, luego de la producción semindustrial en biofermentador fue comprobada.

- Las condiciones de operación empleadas en el proceso de bioaumentación, son las óptimas por lo que deben ser mantenidas.

## CAPITULO VI: RECOMENDACIONES

- Adicional a este estudio sería necesario probar las condiciones de crecimiento óptimo a diferentes concentraciones de oxígeno como parámetro importante de crecimiento.

- Estudiar la capacidad degradativa de cada una de las cepas con la utilización de microcosmos puede contribuir en la mejor formación del consorcio, ya que aportaría información importante, lo de definiría las proporciones exactas de cada cepa en la formación del consorcio y su posterior producción semindustrial.

- El empleo de distintos tipos de crudos en el estudio de cepas degradadoras podría ayudar a determinar el factor limitante de estas en su capacidad degradativa.

- El crecimiento de las cepas por separado en el biofermentador ayudaría a la investigación de un posible cultivo puro para los procesos de degradación.

- El empleo de cepas antagónicas en pruebas de campo contribuirían a establecer los efectos que estas pueden causar en los suelos contaminados.

## CAPITULO VII: BIBLIOGRAFIA

**Bergey, D**. (1994), Bergey´s Manual of Determinative Bacteriology, Novena Edición.

**Bracho, M., Diaz, L. y Soto, L**. (2004). Degradación De Hidrocarburos Aromáticos Por Bacterias Aisladas De Suelos Contaminados Con Petróleo, Estado Zulia, Venezuela. *Bol. Centro Invest. Biol.* [online]. vol.38, no.3, p.176-185. Extraído el 16 de octubre, 2007, de h*ttp://www.serbi.luz.edu.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-538X2004012000002&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0375-538X.*

**Carrillo, L**. (2003). Microbiología Agrícola. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Salta. Capítulo 2**7,** Extraído el 6 de mayo, 2007, de *http://www.unsa.edu.ar/micragri/micagricontenido.pdf.*

**De la Cruz, G., García F. ,Durán E. ,Herrera, M.** (2004) Evaluación de la respuesta de los microorganismos presentes en un derrame de hidrocarburos, Extraído el 30 de mayo, 2007, de *http://www.citologica.org/eomadrigal/default.asp?Id=2&Fd=2.*

**Hidalgo, D. Serrano, P. Recto P., y Cordones, J.** (2006). Aislamiento, caracterización e identificación de organismos degradadores de hidrocarburos que se aplican en tratamiento biológico de descomposición. (biorremediación de los suelos contaminados con hidrocarburos). Sociedad Ecuatoriana de Biología, Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Libro de resúmenes, 30 Jornadas Nacionales de Biología. Quito-Ecuador.

**LACIB,** (2006). Laboratorio de Ciencias Biotecnológicas, PEPDA.

**Lalucat, J., Cladera, A. , García-Valdés, E**. (2004) Biodegradación de crudo de petróleo en el mar: accidente del Prestige y aportaciones de la biotecnología ambiental Departamento de Biología e IMEDEA (CSIC-UIB), Universitat de les Illes Balears.

**Mönckeberg F.,** (1988) Producción microbiana industrial. Fermentación Publicado en "La Revolución de la Bioingeniería", Extraído el 3 de julio, 2007, de *http://www.creces.cl/new/index.asp?imat=%20%20%3E%20%205&tc=3&nc=5&art=*

**PEPDA,** (2006) Proyecto de Eliminación de Piscinas y Derrames del Distrito Amazónico, Extraído el 30 de mayo, 2007, de *http://www.proteccionambiental.org/.*

**Prescott, L.; Harley, J.; Klein D**. (2004). Microbiología, Quinta edición, Editorial McGraw-Hill Interamenericana.

**Pumarola, A**., (2002). Relación huésped-bacteria, Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca, Biblioteca Electrónica, Cap. 13. Extraído el 10 de junio, 2007, de *http://coli.usal.es/Web/educativo/bibelectro.alu/bibelectro.ssi*

