



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

TÍTULO:

**BIOTRANSFORMACIÓN DE FENANTRENO CON CEPAS
BACTERIANAS PRODUCTORAS DE BIOSURFACTANTES**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADA EN
BIOLOGÍA

PRESENTA

MARÍA JOSÉ SÁNCHEZ SERRANO

DIRECTOR DE TESIS

GUSTAVO YAÑEZ OCAMPO

CODIRECTOR DE TESIS

GRACIANO CALVA CALVA



TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO



Índice de figuras

Figura 1. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (SEMARNAT, 2017) 14

Figura 2. Rutas de dispersión de los HAP en ambientes marinos (McGenity et al., 2012)..... 15

Figura 3. Región de bahía y K del fenantreno, esenciales para su biodegradación (Waigi et al.,2015) 17

Figura 4. Mecanismos que mejoran la biodisponibilidad de hidrocarburos aromáticos policíclicos utilizando biosurfactantes (Schippers et al., 2000). 22

Figura 5. Ruta general de la biodegradación aeróbica de los hidrocarburos por microorganismos (Das y Chandran, 2011). 25

Figura 6. Ruta metabólica de biodegradación del fenantreno por Pseudomonas aeruginosa (Deveryshetty y Phale, 2009)..... 26

Figura 7. Compuestos de biodegradación del FNN y primeros precursores de la formación del (1-hidroxi-2-ácido naftoico) (Habe y Omari,2003) 27

Figura 8. Morfología colonial bacteriana de las cepas bacterianas productoras de biosurfactantes (BS): a) cepa 2214 b) P. aeruginosa ATCC 27853, c) cepa 2, descrita en agar nutritivo incubadas por 24 h a 30 °C 43

Figura 9. Morfología microscópica bacteriana de las cepas bacterianas productoras de biosurfactantes (BS) a) cepa 2 b) cepa 2214 (bacilos cortos) c) P. aeruginosa ATCCC 27853 (aumento 100 x)..... 44

Figura 10. Ensayo en agar sólido de sales minerales (MM2) con fenantreno (FNN) como única fuente de carbono, con 8 días de incubación a 30 ° C. 45

Figura 11. Crecimiento por densidad óptica (DO) de las cepas bacterianas productoras de biosurfactantes (BS) en medio líquido de sales minerales sin fenantreno (**MSM SIN FNN**), MSM más fenantreno (0.25 g/L) (**MSM+FNN**), en MSM más fenantreno (0.25 g/L) y glucosa (1g/L) (**FNN+GLC**), y MSM con fenantreno sin adición de microorganismos (**CONTROL**)..... 47

Figura 12. pH del medio de cultivo de las tres cepas bacterianas productoras de biosurfactantes (BS) en medio líquido de sales minerales sin fenantreno (**MSM SIN FNN**), en MSM más fenantreno (0.25 g/L) (**MSM+FNN**), MSM más fenantreno (0.25 g/L) y glucosa (1g/L) (**FNN+GLC**), y MSM con fenantreno sin adición de microorganismos (**CONTROL**)..... 50

Figura 13. Espectro del fenantreno detectado en el extracto libre de células de los dos tratamientos, a través del análisis en HPLC de fase reversa. 56

Figura 14. Cromatogramas del fenantreno presente en el MSM con fenantreno (**MSM+FNN**) y en el medio con fenantreno más glucosa (**FNN+GLC**) sin adición de biomasa (control abiótico). 56

Figura 15. Cromatogramas del fenantreno presente en el medio líquido de sales minerales con fenantreno y glucosa (**FNN+GLC**) de las cepas 2, 2214 y P. aeruginosa ATCC 27853 productoras de biosurfactantes (BS). 58



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

Figura 16. Cromatogramas del fenantreno presente en el medio líquido de sales minerales con fenantreno (**MSM + FNN**) de las cepas 2, 2214 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 productoras de biosurfactantes (BS). 59



Índice de tablas

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de los principales hidrocarburos aromáticos policíclicos (WHO,2003).....	16
Tabla 2. Genes y proteínas codificadas para la biodegradación de fenantreno encontrados en bacterias (Archana et al., 2008).	19
Tabla 3. Biodegradación de fenantreno por bacterias productoras de biosurfactantes (BS).....	20
Tabla 4. Bacterias degradadoras de HAP en condiciones anaeróbicas.	23
Tabla 5. Composición del agar nutritivo (AN).....	34
Tabla 6. Composición del Caldo PY.	35
Tabla 7. Composición del medio de sales minerales (MSM) (Modificado de Henry et al., 2011).....	35
Tabla 8. Composición del agar de sales minerales (MM2) (Reddy et al., 2010)...	36
Tabla 9. Tratamientos utilizados para evaluar el crecimiento y pH del medio de la cepa 2, cepa 2214 y P. aeruginosa ATCC 27853.....	39
Tabla 10. Tratamientos utilizados para evaluar la biotransformación y biodegradación del fenantreno (FNN) de la cepa 2, cepa 2214 y P. aeruginosa ATCC 27853.....	41
Tabla 11. Descripción de la morfología macroscópica de las tres cepas bacterianas productoras de biosurfactantes (BS).	43
Tabla 12. Ensayo en medio sólido con fenantreno, para evaluar el crecimiento de las tres cepas bacterianas productoras de biosurfactantes (BS).	46
Tabla 13. Análisis estadístico del crecimiento de las tres cepas bacterianas productoras de biosurfactantes (BS) en medio líquido bajo tres tratamientos.	48
Tabla 14. Análisis estadístico del pH del medio de cultivo de las tres cepas bacterianas productoras de biosurfactantes (BS) en medio líquido bajo tres tratamientos.	51
Tabla 15. Porcentaje de biodegradación del fenantreno por las cepas bacterianas productoras de BS; cepa 2, cepa 2214, P. aeruginosa ATCC 27853 y el control (medio sin adición de microorganismos).	53



Contenido

Resumen 11

1. Introducción 12

2.Marco teórico 13

2.1 Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) 13

2.2 Origen de los hidrocarburos aromáticos policíclicos 14

2.3 Propiedades fisicoquímicas de los HAP 15

2.4 Fenantreno..... 16

2.5 Impacto ambiental de la contaminación por constituyentes del petróleo; hidrocarburos aromáticos policíclicos 17

2.6 Bacterias degradadoras de hidrocarburos aromáticos policíclicos 18

2.7 Bacterias productoras de biosurfactantes 19

2.8 Biosurfactantes..... 21

2.9 Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos 23

 2.9.1 Biodegradación anaerobia de los HAP 23

 2.9.2 Biodegradación aeróbica de los HAP 24

2.10 Ruta metabólica de biodegradación del fenantreno 26

 2.10.1 Compuestos de biodegradación del fenantreno..... 27

2.11Cometabolismo de bacterias degradadoras de hidrocarburos aromáticos policíclicos 28

2.12 Biorremediación por bacterias degradadoras de hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua contaminada. 29

2.13 Factores que intervienen en la biorremediación por bacterias degradadoras de hidrocarburos aromáticos policíclicos..... 29

 2.13.1 pH 29

 2.13.2 Salinidad 30

 2.13.3 Temperatura..... 30

3.Justificación..... 31

4.Hipótesis..... 32

5.Objetivos..... 33

 5.1 General..... 33

 5.2 Específicos..... 33

6. Materiales y métodos 34

6.1 Material biológico 34

6.2 Materiales y reactivos..... 34



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

6.3.1 Agar Nutritivo (AN)	34
6.3.2 Caldo peptona extracto de levadura (PY)	34
6.3.3 Medio líquido de sales minerales (MSM)	35
6.3.4 Agar sólido de sales minerales (MM2)	36
6.4 Reactivación del material biológico	36
6.4.1 Procedimiento de reactivación en agar nutritivo.	36
6.5 Descripción de la morfología colonial y microscópica bacteriana	37
6.5.1 Morfología colonial	37
6.5.2 Morfología microscópica por medio de Tinción Gram	37
6.6 Ensayo en medio sólido para estudiar el crecimiento con fenantreno como única fuente de carbono.....	37
6.6.1 Técnica del dispersor	38
6.6.2 Técnica Top Agar	38
6.6.3 Técnica Varilla de Vidrio	38
6.7 Producción del inóculo bacteriano.....	38
6.8 Diseño experimental para las cinéticas en medio líquido con FNN.....	39
6.8.1 Cuantificación del crecimiento bacteriano en cinéticas en medio líquido	40
6.8.2 Cuantificación del pH del medio de cultivo	40
6.8.3 Biotransformación y biodegradación del FNN durante cinéticas de crecimiento.	40
6.8.2.3 Cuantificación de fenantreno	41
6.9 Análisis Estadístico.....	42
7.Resultados y discusión.....	43
7.1 Morfología macroscópica de las cepas bacterianas	43
7.2 Morfología microscópica de las cepas bacterianas	44
7.3 Ensayo en medio sólido para estudiar el crecimiento con fenantreno como única fuente de carbono.....	45
7.4 Cinéticas de crecimiento en medio líquido de las cepas bacterianas.	47
7.5 Medición del pH del medio de cultivo.....	49
7.6 Biodegradación y biotransformación de fenantreno.....	52
7.6.1 Biotransformación del fenantreno.....	55
8.Conclusiones	62
10.Referencias.....	63
11.Anexos.....	71



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

Abreviaturas

AN	Agar nutritivo
BS	Biosurfactante
ETOH ABS	Etanol absoluto
FNN	Fenantreno
HAP	Hidrocarburos Aromáticos Políciclicos
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
MSM	Medio de Sales Minerales
MM2	Agar Medio Mineral
μL	Microlitros
mM	Milimol
μM	Micromol



Resumen

El fenantreno es un hidrocarburo aromático policíclico (HAP) considerado uno de los 16 contaminantes prioritarios según la Agencia de Protección al Ambiente de Estados Unidos. Se encuentra en altas concentraciones en el medio acuoso.

Los biosurfactantes (BS) microbianos son una estrategia fisiológica que mejora la solubilización y disponibilidad del hidrocarburo para su tratamiento. Los BS contribuyen a la biodegradación del fenantreno. En este trabajo se utilizaron tres cepas bacterianas productoras de biosurfactantes; la cepa 2, 2214 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 aisladas de un proceso de digestión anaerobia. Se cultivaron en medio líquido de sales minerales adicionado fenantreno (0.25 g/L) como única fuente de carbono y glucosa (1 g/L) como fuente alterna de carbono para evaluar su crecimiento, la tasa de biodegradación y la biotransformación del fenantreno.

Las tres cepas bacterianas fueron capaces de crecer y biodegradar el fenantreno como única fuente de carbono y en metabolismo con glucosa. La adición de glucosa favoreció el crecimiento microbiano. Mientras que el crecimiento del fenantreno como única fuente de carbono no es estadísticamente diferente a cuando está ausente en el medio líquido de sales minerales. El pH neutro promueve un crecimiento óptimo de las bacterias.

El análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución evidenció que las cepas bacterianas degradan máximo un 32% y 18% del fenantreno, utilizado como única fuente de carbono y en metabolismo con glucosa, respectivamente. La cepa 2214 utilizó eficientemente el fenantreno hasta las 48 h de cultivo y degradó estos porcentajes en las primeras 48 y 24 h de cultivo, respectivamente. En los cromatogramas se detectó el pico de fenantreno a los 31.05 min. No se detectó la presencia de intermediarios del metabolismo del hidrocarburo.



1. Introducción

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son contaminantes orgánicos ubicuos en el ambiente. Se originan de manera natural por combustión incompleta de la materia orgánica y por actividades antropogénicas. El turismo, la extracción, tratamiento y transporte de combustibles fósiles son la principal causa de la presencia de estos en ambientes acuáticos contaminados (Souza *et al.*, 2014).

Los HAP están constituidos por dos o más anillos de benceno fusionados y se clasifican en dos categorías por el número de anillos presentes: HAP de bajo peso molecular y HAP de alto peso molecular (Chauchan *et al.*, 2008). Estos compuestos orgánicos presentan alta hidrofobicidad y estabilidad química, lo que incrementa con el número de anillos.

El fenantreno (FNN) es un HAP tricíclico de bajo peso molecular. Sus propiedades fisicoquímicas le confieren baja solubilidad acuosa, poca volatilidad y una gran afinidad por las partículas del sedimento. Su facilidad de adsorberse a las superficies acuáticas facilita su acumulación y evita su biodisponibilidad en el ambiente (Chauchan *et al.*, 2008).

Diversos estudios realizados en playas del Golfo de México han reportado el fenantreno como uno de los HAP más abundantes. Esto es un grave problema ambiental, ya que el FNN puede afectar gravemente la vida humana y alterar la dinámica de los ecosistemas acuáticos. El fenantreno (FNN) es también uno de los 16 contaminantes prioritarios según la Agencia de Protección al Ambiente de Estados Unidos, debido a sus características tóxicas, mutagénicas y carcinógenas (Parab y Phadke, 2020).

La biodegradación microbiana es una de las alternativas más importantes y significativas para combatir esta problemática. Diversas especies de microorganismos son eficaces para remover por encima del 90 % del fenantreno (FNN) presente en el medio (Tian *et al.*, 2002). Esta biodegradación ocurre vía metabolismo o cometabolismo. El cometabolismo es especialmente importante para la degradación de mezclas de HAP y cuando se provee de una fuente alterna de crecimiento más fácilmente asimilable, como la glucosa.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

Especies del género *Pseudomonas* pueden crecer en un medio donde el fenantreno (FNN) es utilizado como fuente primaria de crecimiento y así metabolizarlo para originar intermediarios metabólicos utilizados para obtener energía y mayor biomasa celular (Prabhu y Pale, 2003). Especialmente estos microorganismos producen biosurfactantes (BS). Los BS son compuestos anfifílicos, es decir contienen una porción hidrofílica y otra hidrofóbica. Se producen durante la actividad microbiana, ya sea que se excreten al medio o sean de tipo intracelular, contribuyen a la solubilización del fenantreno. Los biosurfactantes mejoran la interacción de la superficie celular bacteriana con el contaminante y facilitan la biodisponibilidad del fenantreno para los microorganismos, promoviendo su biodegradación (Pedetta *et al.*, 2012).

El presente trabajo pretende evaluar la capacidad de biotransformación y biodegradación del fenantreno como única fuente de carbono y en cometabolismo con glucosa por parte de tres cepas bacterianas capaces de crecer en presencia de sustratos hidrofóbicos (aceite de cocina) y producir biosurfactantes.

2.Marco teórico

2.1 Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)

Según la FAO (2019) son un grupo de contaminantes orgánicos que contienen dos o más anillos aromáticos fusionados, formados por átomos de carbono e hidrógeno. Los HAP forman parte natural del petróleo, el cual está constituido tanto por hidrocarburos alifáticos, aromáticos, asfaltenos (fenoles, ácidos grasos, cetonas, ésteres y porfirias), y resinas (piridinas, quinolinas, y amigas) (García & Aguirre, 2016).

Dependiendo del número de anillos de benceno presentes, los HAP se han clasificado en dos categorías: 1) de *bajo peso molecular* (2 a 3 anillos), 2) de *alto peso molecular* (más de 4 anillos). De acuerdo con la USEPA (Agencia de Protección al Ambiente de Estados Unidos), se han clasificado 16 de estos HAP como contaminantes prioritarios (**Figura 1**), debido a sus características tóxicas, cancerígenas, mutagénicas y por los diversos efectos adversos en la salud de los humanos.




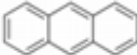

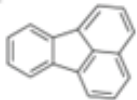
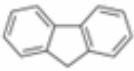

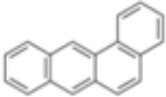

Naftaleno (Naf)		Fenantreno (Fen)	
Acenaftileno (Aci)		Antraceno (Ant)	
Acenafteno (Ace)		Fluoranteno (Ft)	
Fluoreno (Flu)		Pireno (Pir)	
Benzo(a)antraceno (BaA)		Benzo(a)pireno (BaP)	

Figura 1. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (SEMARNAT, 2017)

2.2 Origen de los hidrocarburos aromáticos policíclicos

Se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente: aire, suelo, sistemas fluviales, a lo largo de la columna del agua y principalmente en sedimentos marinos. Son resultado de la combustión incompleta o pirólisis de materia orgánica como el carbón, petróleo y gasolina, así como de incendios forestales y erupciones volcánicas (Archana *et al.*, 2008).

Según su origen se clasifican dentro de tres categorías: biogénico, pirogénico y petrogénico:

HAP biogénicos: son producto de procesos metabólicos de organismos microscópicos o de la degradación de materia orgánica, ya sea en condiciones aerobias o anaerobias. Siendo la fuente principal de los HAP de 4,5, y 6 anillos.