**Viñas, M.** (2005), Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica, Facultad de Biología, Departamento de Microbiología, Universidad de Barcelona, Extraído el 15 de marzo, 2007, de *http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UB/AVAILABLE/TDX-0920105-085623//TESIS_MVI%D1AS_CANALS.pdf*

**Valderrama B., Téllez-Sosa. (**2000). Microbiología del petróleo y sus derivados, *Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 510-3, Cuernavaca, Mor. 62250 México.*

**Wayens, C.** (2004). Estudio del potencial de degradación de los hidrocarburos por *Acinetobacter sp.* y *Pseudomonas putida* para su aplicación en la biorremediación de suelos contaminados, Escuela de Biología, Ingeniería en Biotecnología, Instituto tecnológico de Costa Rica, Extraído el 16 de octubre, 2007, *http://bibliodigital.itcr.ac.cr:8080/dspace/bitstream/2238/206/1/pr%C3%A1ctica.pdf*

## REFERENCIAS

**Allen, C. C., D. R. Boyd, F. Hempenstall, M. J. Larkin, and N. D. Sharma** (1999). Contrasting effects of a nonionic surfactant on the biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons to cis dihydrodiols by soil bacteria. Appl.Environ.Microbiol. **65**:1335-1339

**Atlas R. y R. Bartha**. (2002). Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. Cuarta Edición. Editorial Pearson Educación, SA. Madrid. 677 p.

**Altwegg M**. (1999). *Aeromonas* and *Plesiomonas*, in: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, eds. Manual of Clinical Microbiology. Washington: ASM press. 507-16.

**Audesirk, T.Y Audesirk, G.** (1999). Biología. La Vida en la Tierra. Prentice Hall
Campbell, Neil A., Mitchell, Lawrence G., Reece, Jane B. Biología. Conceptos y Relaciones. Tercera Edición. Pearson Educación.

**Barbee, G. C., K. W. Brown, and K. C. Donnelly**. (1992). Fate of mutagenic chemicals in soils amended with petroleum and wood preserving sludges. Waste Man.& Res. **10**:73-85.

**Barkay, T., S. Navon-Venezia, E. Z. Ron, and E. Rosenberg**. (1999). Enhancement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the bioemulsifier alasan. Appl.Environ.Microbiol. **65**:2697-2702.

**Barr, D. P. and S. D. Aust**. (1994). Mechanisms white-rot fungi used to degrade pollutants. Environ.Sci.Technol. **28**:78-87.

**Bayona, J. M., J. Albaigés, A. M. Solanas, R. Parés, P. Garrigues y M. Ewald. (**1986). Selective aerobic degradation of methyl-substituted polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by pure microbial cultures. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*. **23**:289-303.

**Beachey. E. H.: Eisenstein, 8.1. y Ofek,** I.(1982). Bacterial adharance in lnfectious Diseases. Current concepts (monograph). Kalamazoo, Michigan.

**Bezalel, L., Y. Hadar, and C. E. Cerniglia**. (1996). Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Appl.Environ.Microbiol. **62**:292-295.

**BIOBAC-AG**, (2006). Extraído el 3 de abril, 2007, de *http://www.bioland.cl/mo-biobac.html.*

**Bjurstrom, E**. (1985). Biotechnology. Chemical Engineering. February 18:126-133.

**Borrell N, Figueras MJ, Guarro J**. (1998). Phenotypic identification of *Aeromonas* genomoespecies from clinical and environmental sources. Can J Microbiol ;44:7-12.

**Bouwer, E. J. and A. J. B. Zehnder**. (1993). Bioremediation of organic compounds - putting microbial metabolism to work. Tibtech **11**:287-318.

**Bredehoeft, J. D. (**1994). Hazardous waste remediation: A 21st century problem. Groundwater Monit.and Remediation **14**:95-100.

**Brim, H., S. C. McFarlan, J. K. Fredrickson, K. W. Minton, M. Zhai, L. P. Wackett, and M. J. Daly**. (2000). Engineering *Deinococcus radiodurans* for metal remediation in radiaoctive mixed waste environments. Nat.Biotechnol. **18** :85-90.

**Budzinski, H., N. Raymond, T. Nadalig, M. Gilewicz, P. Garrigues, J. C. Bertr y P. Caumette. (**1998). Aerobic biodegradation of alkylated aromatic hydrocarbons by a bacterial community. *Org.. Geochem.* **28**:337-348.

**Casellas, M., M. Grifoll, J. Sabate y A. M. Solanas. (**1998). Isolation and characterization of a 9-fluorenone-degrading bacterial strain and its role in synergistic degradation of fluorene by a consortium. *Can. J. Microbiol*. **44**:734-742.

**Cerniglia, C. E. (**1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation **3**:351-368.

**Churchill, S. A., J. P. Harper y P. F. Churchill. (**1999). Isolation and characterization of a Mycobacterium species capable of degrading three- and four-ring aromatic and aliphatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:549-552.

**Coenye,T., Mahenthiralingam,E-. Henry, D., Lipuma, J.L., Laevens, S., Gillis M.,Speert,D.V. and Vandamme, P.** (2001). Burkholderia ambifaria sp nov. a novel member of Burkholderia cepacia complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. Int J Syst and Evol Microbiol.51:1481-1490.

**Davis, J. B. y R. L. Raymond.** (1961). Oxidation of alkyl substituted cyclic hydrocarbons by a *Nocardia* during growth on *n*-alkanes. *Appl. Microbiol*. **9**:383-388.

**Davison, J. (**1999). Genetic exchange between bacteria and the environment. Plasmid **42**:73-91.

**Desai, J. D. and I. M. Banat**. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol.Mol.Biol.Rev. **61**:47-64.

**Dimock, M.B., Beach, R.M. and Carlson, P.S.** (1989). Endophytic bacteria for the delivery of crop protection agentes, In Proceedings of a Conference on Biotechnology, Biological pesticides and novel Plant pest resistance for insect pest management. Edited by D.W. Roberts and R.R. Granados. Boyce Thompson Institute for Plant Research, Ithaca, N.Y. pp:88-92.

**Dobereiner, J.** (1993). Recent changes in concepts of plants bacteria interactions: endophytic N2 fixing bacteria. Cienc. Cult. 44:310-313.

**Doran, P.** (1998) Bioprocess Engineering Principles, 3d Edition, Academic Press, 439 pp

**Dravis, B. C., K. E. LeJeune, A. D. Hetro, and A. J. Russell**. (2000). Enzymatic dehalogenation of gas phase substrates with haloalkane dehalogenase. Biotechnol.Bioeng. **69**:235-241.

**Duguid. J. P.. y Old D. C.** (1980). Adherence properties of Enterobacteriaceae. En Beachey, E. N. (dir.): Bacterial Adherence, 185. Chapman and Hall, London.

**Estrada de los Santos, P., Bustillos-Cristales, R, and Caballero-Mellado, J.** (2001). Burkholderia a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide enviromental and geographic distribution. Appl. Environ. Microbiol. 67:2790-2798.

**Facchinello, M., García, C. y Massei, I.** (2006), UNCo-ESSA Microbiología Ambiental I, El Rumen – Mutualismo y los orígenes de la célula eucariota. Extraído el 9 de noviembre, 2006 de,*http://essa.uncoma.edu.ar/academica/materias/microbiologia_ambiental_I/seminarios_2006/IM_massei_5.pdf*

**Finnerty, W. R. (**1994). Biosurfactants in environmental biotechnology. Curr.Opin.Biotechnol. **5**:291-295.

**Foght, J. M., P. M. Fedorak y D. W. S. Westlake.** (1990). Mineralization of [14C]hexadecane and [14C]phenanthrene in crude oil: specificity among bacterial isolates. *Can. J. Microbiol.* **36**:169-175.

**Foght, J. M., K. Semple, C. Gauthier, D. W. S. Westlake, S. Blenkinsopp, G. Sergy, Z. Wang y M. Fingas.** (1998). Development of a standard bacterial consortium for laboratory efficacy testing of commercial freshwater oil spill bioremediation agents. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **21**:322-330.