HAP pirogénicos: son producto de la combustión incompleta de material orgánico y combustibles fósiles, y se considera la fuente principal de compuestos de 3 y 5 anillos.

HAP petrogénicos: los cuales son producto del vertido de productos petrolíferos y/o algunas actividades industriales del petróleo, los cuales ingresan al ambiente en fase gaseosa (evaporación-depósito) y en fase líquida (derrame de crudo) (Ortiz *et al.*, 2012).

Una vez presentes en el medio, estos pueden dispersarse en el medio acuático. Existen 6 rutas de dispersión de los contaminantes en ambientes marinos (**Figura 2**); evaporación, emulsificación, dispersión, disolución, adsorción y sedimentación.

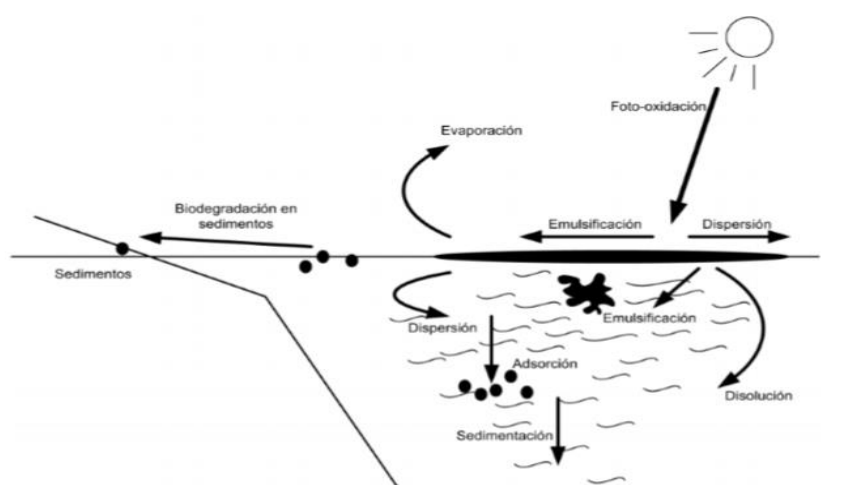


Figura 2. Rutas de dispersión de los HAP en ambientes marinos (McGenity *et al.*, 2012)

2.3 Propiedades fisicoquímicas de los HAP

Son compuestos hidrófobos, no polares y prácticamente insolubles en agua y con un coeficiente de reparto octanol- agua alto (**Tabla 1**), lo que reduce su biodisponibilidad y los convierte en contaminantes persistentes en el ambiente (Archana *et al.*, 2008).

Los HAP de alto peso molecular se unen con mayor facilidad a partículas orgánicas suspendidas en la columna de agua formando parte de los sedimentos marinos para convertirse en los principales depósitos de este contaminante (Oliva *et al.*, 2015). Contrariamente, los HAP de bajo peso molecular dominan la fase disuelta del agua (Douben, 2003).

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de los principales hidrocarburos aromáticos policíclicos (WHO,2003).

HAP	Peso molecular (g/mol)	Densidad (g/cm ³)	Solubilidad (mg/L)	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)	Presión vapor (pa)	Coefficiente de reparto octanol/agua (log Pow)
Naftaleno	128.8	1.16	31	80	218	8.64	3.6
Fluoreno	166.22	1.20	1.8	116	295	8x10 ⁻²	4.18
Fenantreno	178.23	1.18	1.29	101	340	1.6x10 ⁻²	4,46
Antraceno	178.23	1.25	Insoluble	216	340	8x10 ⁻³	4.50
Fluoranteno	202.26	1.25	Insoluble	110.8	375	1.2x10 ⁻³	5.22
Benzo a-pireno	251.31	1.24	Insoluble	178.1	495	7.3x10 ⁻⁷	6.50

2.4 Fenantreno

Es un HAP tricíclico (tres anillos de benceno fusionados) de estructura angular, tiene apariencia cristalina que se origina de la combustión de materiales orgánicos; es uno de los principales componentes del carbón y combustibles fósiles (Waigi *et al.*, 2015).

El fenantreno (FNN) tiene bajo peso molecular (178.23 g/mol), es de carácter hidrofóbico-apolar, y con una baja solubilidad en agua (1.29 mg/L) (Pedetta *et al.*, 2012). Presenta alta toxicidad y persistencia en el medio ambiente, lo que se debe principalmente a su poca volatilidad y alto coeficiente de reparto octanol-agua. Lo anterior contribuye a su fácil adsorción y potencial bioconcentración (**Tabla 1**) (Waigi *et al.*, 2015).

Se utiliza como modelo en estudios de biorremediación de sitios contaminados con HAP, debido a sus características químicas; presenta dos regiones que determinan la especificidad de las enzimas capaces de degradar este contaminante (**Figura 3**); la región de la bahía (*bay- region*), es un área entre los átomos de carbono 4 y 5, y la región K (*K- region*) que es el doble enlace entre el carbono 9 y 10, presenta una alta densidad de electrones (Mrozik *et al.*, 2003).

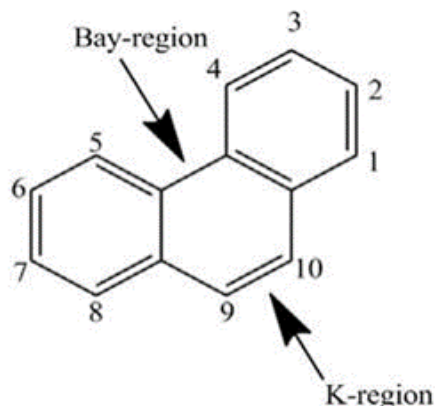


Figura 3. Región de bahía y K del fenantreno, esenciales para su biodegradación (Waigi et al.,2015)

2.5 Impacto ambiental de la contaminación por constituyentes del petróleo; hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en el medio acuático representan una grave problemática ambiental. Originan consecuencias graves cuando se acumulan en los sedimentos marinos, en la columna de agua o se adhieren a las especies acuáticas distribuidas en el ecosistema, debido a que son compuestos altamente tóxicos.

Por su potencial carcinogénico, mutagénico y teratogénico los hidrocarburos originan diversos efectos negativos sobre la flora y fauna marina. Efectos como muerte por asfixia, aumento de infecciones en especies de aves acuáticas debido a la absorción de cantidades subletales de petróleo, y alteración e incorporación de carcinógenos en la cadena alimentaria (Das y Chandran, 2011), son algunos ejemplos.

Derivado de derrames petroleros, las manchas de aceites presentes en la superficie de agua afectan a los organismos plantónicos. Estas manchas de aceite limitan el intercambio gaseoso y reducen la entrada de luz lo que interviene en el proceso fotosintético del fitoplancton. Huang *et al.*, (2010) mencionan que el petróleo crudo tiene efectos negativos en el crecimiento del fitoplancton, al reducir la adsorción de CO₂ y nutrientes. Además, se ha comprobado que el petróleo daña la estructura



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

celular y sistema de membranas del fitoplancton e interfiere en el funcionamiento del sistema de defensa (Aksmann y Tukaj 2008; Wang y Zheng 2008) y bloquea la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas (Bopp & Lettieri, 2007).

De igual manera la reducción en la entrada de la luz en la columna de agua afecta los procesos fotosintéticos realizados por plantas verdes o algas. Lo que genera una alteración dinámica de estos ecosistemas, pues las algas realizan la absorción del 80 % de energía en los 10 primeros metros de la superficie marina (McGenity *et al.*, 2012)

Los efectos subletales sobre otros organismos marinos abarcan desde malformaciones, pérdida de fertilidad, inmunodeficiencia en vertebrados e invertebrados, reducción del nivel de eclosión de huevos, alteraciones en su comportamiento y gran cantidad de efectos derivados de la toxicidad del vertido (Reynaud *et al.*, 2004; Gagnaire *et al.*, 2006). Tal es el caso de mejillones y otros moluscos que se adhieren a rocas u objetos, evitando su adhesión y cayendo al fondo, impidiendo así su capacidad de alimentarse. Otro ejemplo, son los arrecifes de coral, que se ven afectados en su reproducción, tasa de crecimiento, capacidades de colonización y alimentación lo que evita a esta comunidad compleja e importante proporcionar sustrato y refugio para una amplia variedad de animales (McGenity *et al.*, 2012)

2.6 Bacterias degradadoras de hidrocarburos aromáticos policíclicos

Las bacterias que degradan HAP cuentan con las capacidades metabólicas para para lograr utilizar estos contaminantes como fuente de carbono y energía necesaria para su crecimiento. Durante el metabolismo de los hidrocarburos generan otro tipo de compuestos químicos accesibles en el medio como carbohidratos, ácidos grasos y enzimas (Zhon *et al.*, 2007).

La actividad fisiológica y la capacidad enzimática son específicas entre microorganismos, y dependientes de las condiciones ambientales y la naturaleza del contaminante. En el medio natural, la degradación de los HAP puede ocurrir en condiciones aeróbicas o anaeróbicas; en condiciones donde el oxígeno está presente, la actividad de peroxidasas y oxigenasas es primordial. Mientras que en

ausencia de oxígeno molecular se llevan a cabo reacciones enzimáticas más complejas como metanogénesis, carboxilación o metilación (Boll, 2020).

Una gran variedad de microorganismos clasificados como Gram (-) y Gram (+) son capaces de metabolizar los HAP. Se han aislado y caracterizado fisiológica y molecularmente cepas microbianas del suelo y de sedimentos marinos donde han sido vertido petróleo y sus derivados; *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus Alcanivorax*, *Marinobacter Bacillus*, *Sphingomonas* son algunos géneros (Kotska et al., 2011).

Las bacterias degradadoras de HAP desarrollan tolerancia al ambiente y modifican sus genomas o cambia su maquinaria genética para desintoxicar o degradar productos químicos que persisten en el medio ambiente. Genes como como *pah*, *nid*, *nah*, *dox* y *bph* se sabe que están involucrados en la degradación de contaminantes orgánicos aromáticos (**Tabla 2**) (Archana et al., 2008)

Tabla 2. Genes y proteínas codificadas para la biodegradación de fenantreno encontrados en bacterias (Archana et al., 2008).

Microorganismo	Localización del gen	Gen	Proteína codificada o función
<i>Pseudomonas putida C18</i>	Plásmido	DoxE DoxD NahAa / Ab	Cis- Naftaleno dioxigenasa dihidriol Reductasa Ferredoxina
<i>Pseudomonas putida OUS82</i>	Cromosoma	pahAb	Ferredoxina
<i>P. aeruginosa Pak1</i>	Cromosoma	Pah	Ferrodixina
<i>Algaligenes faecalis</i>	Plásmido	phnAa	Ferredoxina reductasa

2.7 Bacterias productoras de biosurfactantes

Existen microorganismos capaces de producir biosurfactantes (BS) es decir moléculas anfifílicas con una porción soluble en agua y otra hidrofóbica. Estos BS se ubican en la interfase de los fluidos en sistemas de aceite-agua y aire-agua. Al

poder interactuar con ambas fases, los BS contribuyen a mejorar la solubilidad y biodisponibilidad de compuestos orgánicos poco solubles en agua, como el fenantreno.

En la **Tabla 3** se enlistan algunos de los microorganismos capaces de producir BS. En estos estudios se comprobó la eficiencia de los biosurfactantes (BS) en la degradación del fenantreno. El fenantreno tuvo una degradación alta con concentraciones menores (10-50), hasta concentraciones de 300 mg/L.

Las especies del género *Pseudomonas* forman un gran grupo de bacterias productoras de biosurfactantes (BS) capaces de degradar hasta 100 % del fenantreno. Producen mono o di-ramnolípidos, los cuales están formados por un glucósido de B-hidrodecanoil, B-hidrodecanoato y una o dos moléculas de ramnosa. A los ramnolípidos se les atribuyen características antimicrobianas, y se les relaciona con la movilidad tipo “swarming” de la bacteria.

Tabla 3. Biodegradación de fenantreno por bacterias productoras de biosurfactantes (BS).

Autor	Bacteria	Fenantreno (mg/L)	Tasa de Biodegradación (%)	Tiempo
(Ahmed <i>et al.</i> , 2021)	<i>Klebsiella sp</i> KOD 36	100	56	7 d
(Wang <i>et al.</i> , 2020)	<i>Diaphorobacter</i> YM-6	100	96.3	52 h
(Hou <i>et al.</i> , 2018)	<i>Achromobacter</i> <i>sp</i> LH-1	100	93.3	5d
(Golshan <i>et al.</i> , 2016)	<i>Pseudomonas</i> <i>sp</i>	300	88.4	21 d
(Masakorala <i>et al.</i> , 2013)	<i>Pseudomonas</i> <i>sp.</i> USTB- BR	100	100	8 d
(Henry <i>et al.</i> , 2011)	<i>Acinetobacter</i> <i>calcoaecitus</i>	10,25,50	100	10 d
(Coppotelli <i>et al.</i> , 2010)	<i>Sphingomonas</i> <i>paucimobilis</i> 20006FA	300	53	20 d



(Reddy <i>et al.</i> , 2010)	<i>Brevibacillus sp.</i> <i>PDM-3</i>	250	93	6 d
------------------------------	--	-----	----	-----

Donde h= horas, d= días, *= sin aplicación externa de surfactantes sintéticos, += aplicación de surfactantes sintéticos.

2.8 Biosurfactantes

El proceso de biodegradación es afectado por la disponibilidad y propiedades fisicoquímicas del contaminante (Parhamfar *et al.*, 2018). Los hidrocarburos de mayor peso molecular permanecen en el medio complicando el proceso (Radhir *et al.*, 2003).

Una alternativa a esta complicación, es la producción de biosurfactantes, los cuales aumentan la disponibilidad de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Datta *et al.*, 2018). Los biosurfactantes (BS) son moléculas producidas por microorganismos, que forman parte de la membrana celular o se excretan al medio de crecimiento para así reducir la tensión superficial y mejorar la dilución de los hidrocarburos en soluciones acuosas. Una vez producidos, se forman agregados estables de 100 a 200 micelas donde los hidrocarburos se solubilizan (Tabatabaee *et al.*, 2005). Además, el biosurfactante induce modificaciones en la membrana celular, cambio en la composición de proteínas confiriendo mayor hidrofobicidad a la pared celular, lo que logra que las células microbianas tengan accesibilidad al contaminante (Souza *et al.*, 2014)

Los biosurfactantes son de 5 tipos: glucolípidos, fosfolípidos, lipopéptidos, ácidos grasos y lipoposacáridos. Estos biotensioactivos logran: 1) aumentar la solubilización de sustratos no polares, fomentando la disponibilidad del contaminante, 2) aumentar la afinidad entre las superficies microbianas y el contaminante, lo que da lugar a la ruptura de la película formada entre el agua y los contaminantes 3) reducir la tensión superficial, debido al decremento de la fuerza de repulsión entre fases líquidas inmiscibles (Hou *et al.*, 2018)

La presencia de biosurfactantes en el medio permite a las bacterias tomar el contaminante del núcleo micelar formado, aumentando significativamente la biodisponibilidad del HAP (Schippers *et al.*, 2000), La **Figura 4** muestra los

mecanismos que mejoran la biodisponibilidad de hidrocarburos aromáticos policíclicos; a) las bacterias toman el contaminante de manera directa del agregado de micelas, b) los HAP son captados mediante la liberación de una micela, c) ocurre la adopción directa de HAP a través del contacto celular-surfactante-HAP, y d) muestra una hipótesis de la mejora de solubilización con biosurfactante debido a una disminución de la longitud de la trayectoria de difusión entre el sitio de adsorción y el sitio de captación.