**G. Tyler Miller, Jr.** Ecología y Medio Ambiente. (2000). Grupo Editorial Iberoamérica Solomon, Eldra P., Berg, Linda, Martín, Diana. **Biología**. Mc Graw Hill – Interamericana.

**GAMA,** (2000). (Instituto común del genoma ): *Fluorescens de los Pseudomonas*

**Gibson, D. T. y V. Subramanian. (**1984). Microbial degradation of aromatic compounds. In:Gibson DT (Ed), *Microbial Degradation of Organics compounds*. Marcel Dekker, New York.

**Goldman, S.; Shabtait, C.; Rubinoniz, E.; Rosenberg Y.; Gutnick, D.L**.(1982). Emulsan in Acinetobacter calcoaceticus RAG-1: Distribution of cell-free and cell associated cross-reacting material. Applied and Environmental Microbiology 44 (1); 165-170.

**Govan J.R.W. and Deretic V.** (1996). Microbial pathogensis in cystic fibrosis: mucoid Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia. Microbial rev. 60:539-574.

**Grifoll, M, S. A. Selifonov, C. V. Gatlin y P. J. Chapman. (**1995). Actions of a versatile fluorenedegrading bacterial isolate on polycyclic aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3711-3723.

**Grossman, M. J., M. K. Lee, R. C. Prince, K. K. Garrett, G. N. George, and I. J. Pickering**. (1999). Microbial desulfurization of a crude middle-distillate fraction: analysis of the extent of sulfur removal and the effect of removal on remaining sulfur. Appl.Environ.Microbiol. **65**:181-188.

**Hoff, R. (**1993). Bioremediation: An overview of its development and use for oil spill cleanup. Marine Poll.Bull. **26**:476-481.

**Hozumi, T., H. Tsutsumi, and M. Kono**. (2000). Bioremediation on the shore after an oil spill from the Nakhodka in the sea of Japan. I. Chemistry and characteristics of heavy oil loaded on the Kakhodka and biodegradation tests by a bioremediation agent with microbiological cultures in the laboratory. Marine Poll.Bull. **40**:308-314.

**ICMSF.** (1983). Ecología microbiana de los alimentos, volumen 1. Zaragoza, Acribia, 1983, cap. 1.

**INAMHI** (2007). Estudios climatológicos, Caracteristicas Generales del Clima en el Ecuador, Extraído el 15 de octubre, 2007, de *http://www.inamhi.gov.ec/meteorologia/eclimaticos_caracteristicas.htm*

**Janda JM**. (1991). Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. Clin Microbiol Rev 4:397-410.

**Janda JM**. (1998). Abbott SL. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas* an expanding panorama of species, diseases presentation, and unanswered questions. J Clin Infec Dis 17:332-44.

**Janda JM**. (2001). *Aeromonas* and *Plesiomonas*, in: Sussman M, ed. Molecular Medical Microbiology. San Diego: Academic Press. 2001:1237-70.

**Janssen, D.;Oppentocht, J.; Poelarends, G.,** (2001). Microbial dehalogenation, Department of Biochemistry, Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute, University of Groningen, Nijenborgh 4, NL-9747 AG Groningen, The Netherlands. Elsevier Science **12**:254–258.

J**oseph SW, Daily OP, Hunt WS, Jseidlen R, Colwell R**. (1979). Aeromonas primary wound infection of a diver in polluted waters. J Clin Microbiol 1979;10: 46-9.

**Kastner M., M. Breuer-Jammali y B. Marro**. (1998). Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and survival of PAHs-degrading bacteria introduced into soil. Appl. Environ. Microbiol. 64: 359-462

**Kazunga, C. y M. D. Aitken.** (2000). Products from the incomplete metabolism of pyrene by polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1917-1922.

**Kazunga, C., M. D. Aitken, A. Gold y R. Sangaiah.** (2001). "Fluoranthene-2,3- and -1,5-diones are novel products from the bacterial transformation of fluoranthene. *Eenviron. Sci. Technol.* **35**:917-922.

**Kellenius, C.; Molby, R., y Svenson, S. B.** (1981). Ocurrence of P-fimbriated *E. coli* in urinary tract infections. Lancet, 11,1369.

**Komukai-Nakamura, S., K. Sugiura, Y. Yamauchi-Inomata, H. Toki, K. Venkateswaran, S. Yamamoto, H. Tanaka y S. Harayama.** (1996). Construction of bacterial consortia that degrade Arabian light crude. *J. Ferm. Bioeng*. **82**:570-574.

**Kühn I, Huys G, Coopman R, Kersters K, Janssen P.** (1997). A 4-year study of the diversity and persistence coliforms and *Aeromonas* in the water of a Swedish drinking water well. Can J Microbiol 1997;43:9-16.

**Kühn I, Allestam G, Huys G, Janssen P, Kerster K, Krovacek K, et al.** (1997). Diversity, persistence, and virulence of *Aeromonas* strains isolated from drinking water distribution systems in Sweden. Appl Environ Microbiol 1997;63:2708-15.

**Lalucat, J. Cladera, A. Garcia, E.** (2000)**.** Biodegradación de crudo de petroleo en el mar: accidente del Prestige y aportaciones de la biotecnología ambiental, Departamento de biología, Universidad de les Illes Balears, Extraído el 15 de junio, 2007, de *http:// www.semicro.es/Actualidad/SEM35_9.PDF.*

**Leahy, J. G. and R. R. Colwell** . (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiol.Rev. **54**:305-315.

**Madigan TM, Ma rtinko JM, Parker J. (**2003). Brock-Biology of Microorganisms. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, cap. 6.

**Manacorda, A. M. Cuadros D. P, Alvarez A. S.**,(2006) Manual Practico de Microbiología, Tomo II: Microbiología ambiental II, Capitulo 6, Recuento En Placa*De Bacterias Heterótrofas Aerobias Mesófilas Totales En Aguas. Extraído el de noviembre, 2007 de *http://essa.uncoma.edu.ar/academica/materias/microbiologia_ambiental_II/Cap_6.rtf*

**Marin M., Smits, THM., Van Beilen J.B. and Rojo F**. (2001). The alkane hdroylase gene of Burkholderia cepacia RR10 is under catabolic repression control. J. Bacteriol. 183:4202-4209.

**Massa S, Armuzzi R, Tosques M, Canganella F, Trovatelli LD**. (1999). Susceptibility to chlorine of *Aeromonas hydrophila* strains. Lett Appl Microbiol 86:169-73.

**McClure PJ, Cole MB, Davies KW.** (1994). An example of the stages in the development of a predictive mathematical model for microbial growth: the effects of NaCl, pH and temperature on the growth of *Aeromonas hydrophila*. Int J Food Microbiol 23:359-75.

**Montville TJ**. (1997). Principies which influence microbial growth, survival, and death in foods. En: Food Microbiology:Fundamentals and Frontiers. Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ, eds. Washington, ASM Press, pp. 13-29.

**Osorio, G.** (2006), Microbiota Normal, Capítulo 5, Extraído el 9 de noviembre, 2007 de,
*http://www.med.uchile.cl/apuntes/archivos/2006/medicina/capitulo_05_microbiota_normal.pdf*.

**Park, K. S., R. C. Sims, and R. R. Dupont**. (1990). Transformation of PAHs in soil systems. J.Environ.Eng. **116**:632-641.

**Pavan ME**, **Abbot SL, Zorzopulos J, Janda JM**. (2000). *Aeromonas salmonicida subs. pectinolytica subs.* nov., a new pectinasepositive subspecies isolated from a heavily polluted river. Int J Syst Evol Microbiol 3:1119-24.

**Peters, M., E. Heinaru, E. Talpsep, H. Wand, U. Stottmeister, A. Heinaru, and A. Nurk**. (1997). Acquisition of a deliberately introduced phenol degradation operon, *pheBA*, by different indigenous *Pseudomonas* species. Appl.Environ.Microbiol. **63**:4899-4906.