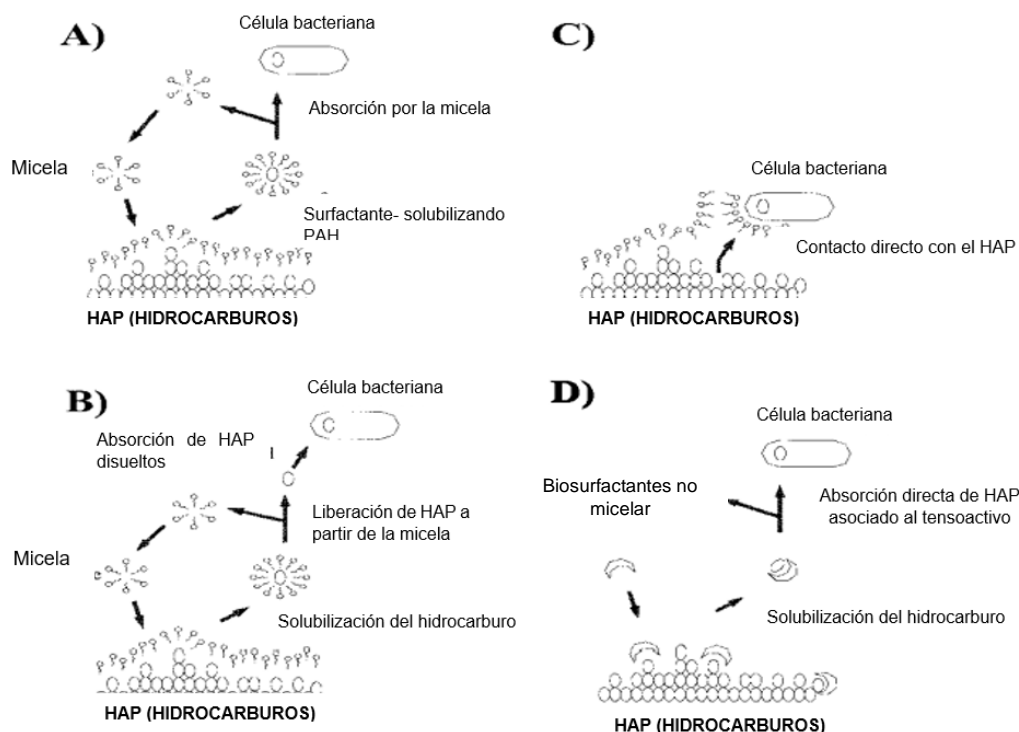


Figura 4. Mecanismos que mejoran la biodisponibilidad de hidrocarburos aromáticos policíclicos utilizando biosurfactantes (Schippers *et al.*, 2000).

Pseudomonas es un género bacteriano que se caracteriza por la producción de ramnolípidos, Los ramnolípidos mejoran la dispersión de los hidrocarburos debido a que se acumulan en la interfaz entre estos compuestos hidrófobos y la fase acuosa. Instalados ahí reducen la tensión interfacial, disminuyendo las fuerzas repulsivas entre estas fases y permitiendo la formación de microgotas (Zeng *et al.*, 2018)



2.9 Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos

La biodegradación es un proceso de transformación de los HAP a otros de menor complejidad por efecto de la actividad biológica, ocurre a través de reacciones bioquímicas como la hidrólisis o reacciones de óxido reducción (Vallero, 2010).

Estas reacciones cambian las características fisicoquímicas del compuesto, aumentando su biodisponibilidad y facilitando la degradación o su completa mineralización (producción de CO₂ y H₂O).

Los HAP pueden ser asimilados y transformados por microorganismos a través del metabolismo o cometabolismo del compuesto. Para que se lleve a cabo la biodegradación es necesario que a) el HAP sea solubilizado, b) que sea transportado al interior de la célula, c) que los microorganismos expresen los “genes degradativos” y d) que ocurra la descomposición enzimática del hidrocarburo en cuestión (Chauchan *et al.*, 2008).

2.9.1 Biodegradación anaerobia de los HAP

Este tipo de biodegradación ocurre principalmente por bacterias que habitan en sistemas acuíferos o sedimentos lacustres y marinos con condiciones anóxicas (**Tabla 4**). En vez de oxígeno como aceptor de electrones, éste es sustituido por nitrato, iones hierro y sulfato para oxidar el anillo aromático del hidrocarburo (Meckenstock y Mouttaki, 2011).

Tabla 4. Bacterias degradadoras de HAP en condiciones anaeróbicas.

Género
<i>Desulfobacterium</i>
<i>Pelotomaculum</i>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

Los microorganismos capaces de degradar HAP en estas condiciones, presentan menor tasa de crecimiento y tiempo de duplicaciones de semanas a meses, por lo que la tasa de biodegradación ocurre muy lentamente (Meckenstock *et al.*, 2016). Y generalmente es de 5 a 10 veces mayor cuando se utiliza nitrato que sulfato (Meckenstock *et al.*, 2004).

La ruta principal de degradación, incluye el ataque del carbono 2 del anillo aromático, ya que este es más electronegativo y favorece una sustitución electrofílica (Meckenstock y Mouttaki, 2011). El principal mecanismo de biodegradación anaeróbica del fenantreno, se basa en la carboxilación del hidrocarburo, generando metabolitos como ácido fenantroico,

2.9.2 Biodegradación aeróbica de los HAP

Generalmente los HAP son metabolizados en condiciones donde el oxígeno está presente, ya que es el tipo de biodegradación más rápida y completa de la mayoría de los contaminantes orgánicos.

El principio fundamental de este tipo de degradación es la oxidación del anillo aromático, a través de la incorporación de oxígeno molecular por medio de reacciones enzimáticas catalizadas por oxigenasas y peroxidasas (**Figura 5**). Una vez oxidados, los compuestos resultantes pueden convertirse en intermediarios del metabolismo central para la biosíntesis celular y utilizados para el crecimiento por medio de la gluconeogénesis (Das y Chandran, 2011).

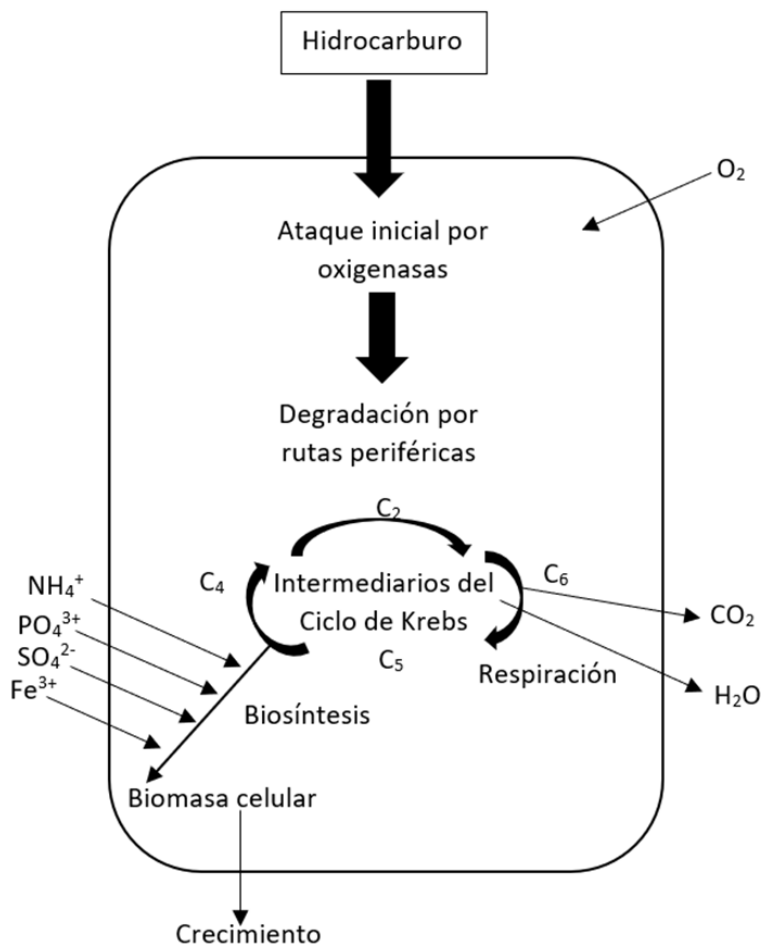


Figura 5. Ruta general de la biodegradación aeróbica de los hidrocarburos por microorganismos (Das y Chandran, 2011).

La introducción de oxígeno al anillo produce alcoholes primarios (cis-dihidrodiol), estos compuestos son rearomatizados por una cis-diol deshidrogenasa para formar intermediarios di-hidroxilados. Luego estos compuestos son escindidos por una dioxigenasa vía orto o meta anillo, para finalmente formar intermediarios del ciclo de Krebs (Habe & Omori, 2003).

Estos intermediarios pueden ser similares a un ácido graso que puede ser degradado por Acetil Co-A mediante beta oxidación, hasta obtener CO_2 y H_2O como productos últimos de la biodegradación (Bracho *et al.*, 2004).

2.10 Ruta metabólica de biodegradación del fenantreno

La **Figura 6** muestra la ruta metabólica de biodegradación del fenantreno por la especie *Pseudomonas aeruginosa*. El metabolismo del fenantreno inicia mediante la hidroxilación de la molécula, por la acción de distintas dioxigenasas e hidroxilasas. Luego por la acción de una aldolasa se origina el compuesto 1-hidroxi-2 ácido naftoico (1H2N). El 1H2N se metaboliza mediante dos vías: 1) donde es convertido a 1-2 dihydroxynaftaleno y se dirige a la **vía de oxidación del naftaleno**, y 2) donde se oxida mediante la vía del **ácido ftálico**, para así originar intermediarios del metabolismo central (Moody *et al.*, 2001).

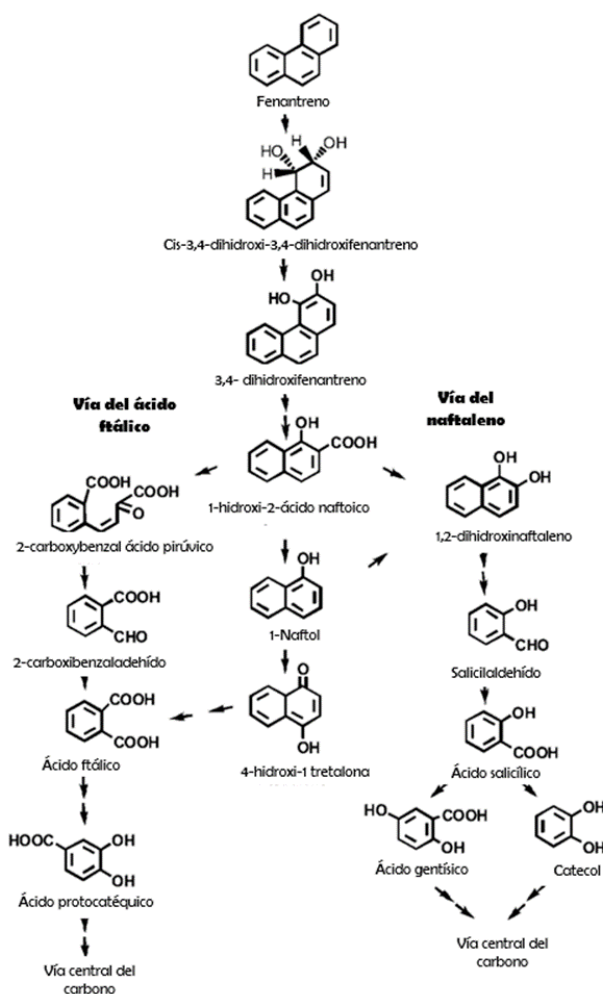


Figura 6. Ruta metabólica de biodegradación del fenantreno por *Pseudomonas aeruginosa* (Deveryshetty y Phale, 2009)

2.10.1 Compuestos de biodegradación del fenantreno

La **Figura 7** muestra los principales compuestos de la biodegradación del fenantreno (FNN). Estos primeros compuestos resultan de la hidroxilación de la molécula del fenantreno por bacterias del género *Pseudomonas*.

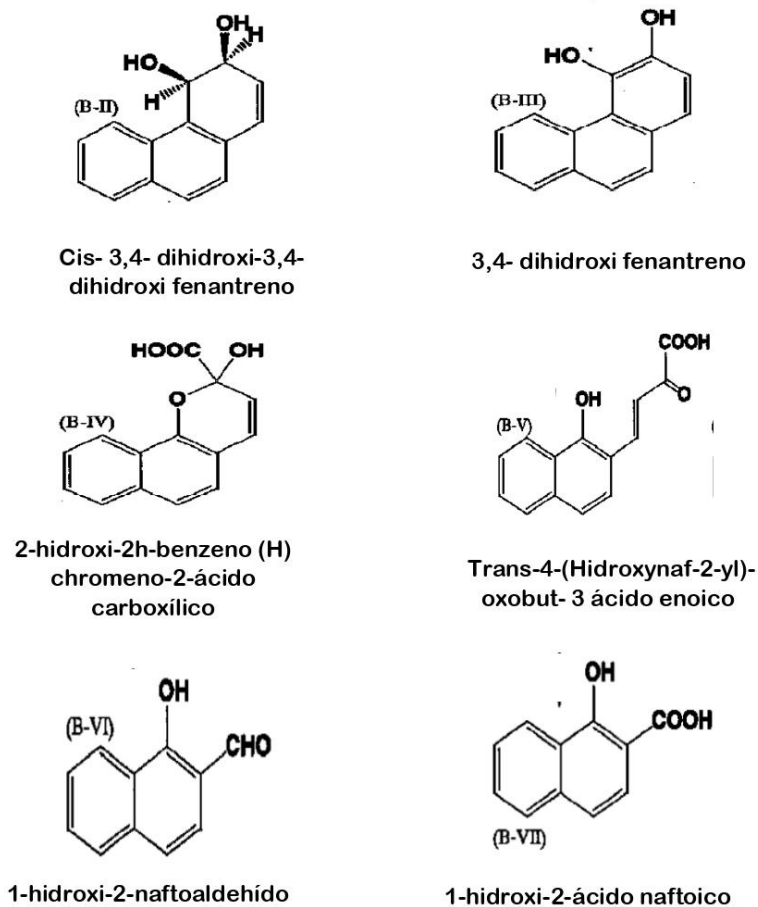


Figura 7. Compuestos de biodegradación del FNN y primeros precursores de la formación del (1-hidroxi-2-ácido naftoico) (Habe y Omari,2003)



2.11 Cometabolismo de bacterias degradadoras de hidrocarburos aromáticos policíclicos

El cometabolismo es la transformación metabólica de un cosustrato en presencia de un sustrato de crecimiento. La tasa de degradación de los hidrocarburos está relacionada con el consumo del sustrato de crecimiento. Este último proporciona la fuente primaria de energía necesaria para el crecimiento y mantenimiento celular (Zhong *et al.*, 2007)

Durante la biodegradación de HAP el cometabolismo aumenta la eficiencia de la biodegradación, ya que el sustrato suele tener un efecto potenciador en este proceso (Ahmed & Ahmed, 2014). Lo anterior depende de a) la interacción sustrato- cosustrato, b) la similitud entre ambos, y c) de las especies microbianas (Nzila, 2013).

Las bacterias degradadoras de HAP, utilizan sustratos de crecimiento que son química o estructuralmente similares a los contaminantes (Nzila, 2013). La glucosa y el extracto de levadura son sustratos mayormente utilizados, ya que conducen a un aumento de la biomasa bacteriana y la generación de agentes reductores (cofactores críticos en reacciones de biodegradación) (Nzila, 2013). La glucosa es también un factor importante en el cometabolismo por bacterias productoras de biosurfactantes (Hou *et al.*, 2013).

Al final de la transformación metabólica, se espera que los compuestos resultantes sean menos peligrosos, o bien, más susceptibles a la degradación biológica. Sin embargo, existe el riesgo de que se originen compuestos acumulables en el ambiente, debido a que no son intermediarios de otras rutas catabólicas o no existen los microorganismos capaces de utilizarlos como sustrato (Zhong *et al.*, 2007).



2.12 Biorremediación por bacterias degradadoras de hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua contaminada.

La biorremediación es un proceso biológico llevado a cabo por una gran variedad de microorganismos que degradan y transforman compuestos químicos tóxicos en otros químicamente distintos e inocuos para el ambiente. La actividad metabólica microbiana culmina con la generación de CO₂ y H₂O (Gómez & Sartaj, 2014).

Este proceso no genera impactos ambientales negativos; es eficiente, de bajo costo y manejo seguro, lo que confiere ventajas comparada con otras alternativas de naturaleza química (Montagnolli *et al.*, 2015). Sin embargo, la eficiencia de la biorremediación varía dependiendo de la clase de hidrocarburo, de su estructura y peso molecular, así como de las condiciones ambientales y composición de la comunidad microbiana autóctona.

Las tasas de biodegradación más alta se han demostrado para los hidrocarburos alifáticos, seguidos de los aromáticos de bajo peso molecular con compuestos polares, mientras que los hidrocarburos aromáticos de alto peso molecular presentan las tasas de biodegradación más bajas (Van Hamme *et al.*, 2003).