**Pettibone GW**. (1998). Population dynamics of *Aeromonas* spp. in an urban river watershed. J Appl Microbiol 85:723-30.

**Preuss, P**. (1985). Industry in Ferment. Science, 6:12.

**Prieur O.** (1985). Las bacterias de las fuentes hidrotermales. Mundo Científico 44:182-183.

**Ramana, K. V. and N. G. Karanth**. (1989). Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions. J.Chem.Tech.and Biotech. **45**:249-257.

**Ray, B.** (2001). Fundamental Food Microbiology, 2ª ed. CRC Press, Londres.

**Reynolds, J. (2005),** Richland College. LAB PROCEDURES MANUAL, THE GRAM STAIN, Extraído el 7 de Noviembre, 2007, de *http://www.rlc.dcccd.edu/mathsci/reynolds/micro/lab_manual/gram.html*

**Rodríguez, E., Rueda, A., Pedroza A., y Poutou, R**. (2002) Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias termófilicas aeróbicas, con actividad proteolítica, a partir de pilas de compost en fase termofílica. Extraído el 12 de noviembre, 2007 de, *http://www.biologia.org/revista/pdfs/54.pdf*

**Robinson, J. B. and O. H. Tuovinen**. (1984). Mechanisms of microbial resistance an detoxification of mercury and organomercury compounds: physiological, biochemical, and genetic analysis. Microbiol.Rev. **48**:95-124.

**Rose A.H.** (1977). Microbiología química. 3° edición. Madrid, Alhambra, cap. 3.

**Rosenberg, E.** (1997). Bioemulsans: microbial polymeric emulsifiers. Curr.Opin.Biotechnol. **8**:313-316.

**Rosenberg, E. and E. Z. Ron**. (1999). High- and low-molecularmass microbial surfactants. Appl.Microbiol.Biotechnol. **52**:154-162.

**Sabaté, J., M. Grifoll, M. Viñas y A. M. Solanas.** (1999). Isolation and characterization of 2-methylphenanthrene utilizing bacterium: identification of ring cleavage metabolites. *Appl.Microbiol. Biotechnol.* **52**:704-712.

**Saier MH.** (1997). Peter Mitchell and his chemiosmotic theories. ASM News 63 (1) 13-21.

**Sugiura, K, M. Ishihara, T. Shimauchi y S. Harayama.** (1997). Physichochemical Properties and Biodegradability of Crude Oil. *Environ. Sci. Technol.***31**:45-51.

**Todar, Kenneth,** (2000). Pseudomonas aeruginosa. Universidad del departamento de Wisconsin-Madison de la bacteriología.

**Tsutsumi, H., Y. Hirota, and A. Hirashima**. (2000). Bioremediation on the shore after an oil spill from the Nakhdoka in the Sea of Japan. II. Toxicity of a bioremediation agent with microbiological cultures in aquatic organisms. Marine Poll.Bull. **40**:315-319.

**Tsutsumi, H., M. Kono, K. Takai, T. Manabe, M. Haragushi, I. Yamamoto, and C. Oppenheimer**. (2000). Bioremediation on the shore after an oil spill from the Nakhdoka in the sea of Japan. III. Field test of a bioremediation agent with microbiological cultures for the treatment of an oil spill. Marine Poll.Bull. **40**:320-324.

**UMMS, (2000)**. Genética de Microorganismos, Capitulo V, Extraído el 3 de agosto, 2007, de *http://www.umss.edu.bo/epubs/etexts/downloads/29/cap5,2.htm.*

**UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA,** (2000). Facultad de Agronomia, Control biológico, Extraído el 5 de agosto, 2007, de *http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/cursos/fitopato/practicas/cbiologico.htm.*

**Van Hamme, J. D., A. Singh y O. P. Ward.** (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**:503-549.

**Val, D.** (2006), Técnicas de tinción. Fundamentos, Extraído el 10 de agosto, 2007, de *http://www.danival.org/_def_resumen.php.*

**Vazquez-Duhalt, R.** (2000). Environmental oil biocatalysis, p. 191- 207. *In* E. J. Olguin, G. Sanchez, and E. Hernandez (eds.), Environmental biotechnology and cleaner bioprocesses. Taylor and Francis Publishers, London.