2.13 Factores que intervienen en la biorremediación por bacterias degradadoras de hidrocarburos aromáticos policíclicos

2.13.1 pH

Los microorganismos tienen un pH óptimo para el crecimiento en torno a 7, pero son capaces de crecer en un rango de pH de 5 a 8. Sin embargo, en estudios de biodegradación varían los rangos de pH; las tasas de biodegradación más altas suceden en condiciones ligeramente alcalinas (Saadoun y Al-Ghzawi, 2005), lo anterior se debe a que las bacterias heterótrofas muestran un mejor desarrollo en ambientes de un pH ambiental alcalino, ya que influye en el transporte de membrana y las actividades enzimáticas (Al-Hawash *et al.*, 2018). Por su parte, Thavasi *et al.*, (2007) demostraron que la mayor tasa de biodegradación de HAP por *Pseudomonas aeruginosa* en agua, fue con la presencia de un pH neutro (7.0).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

Los rangos óptimos de pH suelen ser distintos y tienen efectos en la actividad microbiana, degradación, solubilización del contaminante y efectividad de los biosurfactantes (Shin *et al.*, 2004).

2.13.2 Salinidad

Las bacterias son capaces de tolerar ciertas concentraciones de NaCl, y así llevar a cabo el proceso de biodegradación. En los ecosistemas marinos, las comunidades microbianas autóctonas biodegradan de manera significativa en una concentración de 0.1 a 2 M de NaCl, sin embargo, en concentraciones muy altas (33-284 g/L), la supervivencia de estas se ve afectada, disminuyendo el proceso (Mona *et al.*, 2015).

Díaz *et al.*, (2000) determinaron que la biodegradación de los hidrocarburos es mayor en salinidades bajas, y menor en concentraciones de NaCl mayores a las que se encuentran en el medio marino. Altas concentraciones de sal inhiben directamente el metabolismo; pues un potencial osmótico mayor altera la capacidad de absorción de iones, ya sea tóxicos o esenciales (Qin *et al.*, 2012)

2.13.3 Temperatura

La temperatura afecta directamente la estructura física y química de los hidrocarburos, además de la fisiología y diversidad bacteriana del medio marino. Pansyrnaya *et al.*, (2011) mencionan que las tasas de biodegradación mejoran con temperaturas elevadas en el medio acuoso; al aumentar la solubilidad y tasa de transferencia de masa de los hidrocarburos.

Se ha descrito que la disminución de la temperatura afecta la actividad enzimática y metabólica de los microorganismos (Das y Chandran, 2011).

Si bien la biodegradación de hidrocarburos ocurre en diferentes rangos de temperatura, se ha descrito que la temperatura óptima para ambientes marinos es de 15 a 20° C, y de 20 a 30 °C para ambientes de agua de dulce (Mona *et al.*, 2015). Temperaturas mayores a las óptimas suelen ser necesarias para la biodegradación de hidrocarburos de alto peso molecular. Sin embargo, se determinó que por encima de los 30 o 40°C el efecto tóxico de la membrana de los contaminantes inhibe la supervivencia de los microorganismos (Mona *et al.*, 2015).



3. Justificación

En México sufre de contaminación crónica por hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), debido a altas concentraciones de estos compuestos en zonas costeras industrializadas. Los hidrocarburos de 2 y 3 anillos aromáticos son contaminantes abundantes en el medio acuático. El fenantreno es un HAP mayormente detectado en sitios contaminados con hidrocarburos.

Las playas del Golfo Mexicano son sitios gravemente impactados. Lo cual es alarmante, debido a que el fenantreno se adsorbe fácilmente a los sedimentos de las aguas costeras, lo que contribuye a su extensión y acumulación en estos sitios afectados.

Los derrames de petróleo aumentaron considerablemente del 2018 al 2021, lo que origina que el fenantreno se encuentre ampliamente distribuido y concentrado. Si bien el origen de este compuesto tiene múltiples factores, la industria petrolera es el principal actor. Seguido del turismo, la urbanización, la pesca y actividades marítimas y portuarias.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, es relevante proponer una alternativa acorde con el equilibrio ambiental que contribuya a la biotransformación de FNN en sitios contaminados. Las bacterias productoras de biosurfactantes (BS) representan una opción viable para promover la biodegradación de fenantreno en medios acuosos. En el laboratorio de Edafología y Ambiente de la Facultad de Ciencias de la UAEM se cuenta con un cepario de bacterias productoras de BS, las cuales son capaces de crecer y producir BS con sustratos hidrofóbicos (glicerol y aceite usado de cocina).

Los biosurfactantes son de gran utilidad en estudios de biorremediación ya que tienen una gran aplicación al ser utilizados para mejorar la solubilidad de los hidrocarburos, aumentar la hidrofobicidad de la pared celular microbiana y mejorar la interacción sustrato hidrofóbico - bacteria. Lo que promueve la tasa de biodegradación de estos compuestos. Es por ello que se plantea evaluar la capacidad de tres cepas bacterianas productoras de BS de biotransformar y biodegradar FNN en condiciones in vitro.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

4.Hipótesis

Las cepas bacterianas productoras de biosurfactantes son capaces de biotransformar y biodegradar fenantreno como única fuente de carbono y en cometabolismo con la glucosa. El cometabolismo con glucosa promoverá un mayor crecimiento bacteriano y en consecuencia una mayor tasa de biodegradación.



5.Objetivos

5.1 General

- Evaluar la capacidad de cepas bacterianas productoras de biosurfactantes para biotransformar y biodegradar fenantreno, a través de cinéticas en medio líquido, como medio de restauración de ambientes acuáticos contaminados.

5.2 Específicos

- Comparar la tasa de crecimiento de tres cepas bacterianas productoras de biosurfactantes en medio líquido con fenantreno como única fuente de carbono y en cometabolismo con la glucosa.
- Evaluar la biotransformación y tasa de biodegradación de fenantreno por tres cepas bacterianas productoras de biosurfactantes en medio líquido con éste como única fuente de carbono y con la adición de glucosa.
- Analizar los metabolitos producidos durante la biotransformación de fenantreno en cinéticas en medio líquido, por tres cepas bacterianas productoras de biosurfactantes.

6. Materiales y métodos

6.1 Material biológico

Las cepas bacterianas 2, 2214 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 utilizadas en este estudio son parte del cepario de bacterias productoras de biosurfactantes (BS) del laboratorio de Edafología y Ambiente de la Facultad de Ciencias, UAEMéx, aisladas de un proceso de digestión anaerobia y del cepario proporcionado por el Dr. Arnoldo Wong del área de Biotecnología de la Universidad Tecnológica de la Selva, aisladas de la rizosfera de piñón (Wong- Villarreal *et al.*, 2016).

6.2 Materiales y reactivos

Se usó fenantreno (FNN) grado técnico (90%) con 10 % de antraceno, marca Fluka™.

Todos los demás reactivos, sales minerales y solventes fueron de grado analítico.

Los medios de cultivo y materiales se esterilizaron en autoclave por 15 min a 121 °C y 15 lb/ plg².

6.3 Composición de los medios de cultivo

6.3.1 Agar Nutritivo (AN)

En la **Tabla 5** se muestra la composición del AN utilizado para sembrar las cepas bacterianas, describir morfología macroscópica y obtener biomasa microbiana para ensayos posteriores.

Tabla 5. Composición del agar nutritivo (AN).

Reactivo	g/L
Peptona	5
Extracto de carne	3
Agar	15

6.3.2 Caldo peptona extracto de levadura (PY)

La **Tabla 6** muestra la composición del medio líquido peptona-extracto de levadura (Caldo PY). Este medio de cultivo se utilizó para la obtención del inóculo bacteriano.

Tabla 6. Composición del Caldo PY.

Reactivo	g/L
Peptona de caseína	5
Extracto de levadura	3
CaCl ₂	0.1
Glucosa	5

6.3.3 Medio líquido de sales minerales (MSM)

El medio líquido de sales minerales (MSM) fue utilizado para evaluar el crecimiento, pH, biodegradación y biotransformación del fenantreno (FNN) en medio líquido, su composición se muestra en la **Tabla 7**. Se ajustó el pH del medio a 7.0 usando 1 N de NaOH o 1 N de HCl según fuera necesario. Se adicionó Tween 80, un surfactante sintético que mejora la dispersión del hidrocarburo. El fenantreno (FNN) se añadió a partir de una solución stock de fenantreno (50 mg/mL) preparada en etanol absoluto. Para evaluar la remoción de fenantreno en presencia de glucosa, se añadió glucosa al 1%.

Tabla 7. Composición del medio de sales minerales (MSM) (Modificado de Henry *et al.*, 2011).

Reactivo	g/L
KH ₂ PO ₄	0.7
NaHPO ₄	0.9
Extracto de levadura	1
CaCl ₂	0.2
MgSO ₄	0.4
Tween 80	0.05 %
Fenantreno	0.25
Glucosa	1

6.3.4 Agar sólido de sales minerales (MM2)

Se utilizó el medio agar de sales minerales (MM2) para detectar la capacidad de las cepas 2, 2214 y P. aeruginosa ATCC 27853 de utilizar fenantreno (FNN) como única fuente de carbono en medio sólido. Como fuente de nitrógeno se utilizó sulfato de amonio.

Tabla 8. Composición del agar de sales minerales (MM2) (Reddy *et al.*, 2010).

Reactivo	g/ L
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	2.37
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.00027
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.0147
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.24
NaCl	0.49
Na_2HPO_4	1.41
KH_2PO_4	1.36
Agar bacteriológico	15
Fenantreno	0.25

El FeSO_4 y el CaCl_2 se añadieron a partir de soluciones stock de cada compuesto. Para ello se disolvieron 50 mg de cada uno en 10 ml de agua y se añadieron los microlitros necesarios al medio de cultivo.

6.4 Reactivación del material biológico

Se realizaron resiembras de las tres cepas bacterianas productoras de biosurfactantes (BS) por estría cruzada, en cajas Petri con agar nutritivo, con la finalidad de contar con cepas de 24 h. Luego se llevó a cabo la descripción morfológica y microscópica bacteriana, el ensayo en medio sólido con fenantreno (FNN), al igual que las cinéticas en medio líquido de sales minerales (MSM).

6.4.1 Procedimiento de reactivación en agar nutritivo.

Para la reactivación de las cepas bacterias se empleó el agar nutritivo comercial Condalab ©, previamente esterilizado en autoclave (121°C y 15 lb/pul^2 durante 15



min). Las tres cepas productoras de biosurfactantes (BS), se incubaron a 30°C durante 24 h.

6.5 Descripción de la morfología colonial y microscópica bacteriana

6.5.1 Morfología colonial

La descripción de la morfología colonial se llevó a cabo con la finalidad de diferenciar a las bacterias de acuerdo con las características de las colonias de crecimiento. De esta manera, se sembraron por estría cruzada las cepas 2, 2214 y *P. aeruginosa* ATTC 27853 en agar nutritivo y se incubaron durante 24 h a 30 ° C. Se describió el tamaño, color, forma, borde, elevación, consistencia, luz transmitida y brillo de las colonias de cada cepa.

6.5.2 Morfología microscópica por medio de Tinción Gram

Se tomó biomasa de una colonia con un asa de siembra de cada una de las tres cepas bacterianas productoras de biosurfactantes (BS) previamente sembradas en agar nutritivo y se realizó la tinción de Gram de acuerdo al método de Beveridge (2001).

Las muestras se observaron a través de un microscopio óptico Zeiss™ con los aumentos 4x, 10x, 40x y 100x.

6.6 Ensayo en medio sólido para estudiar el crecimiento con fenantreno como única fuente de carbono

El estudio se realizó de acuerdo con lo reportado por Reddy *et al.*, (2010). Una asada de la colonia de las cepas crecidas en agar nutritivo se sembró en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 50 ml de MSM con fenantreno (0.25 g/L) y se incubaron por 24 h a 30 ° C. Luego, se cosecho biomasa del medio, en condiciones de esterilidad para la obtención del inóculo bacteriano. El cultivo se centrifugó a 10 000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, se decantó el sobrenadante y se añadió solución salina estéril al 0.85%. Se midió la biomasa a 600 nm en el espectrofotómetro y se ajustó la absorbancia a 0.3 UA. Posteriormente se tomaron 75 µL del inóculo y se adicionaron a placas con agar sólido de sales minerales (MM2) con fenantreno previamente añadido.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

El FNN se añadió al agar MM2 por medio de tres técnicas: 1) dispersor, 2) top agar y 3) varilla de vidrio. Lo anterior, con la intención de evaluar el efecto de la adición de fenantreno a un medio acuoso, así como de la disponibilidad de éste para los microorganismos.

6.6.1 Técnica del dispersor

Se roció una solución etanólica de fenantreno (FNN) estéril (0.25 g/L), con ayuda de un dispersor en la placa de agar sólido de sales minerales (MM2). El etanol se dejó evaporar por reposo en las placas dejando una fina capa de fenantreno (FNN) en la superficie del medio.

6.6.2 Técnica Top Agar

Se añadieron 100 μ L de una solución etanólica de fenantreno estéril (0.25 g/L) a tubos de ensayo estériles que contenían 3 mL de MM2 previamente fundido. El contenido del tubo de ensayo se homogeneizó con un vortéx y en condiciones de esterilidad, se vertió de manera uniforme sobre placas de agar MM2, se esperó hasta solidificar para añadir la biomasa bacteriana.

6.6.3 Técnica Varilla de Vidrio

Con una varilla de vidrio se dispersaron 100 μ L de una solución etanólica de fenantreno (0.25 g/L) estéril, sobre la placa de agar MM2. El etanol se evaporó dejando una capa fina de fenantreno (FNN).

Cada cepa bacteriana se inoculó 5 veces por placa de agar MM2 para cada técnica de las antes mencionadas, haciéndolo por duplicado. Las placas fueron incubadas por 8 días a 30 °C. Las cepas capaces de crecer con fenantreno como única fuente de carbono forman zonas claras alrededor de donde se sembró la bacteria (Reddy *et al.*, 2010).

6.7 Producción del inóculo bacteriano

La cepa 2, cepa 2214 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 se reactivaron en agar nutritivo comercial Condalab®, de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente. Después se colectó biomasa de una colonia bacteriana con asa de siembra y se inoculó en matraces de 125 mL con 50 mL de caldo PY y se incubó durante 24 h a

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

30°C. Para cosechar la biomasa, en condiciones de esterilidad, el cultivo se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente se decantó el sobrenadante y se añadió solución salina estéril al 0.85%. Se midió la biomasa a 600 nm en el espectrofotómetro y se ajustó la absorbancia a 0.2 UA para tener una carga bacteriana de 1×10^6 UFC/ml.

6.8 Diseño experimental para las cinéticas en medio líquido con FNN

Las cinéticas en medio líquido se llevaron a cabo con cada una de las tres cepas bacterianas productoras de biosurfactantes (BS) y con el medio de cultivo de sales minerales (MSM), sin biomasa, como control negativo.

El diseño experimental fue completamente aleatorio. Se trabajaron tres tratamientos (**Tabla 9**). Cada uno con tres réplicas experimentales. De esta manera, para cada tratamiento se monitoreo a las 0, 24, 48, 72 h, los siguientes parámetros: crecimiento bacteriano por densidad óptica y pH del medio de cultivo, con tres repeticiones analíticas cada uno.

Tabla 9. Tratamientos utilizados para evaluar el crecimiento y pH del medio de la cepa 2, cepa 2214 y *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Tratamiento	Descripción
(MSM SIN FNN)	Medio líquido de sales minerales *
(MSM+FNN)	Medio líquido de sales minerales más fenantreno (0.25 g/L)
(FNN+GLC)	Medio líquido de sales minerales más fenantreno (0.25 g/L) y glucosa (1 g/L)
CONTROL NEGATIVO	Medio líquido de sales minerales más fenantreno (0.25 g/L) sin adición de microorganismos

* Se utilizó el MSM sin adición fenantreno o glucosa como tratamiento para evaluar la influencia del extracto de levadura (1g/L) como fuente extra de nitrógeno y mínima de carbono en el crecimiento de las bacterias



6.8.1 Cuantificación del crecimiento bacteriano en cinéticas en medio líquido

De acuerdo con el diseño experimental, las cinéticas de crecimiento bacteriano se llevaron a cabo para cada uno de los tratamientos descritos anteriormente, con cada una de las tres cepas bacterianas productoras de biosurfactantes (BS). Cada tratamiento se ejecutó en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de medio líquido de sales minerales (MSM) adicionado con fenantreno (FNN) marca Fluka™ a una concentración de 0.25 g/L a partir de una solución stock de fenantreno en etanol, y glucosa (1 g/L) (apartado 6.3.3).

Los matraces fueron inoculados con 1 mL (2% v/v) del inóculo. Los ensayos se realizaron por triplicado y se mantuvieron a 30 °C a 125 rpm en condiciones de oscuridad, ya que el fenantreno es un compuesto que se degrada por efecto de la luz (Shankar *et al.*, 2019). El crecimiento por densidad óptica (DO) se evaluó a 600 nm con un espectrofotómetro Beckman Coulter™ a las 0, 24, 48, y 72 h.

6.8.2 Cuantificación del pH del medio de cultivo

El pH del medio de cultivo se cuantificó para los tres tratamientos inoculados con cada una de las tres cepas bacterianas productoras de biosurfactantes (BS), así como el control negativo (sin biomasa), con un potenciómetro Denver Instruments™ a las 0, 24, 48, 72 h. El pH del medio se evaluó porque es un factor determinante en la producción de los biosurfactantes (BS) (Souza *et al.*, 2014)

6.8.3 Biotransformación y biodegradación del FNN durante cinéticas de crecimiento.

La biotransformación y biodegradación del fenantreno se determinaron mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) fase reversa en el laboratorio de Ingeniería Metabólica del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN.

El fenantreno residual y posibles metabolitos fueron analizados durante las cinéticas de crecimiento en el medio líquido en dos tratamientos (**Tabla 10**). Durante cada punto de evaluación de las cinéticas en medio líquido se sacrificaron 3 unidades experimentales.

Tabla 10. Tratamientos utilizados para evaluar la biotransformación y biodegradación del fenantreno (FNN) de la *cepa 2*, *cepa 2214* y *P. aeruginosa ATCC 27853*.

Tratamiento	Descripción
(MSM+FNN)	Medio líquido de sales minerales más fenantreno
(FNN+GLC)	Medio líquido de sales minerales más fenantreno y glucosa.
Control	Medios de sales minerales más fenantreno (MSM+FNN) y el medio de sales minerales más fenantreno y glucosa (FNN +GLC) , sin adición de microorganismos.

6.8.2.1 Construcción de la curva de calibración de fenantreno (FNN)

La concentración de fenantreno (FNN) residual se estimó utilizando una curva estándar de valores conocidos de fenantreno comercial marca Fulka™ (2 µM-80 µM). Para ello, se disolvieron 1.78 mg de FNN en 10 mL de etanol absoluto, con la finalidad de obtener una solución stock de 1 mM de fenantreno. Posteriormente, a partir de la solución stock se llevaron a cabo las respectivas series de diluciones utilizando etanol absoluto para obtener las concentraciones de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 60, 70 y 80 µM.

6.8.2.2 Extracción de fenantreno residual y posibles metabolitos.

El fenantreno (FNN) y sus metabolitos contenidos en la fase orgánica, se obtuvieron con cloroformo (x3) en un embudo de separación (1:1 solvente/medio de cultivo). El residuo sólido se concentró a sequedad en un rotavapor Buchi B-490 a 50 °C, conectado a una bomba de vacío. Luego se resuspendió en 1 mL de etanol absoluto se almacenó en viales de vidrio. Para el análisis por HPLC, se usaron diluciones con etanol 1/1000 con respecto a la concentración inicial de fenantreno (FNN).

6.8.2.3 Cuantificación de fenantreno

Los extractos con el fenantreno (FNN) residual y los metabolitos por su biotransformación en los cultivos, fueron analizados espectrofotométricamente por



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

HPLC-UV (Thermo Separation) utilizando una columna PRODIGY ODS2 18, de 250 x 4.6 mm, tamaño de partícula de 5 μm y un loop de 20 μl . Las muestras fueron eluidas con ácido trifluoroacético 50 μM (A) y acetonitrilo (B), utilizando el gradiente de: 0-5 min 10% B; 5-10 min 20% B; 10-20 min 65% B; 20-30 min 80% B, y 30-40 min 95% B; 40-50 min 10 % B.

Para la identificación del fenantreno (FNN) y los posibles compuestos observados en los cromatogramas, se usaron compuestos estándar de fenoles e hidrocarburos poliaromáticos.

La cuantificación de fenantreno (FNN) se obtuvo mediante una curva de calibración de fenantreno de 2 μM a 80 μM . Y se utilizó la siguiente fórmula para determinar el porcentaje de biodegradación del fenantreno:

$$\% \text{ Biodegradación} = (C_i - C_f) / C_i * 100$$

Dónde:

C_i: concentración inicial

C_f: concentración final.

6.9 Análisis Estadístico

Para evaluar el crecimiento bacteriano y el pH de las bacterias productoras de biosurfactantes (BS), se realizó un análisis de varianza de múltiples factores MANOVA (5% de significancia) y una prueba de rangos múltiples LSD (95% de confianza) con ayuda del software estadístico Statgraphics TM Centurión.

7.Resultados y discusión

7.1 Morfología macroscópica de las cepas bacterianas

Las tres cepas bacterianas productoras de biosurfactantes crecidas en agar nutritivo se caracterizan por ser colonias en forma circular de color beige (**Figura 8**).

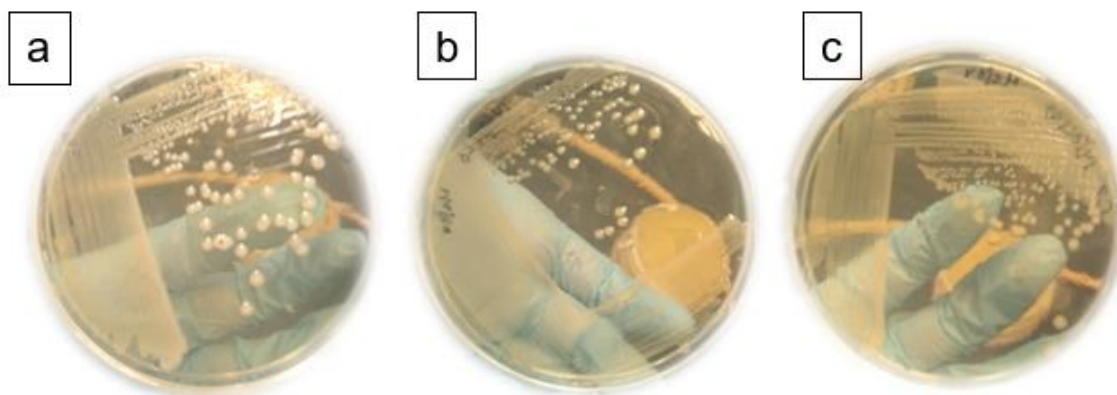


Figura 8. Morfología colonial bacteriana de las cepas bacterianas productoras de biosurfactantes (BS): a) *cepa 2214* b) *P. aeruginosa ATCC 27853*, c) *cepa 2*, descrita en agar nutritivo incubadas por 24 h a 30 °C

La **Tabla 11** muestra la descripción de las características (tamaño, color, forma, borde, elevación, consistencia, luz transmitida y brillo) correspondiente para cada una de las cepas bacterianas.

Tabla 11. Descripción de la morfología macroscópica de las tres cepas bacterianas productoras de biosurfactantes (BS).

Morfología macroscópica bacteriana			
	<i>Cepa 2</i>	<i>Cepa 2214</i>	<i>P. aeruginosa ATCC 27853</i>
Tamaño	2-3 mm	2-3 mm	2-3 mm
Color	Beige	Beige	Beige
Forma	Circular	Circular	Circular
Borde	Enteros	Enteros	Irregulares
Elevación	Plana/elevada	Convexa	Plana/elevada

Consistencia	Cremosa	Cremosa	Cremosa
Luz transmitida	Opaca	Opaca	Opaca
Brillo	Brillante	Brillante	Brillante

7.2 Morfología microscópica de las cepas bacterianas

Por medio de la Tinción Gram fue posible identificar que las tres cepas bacterianas productoras de biosurfactantes (BS) corresponden a bacilos Gram negativos (**Figura 9**).

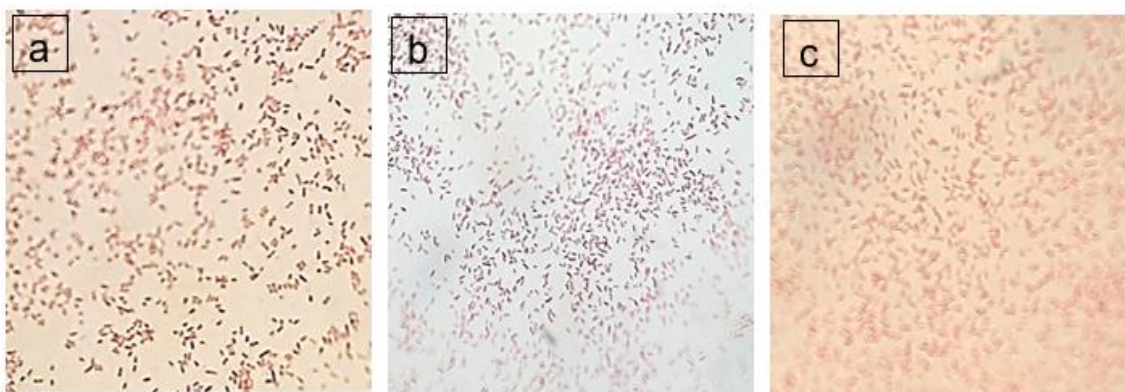


Figura 9. Morfología microscópica bacteriana de las cepas bacterianas productoras de biosurfactantes (BS) a) *cepa 2* b) *cepa 2214* (bacilos cortos) c) *P. aeruginosa* ATCCC 27853 (aumento 100 x).

Existe mayor proporción de microorganismos Gram Negativos degradadores de HAP. Asalde y Enríquez (2016) reportan que el 83.55% de los microorganismos degradadores de hidrocarburos corresponden a bacilos cortos Gram negativos, mientras que el 16.45% de estos microorganismos son Gram positivos.

Microorganismos del género *Pseudomonas* son capaces de biodegradar gasolina, keroseno y aceite, además de hidrocarburos. Dentro del género *Pseudomonas* se pueden mencionar microorganismos productores biosurfactantes (BS) como *P. libanensis*, *P. alcaligenes*, *P. fluorescens*, *P. putida* y *P. koreensis* que tienen amplia aplicación en la biorremediación de sitios acuáticos contaminados con fenantreno (Makkar *et al.*, 2012).

Pseudomonas aeruginosa, utilizada en este estudio corresponde a un bacilo gram negativo (**Figura 9**), el cual es capaz de producir BS de tipo ramnolípido. *P. aeruginosa* es uno de los microorganismos mayormente estudiado y aplicado en la biodegradación de fenantreno (FNN) (Souza *et al.*, 2014)

7.3 Ensayo en medio sólido para estudiar el crecimiento con fenantreno como única fuente de carbono

Las cepas bacterianas no mostraron crecimiento en agar sólido MM2 con fenantreno como única fuente de carbono, con ninguna de las tres técnicas utilizadas (**Figura 10**). En la placa Petri, no se presentaron zonas claras alrededor de donde se inoculó el microorganismo (punto negro dentro de la placa Petri), posterior a los 8 días de incubación.

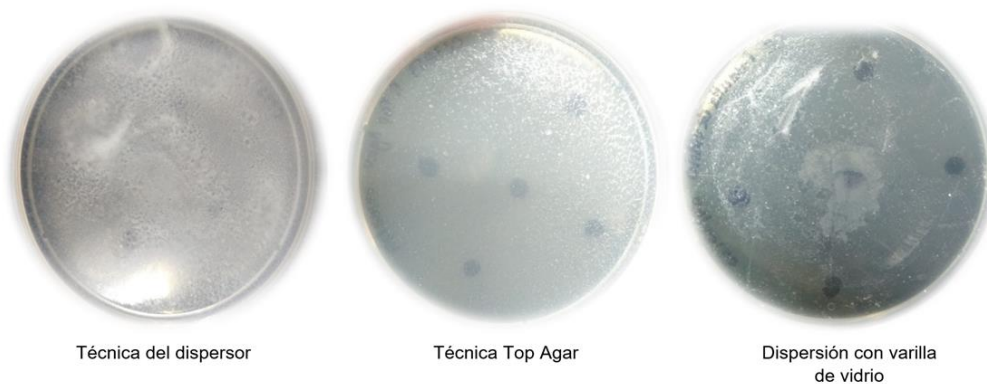


Figura 10. Ensayo en agar sólido de sales minerales (MM2) con fenantreno (FNN) como única fuente de carbono, con 8 días de incubación a 30 ° C.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

La **Tabla 12**, muestra la presencia o ausencia de crecimiento de las tres cepas bacterianas en sólido de sales minerales (MM2), cuando se añade el fenantreno a través de las técnicas del dispersor, top agar y varilla de vidrio.

Tabla 12. Ensayo en medio sólido con fenantreno, para evaluar el crecimiento de las tres cepas bacterianas productoras de biosurfactantes (BS).

Cepa	Técnica		
	Dispersor	Top Agar	Varilla de Vidrio
<i>Cepa 2</i>	-	-	-
<i>Cepa 2214</i>	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> <i>ATCC 27853</i>	-	-	-

Donde: (+) Crecimiento, (-) Ausencia de crecimiento, (*) Presencia de halo o zona clara alrededor de la colonia.

Lo anterior puede deberse posiblemente a que el agar mineral estaba saturando con fenantreno (FNN) (Reddy *et al.*,2010). Además, el inóculo bacteriano pudo ser insuficiente para la cantidad de fenantreno presente en el medio.

7.4 Cinéticas de crecimiento en medio líquido de las cepas bacterianas.

La Figura 11 muestra el crecimiento por densidad óptica (DO) de las cepas 2,2214 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 productoras de biosurfactantes (BS).

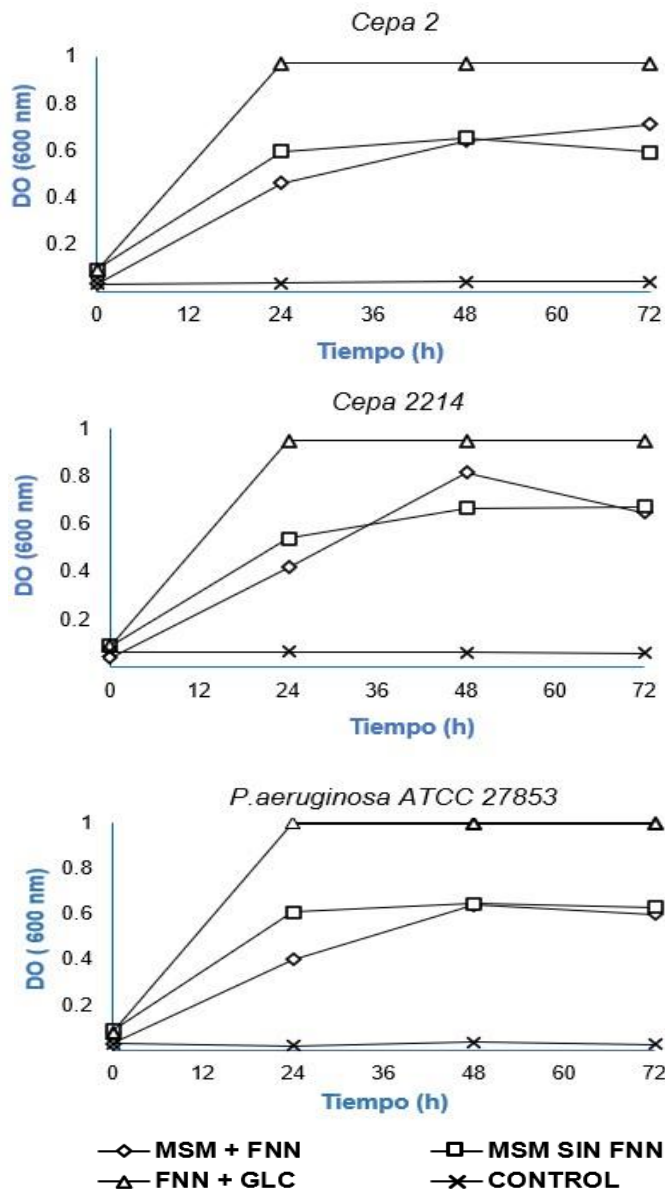


Figura 11. Crecimiento por densidad óptica (DO) de las cepas bacterianas productoras de biosurfactantes (BS) en medio líquido de sales minerales sin fenantreno (**MSM SIN FNN**), MSM más fenantreno (0.25 g/L) (**MSM+FNN**), en MSM más fenantreno (0.25 g/L) y glucosa (1g/L) (**FNN+GLC**), y MSM con fenantreno sin adición de microorganismos (**CONTROL**).