**Venkateswaran, K., K. M. R. Hoaki, y T. Maruyama.** (1995). Microbial degradation of resins fractionated from Arabian light crude oil. *Can. J. Microbiol*. **41**:418-424.

**Warhurst, A. M. and C. A. Fewson**. (1994). Biotransformations catalyzed by the genus *Rhodococcus* . Crit.Rev.Biotechnol. **14**:29-73.

**Wilson, S. C. and K. C. Jones**. (1993). Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. Environ.Pollut. **80**:229-249.

**Yanchinski, S.** (1987). Boom and Bust in the Bio Business. New Scientist 1544:44.

## ANEXOS

Anexo A. Datos de unidades formadoras de colonia a diferentes temperaturas obtenidos de las cinco cepas estudiadas y el consorcio formado.

| TEMPERATURA | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | UFC | | | LOG UFC | | |
| **Rep.** | **Tratamientos** | **Grupos** | **I** | **II** | **III** | **I** | **II** | **III** |
| 1 | C1X1H1 | | $30x10^{14}$ | $31x10^{14}$ | $35x10^{14}$ | 15,477 | 15,491 | 15,544 |
| 2 | C1X1H2 | | $48\ x10^{18}$ | $56x10^{18}$ | $50\ x10^{18}$ | 19,681 | 19,748 | 19,699 |
| 3 | C1X2H1 | Cepa 1 | $160x10^{15}$ | $170x10^{15}$ | $170x10^{15}$ | 17,204 | 17,230 | 17,230 |
| 4 | C1X2H2 | | $67\ x10^{19}$ | $66\ x10^{19}$ | $60\ x10^{19}$ | 20,826 | 20,820 | 20,778 |
| 5 | C2X1H3 | | $37\ x10^{8}$ | $35\ x10^{8}$ | $33\ x10^{8}$ | 9,568 | 9,544 | 9,519 |
| 6 | C2X1H4 | | $120x10^{12}$ | $130x10^{12}$ | $140x10^{12}$ | 14,079 | 14,114 | 14,146 |
| 7 | C2X2H3 | Cepa 2 | $40\ x10^{8}$ | $50\ x10^{8}$ | $45\ x10^{8}$ | 9,602 | 9,699 | 9,653 |
| 8 | C2X2H4 | | $35\ x10^{12}$ | $39\ x10^{12}$ | $34\ x10^{12}$ | 13,544 | 13,591 | 13,531 |
| 9 | C3X1H1 | | $36\ x10^{16}$ | $48\ x10^{16}$ | $47\ x10^{16}$ | 17,556 | 17,681 | 17,672 |
| 10 | C3X1H2 | Cepa 3 | $30\ x10^{18}$ | $31\ x10^{18}$ | $32\ x10^{18}$ | 19,477 | 19,491 | 19,505 |
| 11 | C4X1H1 | | $34\ x10^{16}$ | $38\ x10^{16}$ | $40\ x10^{16}$ | 17,531 | 17,580 | 17,602 |
| 12 | C4X1H2 | | $68\ x10^{20}$ | $60\ x10^{20}$ | $56\ x10^{20}$ | 21,833 | 21,778 | 21,748 |
| 13 | C4X3H1 | Cepa 4 | $40\ x10^{13}$ | $45\ x10^{13}$ | $50\ x10^{13}$ | 14,602 | 14,653 | 14,699 |
| 14 | C4X3H2 | | $30\ x10^{17}$ | $32\ x10^{17}$ | $33\ x10^{17}$ | 18,477 | 18,505 | 18,519 |
| 15 | C5X1H1 | | $33\ x10^{13}$ | $40\ x10^{13}$ | $35\ x10^{13}$ | 14,519 | 14,602 | 14,544 |
| 16 | C5X1H2 | Cepa 5 | $80\ x10^{17}$ | $79\ x10^{17}$ | $75\ x10^{17}$ | 18,903 | 18,898 | 18,875 |
| 17 | CCX1H1 | | $52\ x10^{14}$ | $50\ x10^{14}$ | $43\ x10^{14}$ | 15,716 | 15,699 | 15,633 |
| 18 | CCX1H2 | Consorcio | $40\ x10^{15}$ | $50\ x10^{15}$ | $45\ x10^{15}$ | 16,602 | 16,699 | 16,653 |