Las tres cepas bacterianas productoras de biosurfactantes (BS) son capaces de crecer con fenantreno como única fuente de carbono. Sin embargo, cuando se añadió glucosa al medio líquido de sales minerales (MSM) con fenantreno, el crecimiento de las tres cepas fue estadísticamente diferente (**Tabla 13**) ($p < 0.05$).

Tabla 13. Análisis estadístico del crecimiento de las tres cepas bacterianas productoras de biosurfactantes (BS) en medio líquido bajo tres tratamientos.

Tratamiento	Cepa	Densidad Óptica
MSM SIN FNN	Cepa 2	0.62±0.04 ^B
	Cepa 2214	0.63±0.07 ^B
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0.63±0.02 ^B
MSM +FNN	Cepa 2	0.58±0.10 ^B
	Cepa 2214	0.63±0.2 ^B
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0.54±0.13 ^B
FNN+GLC	Cepa 2	0.97±0.00 ^A
	Cepa 2214	0.95±0.00 ^A
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1.00±0.00 ^A

*Letras diferentes denotan diferencias significativas por efecto el tratamiento.

Las cepas bacterianas 2, 2214 y *P. aeruginosa* ATCC27853 crecieron en el medio líquido de sales minerales sin adición de fenantreno o glucosa. El crecimiento es exponencial a las 24 h de cultivo. El extracto de levadura presente en el medio de cultivo (apartado 6.3.3) es una fuente de crecimiento que incrementa significativamente la biomasa celular (Ma *et al.*, 2012).

El crecimiento de las tres cepas bacterianas productoras de biosurfactantes (BS) no es estadísticamente diferente en el medio líquido de sales minerales con y sin fenantreno (**Tabla 13**). Sin embargo, la **Figura 11** muestra que las bacterias crecen de manera exponencial hasta las 48 h de cultivo utilizando el fenantreno como única fuente de carbono.

Tian *et al.*, (2002) reportan que *P. mendocina* crece y utiliza eficientemente el fenantreno en el medio de cultivo de sales minerales hasta las 48 h de cultivo. Además, al evaluar el crecimiento de la bacteria con distintas concentraciones de fenantreno, determinaron que 0.2 g/L de fenantreno en el medio de cultivo, promueve un mayor crecimiento bacteriano.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

Durante la cinética de crecimiento en MSM con fenantreno, la cepa 2214 presentó un crecimiento de 0.4 UA a las 24 h, el cual se duplica hasta 0.8 UA a las 48 h de cultivo (**Figura 11**). Lo anterior concuerda con un estudio realizado por *Reddy et al.*, (2010). En este estudio, el crecimiento de la cepa *Brevibacillus sp* PDM-3 productora de biosurfactantes fue de 0.4 UA a las 24 h y 0.8 UA a las 30 h de cultivo, en MSM con fenantreno (0.25 g/L).

La producción de biosurfactantes en la fase logarítmica temprana mejora la solubilización del fenantreno y conduce a una mayor biodisponibilidad del compuesto para las bacterias. La biodisponibilidad del hidrocarburo hace posible su asimilación-captación como fuente de crecimiento para los microorganismos.

La literatura refiere que la tasa de crecimiento bacteriano y la tasa de utilización de un único sustrato que controla el crecimiento no es lineal. Los sustratos se utilizan en tres partes; una para el crecimiento fisiológico, otra para el mantenimiento y la última para formación de productos (*Hou et al.*, 2018).

Por otro lado, la diferencia en el crecimiento de las cepas 2,2214 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 al añadir glucosa al medio de cultivo, puede atribuirse a una diferencia en la regulación del metabolismo microbiano. *Vandera et al.*, (2015), determinaron que la glucólisis, gluconeogénesis y el ciclo de Krebs funcionan de manera diferente en presencia de glucosa y de compuestos aromáticos.

En este trabajo, la adición de glucosa (1g/L), promovió eficientemente el crecimiento de las tres cepas bacterianas de BS. Sin embargo, *Tao et al.*, (2007) determinaron que una concentración de 0.5 g/L tenía un efecto inhibitorio en el crecimiento bacteriano y promovía la acidificación del medio de cultivo.

7.5 Medición del pH del medio de cultivo.

La **Figura 12** muestra el pH en el medio de cultivo de en qué crecieron las cepas 2, 2214 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 productoras de biosurfactantes (BS).

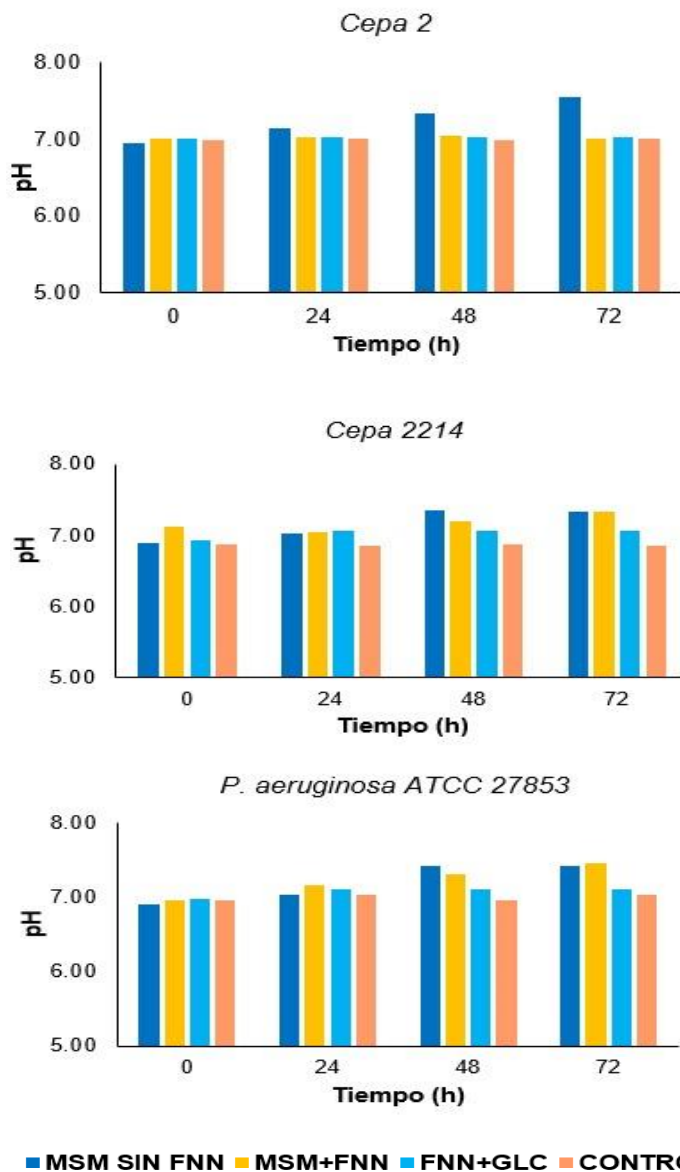


Figura 12. pH del medio de cultivo de las tres cepas bacterianas productoras de biosurfactantes (BS) en medio líquido de sales minerales sin fenantreno (**MSM SIN FNN**), en MSM más fenantreno (0.25 g/L) (**MSM+FNN**), MSM más fenantreno (0.25 g/L) y glucosa (1g/L) (**FNN+GLC**), y MSM con fenantreno sin adición de microorganismos (**CONTROL**).

Las tres cepas bacterianas productoras de biosurfactantes (BS) crecen en un medio de cultivo con un pH neutro. Sin embargo, es posible observar en la **Tabla 14** que,

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

al añadir glucosa al medio de cultivo, el pH es estadísticamente diferente y más cercano a la neutralidad ($p < 0.5$).

Tabla 14. Análisis estadístico del pH del medio de cultivo de las tres cepas bacterianas productoras de biosurfactantes (BS) en medio líquido bajo tres tratamientos.

Tratamiento	Cepa	pH
MSM SIN FNN	Cepa 2	7.34±0.21 ^A
	Cepa 2214	7.24±0.18 ^A
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	7.30±0.23 ^A
MSM +FNN	Cepa 2	7.03±0.03 ^{AB}
	Cepa 2214	7.19±0.15 ^{AB}
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	7.32±0.15 ^{AB}
FNN+GLC	Cepa 2	7.03±0.00 ^B
	Cepa 2214	7.06±0.00 ^B
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	7.10±0.00 ^B

*Letras diferentes denotan diferencias significativas por efecto el tratamiento.

El pH es un factor que afecta la biotransformación del fenantreno, interviene en la actividad microbiana y en el transporte de los nutrientes. Wang *et al.*, (2020) mencionan que la tasa de biodegradación aumenta con un pH neutro. La cepa *Diaphorobacter sp.* mostró un óptimo crecimiento (0.4 UA) y una tasa de biodegradación del 98 % fenantreno en un pH de 7.0.

Los microorganismos se desarrollan en un rango de pH amplio. Sin embargo, un pH ligeramente ácido en el medio de cultivo tiene efectos negativos en el crecimiento de la biomasa celular y degradación del fenantreno (Tao *et al.*, 2007)

Los microorganismos del género *Pseudomonas* son capaces de degradar del 92 al 94 % del fenantreno del medio, en un pH comprendido entre 6.0 y 8.0 (Ma *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2018). Se sabe que bacterias del género *Pseudomonas sp.* tolera condiciones ácidas y alcalinas, sin embargo, Kuppusamy *et al.* (2016) reportan una tasa de biodegradación del 90% y 100% en un pH de 6.0 y 7.0, respectivamente.



Yuan *et al.*, (2001) mencionan que la temperatura y el pH óptimo para la biodegradación del fenantreno (FNN) en condiciones aeróbicas es de 30 °C y 7.0, respectivamente. La tasa de crecimiento de la cepa *M. vanbaalenii* disminuyó un 50% en un pH de 6.5 en comparación con un pH neutro o ligeramente alcalino. Sin embargo, un pH ácido mejoró la permeabilidad de la membrana y contribuyó a una mayor concentración del sustrato hidrofóbico en el citosol lo que a su vez, favoreció la inducción de enzimas degradativas que contribuyen a un mayor porcentaje de biodegradación (Kim *et al.*, 2005).

Además, Prabhu y Phale (2003) menciona que la biodegradación del fenantreno se ve disminuida debido a la separación de fases de la emulsión formada por la producción de biosurfactantes en condiciones ácidas.

7.6 Biodegradación y biotransformación de fenantreno

En la **Tabla 15**, se muestra el porcentaje de biodegradación del fenantreno (FNN) de las tres cepas bacterianas productoras de biosurfactantes (BS) en el medio que tenía fenantreno como única fuente de carbono y en cometabolismo con glucosa. El valor que se muestra en la tabla, corresponde a un tiempo determinado.

Es posible observar que cuando el fenantreno (FNN) era la única fuente de carbono presente en el medio la *cepa 2* degradó un 28 % del fenantreno a las 72 h. Mientras que las cepas *P. aeruginosa ATCC 27853* y la *cepa 2214* biodegradaron el hidrocarburo hasta un 32 % máximo en 72 h y 48 h, respectivamente. Por el contrario, cuando se evaluó la biodegradación en cometabolismo con glucosa, las tres cepas biodegradaron el fenantreno en un 18 %, 12 % y 14 %, respectivamente a las 24 h de tratamiento.

Tabla 15. Porcentaje de biodegradación del fenantreno por las cepas bacterianas productoras de BS; *cepa 2*, *cepa 2214*, *P. aeruginosa ATCC 27853* y el control (medio sin adición de microorganismos).

Cepa/ Tratamiento	MSM + FNN	FNN+GLC
<i>Cepa 2</i>	28 % en 72 h	14 % en 24 h
<i>Cepa 2214</i>	32 % en 48 h	18 % en 24 h
<i>P. aeruginosa ATCC 27853</i>	32 % en 72 h	12 % en 24 h
Control	0% en 172 h	0% en 172 h

La biodegradación del fenantreno (FNN) es coherente con el crecimiento. Con la **Figura 11**, se puede notar que existe una relación entre la tasa de biodegradación más alta y el mayor crecimiento. La *cepa 2214* biodegradó 32% de fenantreno a las 48 h de cultivo, cuando se evidenció mayor crecimiento bacteriano. Por otro lado, *cepa 2* y *P. aeruginosa ATCC 27853* biodegradaron el 32%, durante la cinética de crecimiento.

Se sabe que *P. aeruginosa* se adapta gradualmente a la presencia de fenantreno (Jia *et al.*, 2019). Por lo que es probable que las tres cepas bacterianas cuenten con diferencias metabólicas. En diversos estudios se han utilizado gran variedad de microorganismos capaces de biodegradar fenantreno en bajas y altas concentraciones (desde 0.10 g/L hasta 0.3 g/L) como única fuente de carbono o en cometabolismo con otros HAP u otros sustratos orgánicos como la glucosa, extracto de levadura o de carne (Mallick *et al.*, 2007; Nie *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2014; Mishra *et al.*, 2020)

Las cepas bacterianas productoras de BS utilizadas en el presente trabajo son capaces de crecer y biodegradar fenantreno (FNN) como única fuente de carbono y en cometabolismo con la glucosa. En la **Tabla 15** se observa un porcentaje de biodegradación del 32% cuando el fenantreno (FNN) funciona como sustrato



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

primario de crecimiento. Mientras que 18 % del fenantreno se degradó en presencia glucosa en el medio de cultivo.

El Tween 80 y el extracto de levadura que se adicionaron al medio contribuyen a la biodegradación del fenantreno (Liu *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2011). El surfactante mejora la disponibilidad del fenantreno, mientras que al añadir el extracto de levadura (0.5 g/L) se promueve un mayor crecimiento microbiano (Yuan *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2008).

Wang *et al.*, (2020) mencionan que, la presencia de glucosa como fuente extra de carbono mejora el crecimiento bacteriano. Sin embargo, no tiene efectos significativos en la biodegradación del fenantreno (FNN). Cuando el monosacárido está presente en el medio de cultivo, existe represión catabólica de genes implicados en la expresión de enzimas utilizadas en la degradación de fenantreno (Wang *et al.*, 2020).

Vandera *et al.*, (2015) demostraron que las bacterias cultivadas en cometabolismo con glucosa no captan oxígeno eficientemente, ni muestran actividades enzimáticas relacionadas a la biodegradación de fenantreno (FNN). Las enzimas implicadas en vías de biodegradación del FNN se inducen en presencia del hidrocarburo. Cuando el fenantreno es la única fuente de carbono en el medio, existe mayor cantidad de proteínas implicadas en procesos de transporte, oxidación y respuesta al estrés. Además, detectaron enzimas clave en la escisión de anillos aromáticos (di oxigenasas, hidroxilasas y deshidrogenasas).

Por otro lado, existe mayor producción de biosurfactantes (BS) cuando la fuente de carbono es insoluble. Una vez producido el BS se facilita el contacto e interacción pared celular- hidrocarburo. Un aumento de la hidrofobicidad de la superficie celular mejora el transporte de sustratos hidrofóbicos al interior de la célula. (Deng *et al.*, 2010)

El medio de cultivo en el que crecieron los microorganismos era espumoso y viscoso, típico de microorganismos productores de BS (Prabhu y Phale, 2003) La producción del biosurfactante en el medio ocurre en la fase logarítmica de



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

crecimiento. La actividad emulsificante comienza en la fase logarítmica temprana y decae en la fase estacionaria. Por ello, en esta etapa ocurre un aumento en la hidrofobicidad de la superficie celular bacteriana y se da una mayor asimilación del fenantreno (Kaczorek *et al.*, 2018), lo que contribuye de manera directa en la biodegradación del hidrocarburo.

Los biosurfactantes excretados por los microorganismos se unen a la superficie celular a través de regiones hidrofílicas, exponiendo la parte hidrofóbica al exterior, lo que da lugar a un aumento en la hidrofobicidad de la pared celular (Deng *et al.*, 2010).

Coral y Karagoz (2005), determinaron un rápido decremento de la concentración inicial de fenantreno (500 mg/L) debido a una buena asimilación del compuesto y rápida adsorción del fenantreno en la pared celular bacteriana, que pudo deberse a un aumento en la hidrofobicidad de la misma.

Los genes degradativos del fenantreno se localizan en el cromosoma o en plásmidos bacterianos. El género *Pseudomonas* degrada el fenantreno a través de los plásmidos NAH7 y NAH7-LIKE, que codifican enzimas específicas de las rutas catabólicas del hidrocarburo (Coral y Karagoz, 2005).

7.6.1 Biotransformación del fenantreno

La **Figura 13** muestra el espectro del fenantreno (FNN) en el extracto libre de células extraído con cloroformo (apartado 6.7.1.1) y analizado con HPLC de fase reversa. El FNN se evidenció en el equipo a una longitud UV de 250 nm y tiene un tiempo de retención (RT) de 31.05 min.

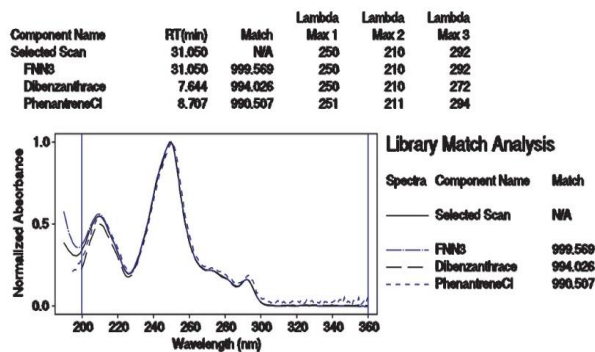


Figura 13. Espectro del fenantreno detectado en el extracto libre de células de los dos tratamientos, a través del análisis en HPLC de fase reversa.

A continuación, se muestran los cromatogramas obtenidos del análisis espectrofotométrico HPLC-UV (Thermo Separation), donde es posible observar el pico correspondiente al fenantreno a los 31.05 min. La **Figura 14** corresponde a los cromatogramas obtenidos del control negativo (sin adición de microorganismos), donde no se observa un cambio significativo en la altura del pico o el área bajo la curva correspondiente al fenantreno a las 0 h y 172 h posteriores para cada uno de los dos tratamientos. Por lo que es posible atribuir la biodegradación del hidrocarburo a la acción microbiana.

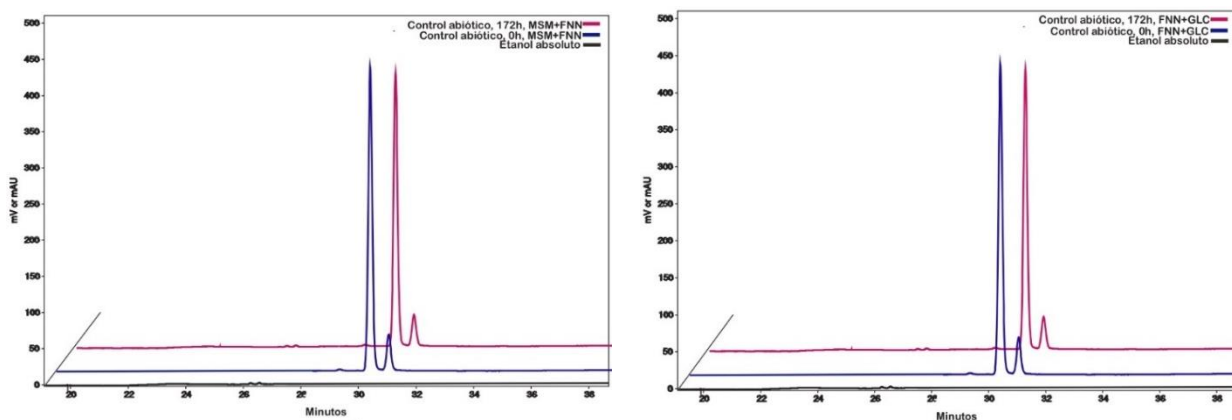


Figura 14. Cromatogramas del fenantreno presente en el MSM con fenantreno (**MSM+FNN**) y en el medio con fenantreno más glucosa (**FNN+GLC**) sin adición de biomasa (control abiótico).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

En la **Figura 15** se presentan los cromatogramas del fenantreno en el medio líquido de sales minerales con fenantreno y glucosa (**FNN+GLC**). De color azul se muestra el control negativo, comparado con el pico de color verde que representa la concentración del fenantreno a las 0 h de cultivo. De color rosa se evidencia el pico de fenantreno a las 24 h posteriores de cultivo de cada de las tres cepas bacterianas productoras de biosurfactantes (BS).

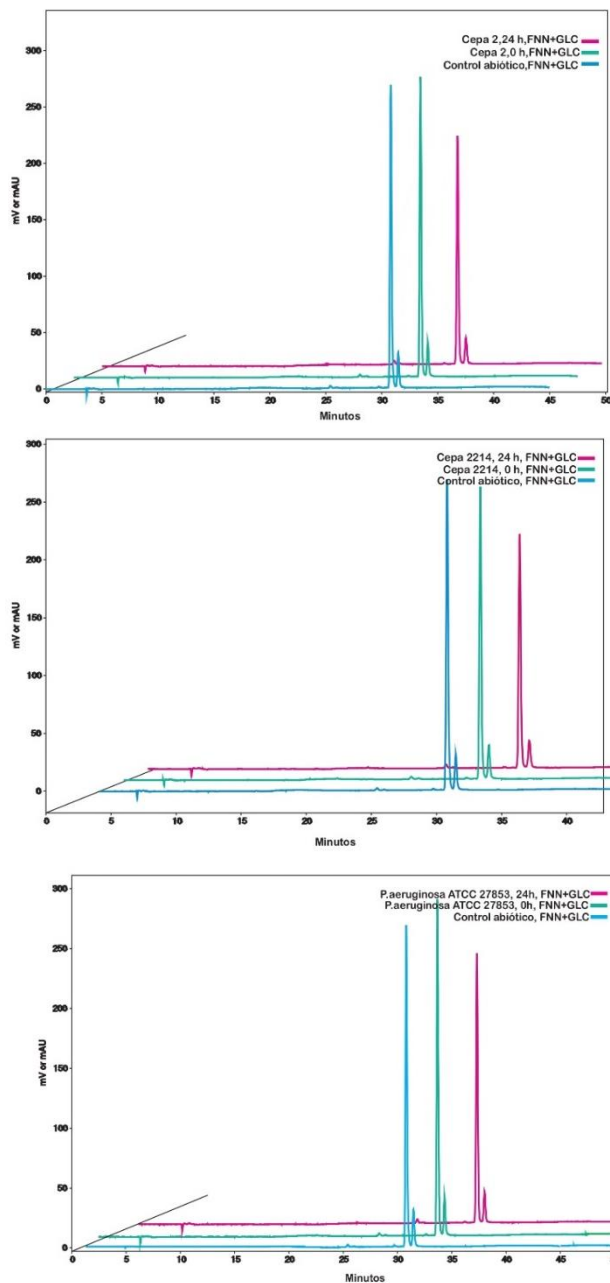
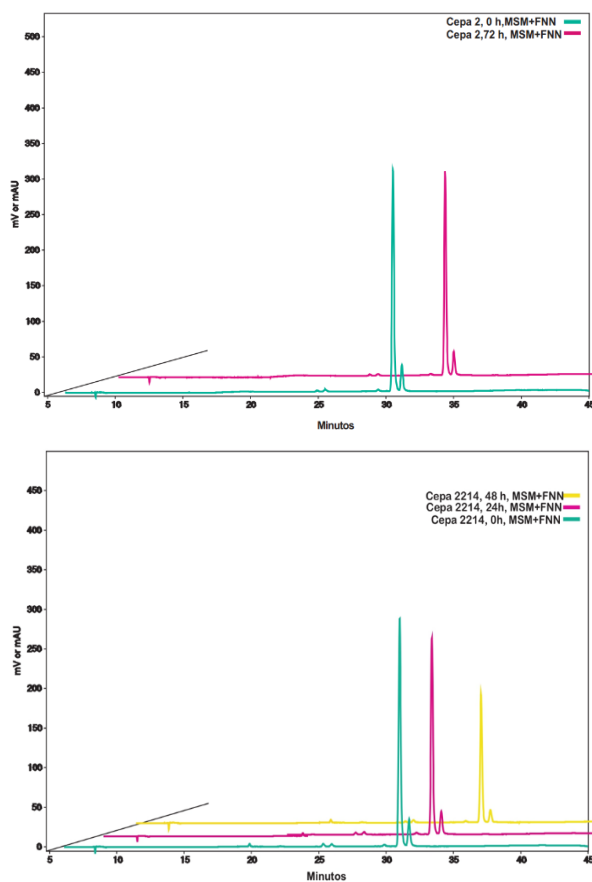


Figura 15. Cromatogramas del fenantreno presente en el medio líquido de sales minerales con fenantreno y glucosa (**FNN+GLC**) de las cepas 2, 2214 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 productoras de biosurfactantes (BS).

La **Figura 16** muestra los cromatogramas del fenantreno presente en el medio de cultivo con fenantreno como única fuente de carbono (**MSM + FNN**) donde se inocularon las tres cepas bacterianas productoras de biosurfactantes (BS).



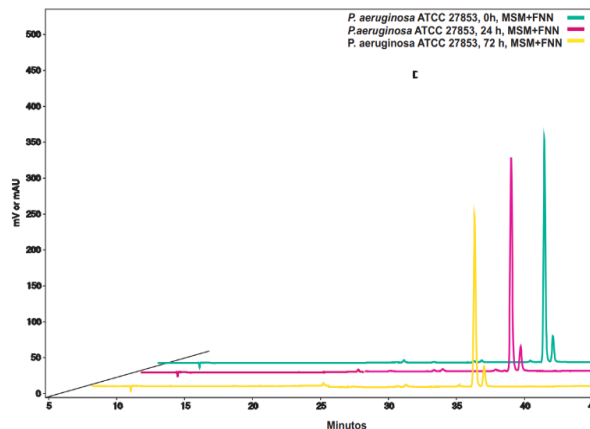


Figura 16. Cromatogramas del fenantreno presente en el medio líquido de sales minerales con fenantreno (**MSM + FNN**) de las cepas 2, 2214 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 productoras de biosurfactantes (BS).

La Cromatografía Líquida de alta Resolución (HPLC) es una técnica invaluable para determinar la concentración de fenantreno e intermediarios metabólicos en la biodegradación de fenantreno.

Los intermediarios metabólicos más comunes de la biodegradación del fenantreno son fenoles y catecoles. Según los estudios, una extracción ácida de los intermediarios metabólicos resulta ser más efectiva. La acidificación del medio permite encontrar alrededor de 2 o 3 compuestos más que una extracción neutral (Kim *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2020)

Los intermediarios metabólicos mayormente encontrados con una extracción ácida son compuestos hidroxilados: 2-dihydroxyacenaftaleno, 2-isopropil-5-metilfenol, 1,2-dihidroxi-naftaleno, 1-metoxi-2-hidroxi fenantreno, 1,2-dimetoxi fenantreno, fenantreni-trans-9-10 dihidriol, e **1-hidroxi-2 ácido naftoico (1H2N)** (Kim *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2020).

La acumulación del intermediario metabólico 1-hidroxi-2 ácido naftoico (**1H2N**) y compuestos fenólicos es característica de cultivos puros o mixtos con fenantreno. El **1H2N** es un metabolito que se encuentra en altas concentraciones en las primeras 24 h de cultivo, y disminuye transcurridas 120 h (Tao *et al.*, 2007). Sin embargo, la acumulación de diferentes metabolitos, depende los componentes



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

degradadores, maquinaria genética, condiciones de cultivo y cepa utilizada (Tian *et al.*, 2002).

La producción de intermediarios metabólicos durante la biodegradación de fenantreno surge del ataque enzimático de las regiones bahía y K del hidrocarburo. Reacciones de oxidación en estas regiones culminan en la formación de compuestos metabolizables como el **ácido ftálico**. Contrariamente, cuando se oxidan otras regiones de la molécula, se originan compuestos tóxicos no metabolizables (Stingley *et al.*, 2004).

La oxigenación inicial en el carbono 1 y 2 de la molécula de fenantreno, es una vía menor de degradación. Cis-1-2- dihidroxifenantreno es un intermediario encontrado en menor concentración que surge de la biodegradación por cepas deficientes en la actividad dihidriol deshidrogenasa (Pinyakong *et al.*, 2000).

El 1-naftol es un compuesto intermediario que se origina por la hidroxilación del carbono uno y dos de la molécula de fenantreno. Tao *et al.*, (2007) reportan que *Sphingomonas sp. GY2B* disminuyó su crecimiento al aumentar la concentración de este compuesto. Contrariamente, la presencia de 1-hidroxi-2 ácido naftoico mejora el crecimiento y el metabolismo del fenantreno.

Una de las dos rutas de degradación del fenantreno por *Pseudomonas*, incluye el metabolismo de **1H2N** en ácido salicílico (Prabhu y Pale,2003). El ácido salicílico es un intermediario metabólico que se degrada fácilmente para promover el crecimiento bacteriano.

En la extracción de metabolitos de las primeras horas de cultivo de *Pseudomonas* con fenantreno, el 1H2N es uno de los compuestos más prevalentes. Mientras que en cultivos tardíos se detecta el salicilato (Prabhu y Pale,2003).

En el presente trabajo se evidenció el crecimiento bacteriano por un cambio de color de incoloro a amarillo. Coral y Karagoz (2005) mencionan que el cambio de color se atribuye a la acumulación de intermediarios metabólicos, particularmente el 1-hidroxi-2 ácido naftoico.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

Los metabolitos producidos durante la degradación del fenantreno se encuentran en el citosol o pueden ser excretados al medio de cultivo, algunos de estos resultan ser tóxicos (Kim *et al.*, 2005; Tao *et al.*, 2007).

La biodegradación y biotransformación del fenantreno está fuertemente regulada por la maquinaria genética, la actividad enzimática y las rutas catabólicas involucradas durante el metabolismo del hidrocarburo.



8. Conclusiones

- Las tres cepas bacterianas productoras de biosurfactantes (BS) cultivadas en medio líquido con fenantreno son capaces de crecer en presencia de este hidrocarburo como única fuente de carbono y en cometabolismo con glucosa.
- La adición de glucosa al medio de cultivo beneficia el crecimiento de las cepas bacterianas.
- Las cepas bacterianas productoras de biosurfactantes (BS) biodegradaron 32% del fenantreno presente como única fuente de carbono.
- El porcentaje de biodegradación del fenantreno en cometabolismo con glucosa fue de 18%.
- La cepa 2214 biodegradó 32% del fenantreno del medio de cultivo en un lapso de tiempo menor que la cepa 2 y *P. aeruginosa* ATCC 27853.
- El pH del medio de cultivo donde crecieron las cepas bacterianas productoras de biosurfactantes fue neutro. Este pH contribuyó al crecimiento y la biodegradación del fenantreno.