Anexo B. Datos de unidades formadoras de colonia a diferentes condiciones de pH obtenidos de las cinco cepas estudiadas y el consorcio formado.

| pH | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | UFC | | | LOG(UFC+2) | | |
| **Rep.** | **Tratamientos** | **Grupos** | **I** | **II** | **III** | **I** | **II** | **III** |
| 1 | C1P1H1 | | $30x10^{14}$ | $31\ x10^{14}$ | $35\ x10^{14}$ | 15,477 | 15,491 | 15,544 |
| 2 | C1P1H2 | | $48\ x10^{18}$ | $56\ x10^{18}$ | $50\ x10^{18}$ | 19,681 | 19,748 | 19,699 |
| 3 | C1P2H1 | Cepa 1 | 0 | 0 | 0 | 0,301 | 0,301 | 0,301 |
| 4 | C1P2H2 | | $30\ x10^{18}$ | $31\ x10^{18}$ | $30x10^{18}$ | 19,477 | 19,491 | 19,477 |
| 5 | C1P3H1 | | $63\ x10^{13}$ | $50\ x10^{13}$ | $53\ x10^{13}$ | 14,799 | 14,699 | 14,724 |
| 6 | C1P3H2 | | $83\ x10^{17}$ | $97\ x10^{17}$ | $107x10^{17}$ | 18,919 | 18,987 | 19,029 |
| 7 | C2P1H3 | | $37\ x10^{8}$ | $35\ x10^{8}$ | $33\ x10^{8}$ | 9,568 | 9,544 | 9,519 |
| 8 | C2P1H4 | Cepa 2 | $120x10^{13}$ | $130x10^{13}$ | $140x10^{13}$ | 14,079 | 14,114 | 14,146 |
| 9 | C3P1H1 | | $36\ x10^{16}$ | $48\ x10^{16}$ | $47\ x10^{16}$ | 17,556 | 17,681 | 17,672 |
| 10 | C3P1H2 | Cepa 3 | $30\ x10^{18}$ | $31\ x10^{18}$ | $32\ x10^{18}$ | 19,477 | 19,491 | 19,505 |
| 11 | C4P1H1 | | $34\ x10^{16}$ | $38\ x10^{16}$ | $40\ x10^{16}$ | 17,531 | 17,580 | 17,602 |
| 12 | C4P1H2 | | $68\ x10^{20}$ | $60\ x10^{20}$ | $56\ x10^{20}$ | 21,833 | 21,778 | 21,748 |
| 13 | C4P2H1 | Cepa 4 | $120x10^{14}$ | $150x10^{14}$ | $180x10^{14}$ | 16,079 | 16,176 | 16,255 |
| 14 | C4P2H2 | | 0 | 0 | 0 | 0,301 | 0,301 | 0,301 |
| 15 | C5P1H1 | | $33\ x10^{13}$ | $40\ x10^{13}$ | $35\ x10^{13}$ | 14,519 | 14,602 | 14,544 |
| 16 | C5P1H2 | Cepa 5 | $80\ x10^{17}$ | $79\ x10^{17}$ | $75\ x10^{17}$ | 18,903 | 18,898 | 18,875 |
| 17 | CCP1H1 | | $52\ x10^{14}$ | $50\ x10^{14}$ | $43\ x10^{14}$ | 15,716 | 15,699 | 15,633 |
| 18 | CCP1H2 | Consorcio | $40\ x10^{15}$ | $50\ x10^{15}$ | $45\ x10^{15}$ | 16,602 | 16,699 | 16,653 |