10. Referencias

- Ahmad, Z., Zhang, X., Imran, M., Zhong, H., Andleeb, S., Zulekha, R., Liu, G., Ahmad, I., Coulon, F. (2021). Production, functional stability, and effect of rhamnolipid biosurfactant from *Klebsiella* sp. on phenanthrene degradation in various medium systems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 207, 2-12.
- Ahmed, R. Z., & Ahmed, N. (2014). Effect of yeast extract on fluoranthene degradation and aromatic ring dioxygenase expressing bacterial community structure of a fluoranthene degrading bacterial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 88, 56–61.
- Aksmann, A., Tukaj, Z. (2008). Intact anthracene inhibits photosynthesis in algal cells: A fluorescence induction study on *Chlamydomonas reinhardtii* CW92 strain. *Chemosphere*, 74(1), 26–32
- Al-Hawash, A., Drag, M., Li, S., Alhujaily, A., Abbood, H., Zhang, X., Ma, F. (2018). Principios de degradación microbiana de hidrocarburos de petróleo en el medio ambiente. *Revista Egipcia de Investigación Acuática*, 44(2), 71-76.
- Archana, C., Fazlurrahman, JG., Oakeshott, R. (2008). Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation. *Indian J. Microbiol*, 48, 955-1113.
- Asalde C, G R., Enriquez M, K J. (2016). Rendimiento de surfactantes producidos por bacterias degradadoras de hidrocarburos. Tesis. Universidad Nacional “Pedro Ruiz Gallo”. Facultad de Ciencias Biológicas.
- Beveridge, T.J. (2001). Use of the Gram Stain in Microbiology. *Biotechnic and Histochemistry*, 76(3), 111-118.
- Boll, M. (Ed.). (2020). *Anaerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils, and Lipids. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, 1-29
- Bopp, S., Lettieri, T. (2007). Gene regulation in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* upon exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), 396(2), 293–302.
- Botello, A., Villanueva, S., Díaz, G., Pica, Y. (2001). Contaminación por hidrocarburos aromáticos policíclicos en sedimentos y organismos del Puerto de Salinas Veracruz, Oaxaca, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 11(1), 21-30



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

- Bracho, M., Diaz, L., Soto, L. (2004). Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y heterocíclicos por *Pseudomonas spp.* *Ciencia*,12(4),269-275.
- Chang, BV., Chang, I.T., Yuan, SY. (2008). Biodegradation of phenanthrene and pyrene from mangrove sediment in subtropical Taiwan. *J. Environ. Sci. Health Part A*,43, 233-238
- Chauhan, A., Fazlurrahman, J., Oakeshott,R.(2008). Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for biorremediation. *Indian J. Microbiol*,48,95-113.
- Copotelli, BM., Ibarrolaza, A., Días, R., Del Panno, M., Berthe, L., Morelli, I. (2010). Study of the degradation activity and the strategies to promote the bioavailability of phenanthrene by *Sphingomonas paucimobilis* strain 20006FA. *Microb Ecol*,59,266-276.
- Coral, G., Karagoz, S. (2005). Isolation and characterization of phenanthrene-degrading bacteria from a petroleum refinery soil. *Annals of Microbiology*,55(4),255-259.
- Das, N., Chandran P. (2011). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International*, 11,1-13.
- Datta P., Tiwari P.,Pandey L.,(2018). Isolation and characterization of biosurfactant producing and oil degrading *Bacillus subtilis* MG495086 from formation water of Assam oil reservoir and its suitability for enhanced oil recovery. *Bioresource Technology*, 270,439-448.
- Deng, Y., Zhang, Y., El-Latif,A., Liu,R., Yang, Min.(2010). Cell surface properties of fice polycyclic aromatic compound-degrading yeast strains. *Appl Microbiol Biotechnol*,86,1933-1939
- Deveryshetty, J., Phale, P. S. (2009). Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas sp. strain PPD*: purification and characterization of 1-hydroxy-2-naphthoic acid dioxygenase. *Microbiology*, 155(9), 3083–3091.
- Díaz M., Grigson S., Peppiatt C., Burgess J., (2000). Isolation and characterization of novel hydrocarbon-degrading euryhaline consortia from crude oil and mangrove sediments. *Mar. Biotechnol*, 2(6),522–532.
- Douben, P. E. (2003). PAHs: An Ecotoxicological Perspective. *Ecological and Environmental toxicology series*,10.
- FAO. (2019). La contaminación del suelo, una realidad oculta. (<http://www.fao.org/3/I9183ES/i9183es>)
- Gagnaire B., Thomas H., Burgeot T., Renault T. (2006). Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: Screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell Biol. Toxicol*,22(1) ,1–14
- García,K., Moreno, I., Hernández, E., Corona, A., Giacomani, G., Caballero,C.(2016) Degradation of phenantrene by natural consortia in seawater. *Romain Biotechnological Letters*,21(1),11194-11200.
- Gomez F., Sartaj M. (2014). Optimization of field scale bio piles for bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil at low temperature conditions by



- response surface methodology (RSM). *Int. Biodeterioro. Biodegradation*, 89, 103–109.
- Golshan, M., Kalantary, R., Nasser, S., Farzadki, M. (2016). Phenanthrene removal from liquid medium with emphasis on production of biosurfactant. *Water Science & Technology*, 74, 2878-2878.
- Habe, Hiroshi., Omori., Toshio. (2003). Review: Genetic of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism in diverse Aerobic Bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 67 (2), 225-243
- Haritash AK, Kaushik CP. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, 169(1)1-15.
- Henry, N., Robinson, L., Johnson, E., Cherrier, J., Abazingue, A. (2011). Phenanthrene Emulsification and Biodegradation Using Rhamnolipid Biosurfactants and *Acinetobacter calcoaceticus* In Vitro. *Bioremediation Journal*, 15(2), 109-120.
- Hou, N., Li, D.P., Ma, F., Li, C.Y. (2013). Fermentation kinetics of bio-demulsifier producing bacteria XH-1. *J. Jiangsu Univ.* 34, 1671–7775.
- Hou, N., Zhang, N., Jia, T., Sun, Y., Dai, Y., Wang, Q., Li, D., Luo, Z., Li, C. (2018). Biodegradation of phenanthrene by biodemulsifier-producing strain *Achromobacter sp. LH-1* and the study on its metabolisms and fermentation kinetics. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 163, 205-214.
- Huang Yi-Jun., Bing Jian Zhi., Ning-Zeng Jian., Chen Quen-Zhen., Zhao Yong-Quiang., Shou Lou., Xu Xiao-qun. (2010). The chronic effects of oil pollution on marine phytoplankton in a subtropical bay, China. *Environ Monit Assess*, 1-14.
- Jia, X., He, Y., Jiang, D., Liu, C., Lu, W. (2019). Construction and analysis of an engineered *Escherichia coli*-*Pseudomonas aeruginosa* co-culture consortium for phenanthrene bioremoval. *Biochemical Engineering Journal*, 148, 214-223.
- Kaczorek, E., Pacholak, A., Zdzarta, A., Smulek, W. (2018). The impact of biosurfactants on microbial cell properties leading to hydrocarbon bioavailability increase. *Colloid Interfaces*, 2(35), 2-22.
- Kotska JE., Prakash O., Overholt WA., Green SJ. Freyer G., Canion A. Delgado J. Norton N., Hazen T., Huettel M. (2011). Hydrocarbon-Degrading Bacteria and the Bacterial Community Response in Gulf of Mexico Beach Sands Impacted by the Deepwater Horizon Oil Spill. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(22), 7962–7974.
- Kim, Y., Freeman, J., Moody, J., Engesser, C. (2005). Effects of pH on the degradation of phenanthrene and pyrene by *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Appl Microbiol Biotechnol*, 67, 275-285.
- Kumar, M., León, S., Materano, A., Ilzins, O.A. (2006). Enhancement of oil degradation by co-culture of hydrocarbon degrading and biosurfactant producing bacteria. *Pol. J. Microbiol*, 55-139-146.
- Kuppusamy, S., Thavamani, P., Megharaj, M., Lee, Y., Naidu, R. (2016). Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degrading,



- pH tolerant, N-fixing and P-solubilizing novel bacteria from manufactured gas plant (MGP) site soils. *Environmental Technology & Innovation*,1-42.
- Liu, S., Guo, C., Lin, W, Wu,F., Lu, G., Lu, J., Dhang, Z.(2017). Comparative transcriptomic evidence for Tween80-enhaced biodegradation of phenanthrene by *Sphingomonas sp GY2B*. *Science of the total Enviroment*,609,1161-1171.
- Lin,M., Hu, X., Weiwei, C., Wang, H., Wang, C.(2014). Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas sp. Bz-3*, isolated from crude oil contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*,94,176-181.
- Mallick, S., Chatterjee,S., Dutta,T.(2007). A novel degradation pathway in the assimilation of phenanthrene by *Staphylococcus sp. Strain PN/Y* vía meta cleavage of 2-hydroxy--1-naphtoic acid:fromation of trans-2,3-dioxo-5-(2'-hydroxyphenyl)-pent-4enoic acid. *Microbiology*,153,2104-2115.
- Ma,J., Xu,L., Jia,L.(2012). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas sp. JM2* isolated from active sewage sludge of chemical plant. *Journal Enviromental Sciences*,24(2),2141-2148.
- Ma, Z., Liu, J., Dick, R., Li, H., Shen,D., Gao, Y., Waigi, M., Lin, W.(2018). Rhamnolipid influences biosorption and biodegradation of phenanthrene by phenanthrene-degrading strain *Pseudomonas sp. Enviromental pollution*,240,359-367.
- Makkar,RS., Cameotra,SS., Banat, IM. (2012). Advances in utilization of renewable substates for biosurfactant production. *AMB Exp*,1, 1-19.
- Masakorala, K., Yao, J., Cai, M., Chandankere, R., Yuan, H.,Chen, H. (2013). Isolation and characterization of a novel phenanthrene (PHE) degrading strain *Pseudomonas sp. USTB-RU* from petroleum contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 263, 493–500.
- McGenity, T. J., Folwell, B. D., McKew, B. A., & Sanni, G. O. (2012). Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions. *Aquatic Biosystems*, 8(1),10.
- Meckenstock, R., Mouttaki, H. (2011). Anaerobic degradation of non-substituted aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*,22,406-414.
- Meckenstock, RU., Boll, M., Mouttaki, H., Koelschbach, JS., Cunha, TP., Weyrauch,P.,Dong, Xiyang; Himmelberg, Anne M. (2016). Anaerobic Degradation of Benzene and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 26(1-3), 92–118.
- Meckenstock,R., Safinowski,M., Griebler, C.(2004). Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: Mini Review. *Microbiology Ecology*, 49, 27–36.
- Meiling Yi;Lilan Zhang;Cunli Qin;Peili Lu;Hongcheng Bai;Xinkuan Han;Shupeiyuan; (2022). Temporal changes of microbial community structure and nitrogen



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

- cycling processes during the aerobic degradation of phenanthrene. *Chemosphere*, -.
- Mishra, A., Rathour, R., Singh, R., Kumari, T. (2020). Degradation and detoxification of phenanthrene by actinobacteria *Zhinhengliuella* sp. ISTPL4. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-12.
- Mona Z., Mohammad M., Authman H., Hossan H. (2015). Bioremediation of Petroleum Contaminants in Aquatic Environments (Review Article). *Life Science Journal*, 12(5), 109-121.
- Montagnolli R., Matos P., Bidoia E. (2015). Assessing *Bacillus subtilis* biosurfactant effects on the biodegradation of petroleum products. *Environ Monit Assess*, 187, 1-17.
- Moody, J., Freeman, J., Doerge, D., Cerniglia, C. (2001). Degradación de fenantreno y antraceno por suspensiones celulares de *Mycobacterium* sp. cepa PYR-1. *Appl Environmental Microbiology*, 67(4), 476-483.
- Mrozik, A., Piotrowska-Seget, Z., & Labuzek, S. (2003). Bacterial degradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polish Journal of Environmental Studies*, 12(1).
- Nie, M., Yin, X., Ren, C., Wang, Y., Xu, F., Shen, Q. (2010). Novel rhamnolipid biosurfactants produced by polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain NY3. *Biotechnology Advances*, 28, 635-643.
- Nzila, A. (2013). Update on the cometabolism of organic pollutants by bacteria. *Environmental Pollution*, 178, 474-482.
- Ortíz, R., Cram, S., Sommer, I. (2012). Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) en suelos de la llanura aluvial baja del estado de Tabasco, México. *Universidad y Ciencia*, 28(2), 131-144.
- Oliva, A. L., Quintas, P. Y., La Colla, N. S., Arias, A. H., & Marcovecchio, J. E. (2015). Distribution, Sources, and Potential Ecotoxicological Risk of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Surface Sediments from Bahía Blanca Estuary, Argentina. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 69(2), 163-172.
- Parab, V., Phadke, M. (2020). Co-biodegradation studies of naphthalene and phenanthrene using bacterial consortium. *Journal of Environmental Science and Health*, 1-13.
- Parhamfar M., Bayat Z., Hassanshahian M., Hosseini S. (2018). Investigation of Oil-in-Water Emulsions Treatment by Crude Oil Degrading Bacteria and Coagulation with Cationic Polyacrylamide. *Journal of Petroleum & J Environmental Biotechnology*, 9(2), 2-9.



- Pedetta,A., Pouyte,K., Herrera,M., Babayy,P., Espinosa, M., Costagliola, M., Studdert, C., Peressutti, S.(2012).Phenanthrene degradation and strategies to improve its bioavailability to microorganisms isolated from brackish sediments. *International Biodeterioration & Biodegradation*,1-7.
- Prabhu, Y., Phale, PS. (2003). Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas sp strain PP2*: novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation. *Appl. Microbiol Biotechnol*,61,342-351.
- Pantsyrnaya, T., Blanchard, F., Delaunay, S., Georgen, J.L. (2011). Effect of surfactants, dispersion and temperature on solubility and biodegradation of phenanthrene in aqueous media. *Chemosphere*,83,29-33.
- Pinyakong, O., Habe,H., Supaka,N., Pinpanichkarn,P., Juntongin,K.(2000). Identification of novel metabolites in the degradation of phenanthrene by *Sphingomonas sp strain P2*. *FEMS Microbiology Letters*,191(1),115-121.
- Qin, X., Tang J., Di, L., Zhang, Q. (2012). Effect of salinity on the bioremediation of petroleum hydrocarbons in a saline-alkaline soil. *Letters in Applied Microbiology*, 55, 210-217.
- Reddy, MS., Naresh,B., Leela, T., Prashathi,M., Madhusudhan, N.Ch., Dhanasri, G., Devi, P.(2010). Biodegradation of phenanthrene with biosurfactant production by a new strain of *Brevibacillus sp*. *Bioresource Technology*,101,7980-7983.
- Radhir S., Makkar J.,Karl J.(2003).Comparision of synthetic surfactans and biosurfactans in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(10), 2280–2292.
- Reynaud S., Duchiron C., Deschaux, P. (2004).3-Methylcholanthrene induces lymphocyte and phagocyte apoptosis in common carp (*Cyprinus carpio* L.) in vitro. *Aquat. Toxicol*, 66(3),307–318.
- Saadoun I., Al-Ghzawi Z. (2005). Bioremediation of Petroleum Contamination. Bioremediation of Aquatic and Terrestrial Ecosystems. *Science Publishers*,173– 212.
- Schippers C, Gessner K, Mueller T, Scheper T. (2000). Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorolipid mixture. *J Biotechnol*,83,189–198.
- SEMARNAT. (2017). Evaluación de contaminantes orgánicos persistentes e hidrocarburos aromáticos policíclicos en la Ciudad de Salamanca, Guanajuato. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático.
- Shankar, R., Joon Geon, An., Loh, Andrew., Yim, Un Hyunk. (2019). A Systematic study of the effects of solvents on phenathrene photoxidation. *Chemosphere*,220,900-909.
- Shin,K., Kim,K., Seagren,E. (2004). Combined effects of pH and biosurfactant addition on solubilization and biodegradation of phenanthrene. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(3),336-343.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

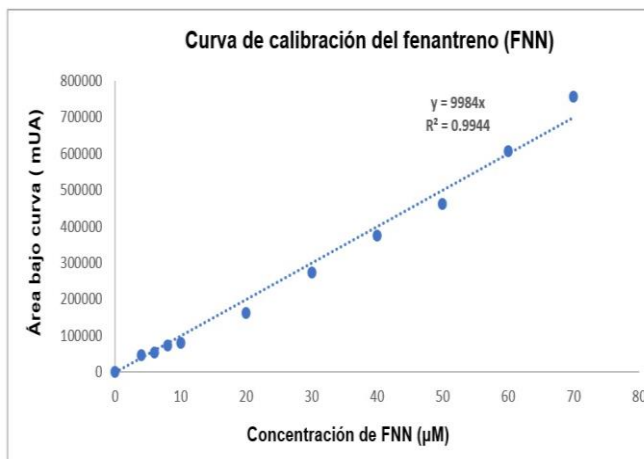
- Souza, E., Vessoni, T., Pinheiro, E. (2014). Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 89, 88-94.
- Stingley R.L., Khan A.A., Cerniglia C.E. (2004) Molecular characterization of a phenanthrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 322, 133-146
- Tian, L., Ma, P., Zhong, J.J. (2002). Kinetics and key enzyme activities of phenanthrene degradation by *Pseudomonas mendocina*. *Process Biochem*, 37, 1431-1437.
- Tao, X.Q., Lu, G.N., Dang, Z., Yang, C., Yi, X.Y. (2007). A phenanthrene-degrading strain *Sphingomonas* sp. GY2B isolated from contaminated soils. *Process Biochem*, 42, 401-408.
- Tabatabaee A., Mazaheri M., Noohi A., Sajadian V. (2005). Isolation of biosurfactant producing bacteria from oil reservoirs. *Iranian J Env Health Sci Eng*, 2(1), 6-12.
- Thavasi, R., Jayalakshmi, S., Balasubramanian, T., Banat, I. (2007). Effect of Salinity, Temperature, pH and Crude Oil Concentration on Biodegradation of Crude Oil by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol Environ SCI*, 2, 51-57
- Van Hamme J., Singh A., Ward O. (2003): Recent advances in petroleum microbiology. *Rev. Microbiol. Mol. Biol*, 67(4), 503-549
- Vallero, D.A. (2010). Applied microbial ecology: bioremediation in Environmental Biotechnology. *Academic Press*, 325-400.
- Vandera, E., Samiotaki, M., Parapouli, M., Panayotou, G., Koukkou, A. (2015). Comparative proteomic analysis of *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 on phenanthrene, phthalate and glucose. *Journal of proteomics*, 113, 73-89.
- Wang, L., & Zheng, B. (2008). Toxic effects of fluoranthene and copper on marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Environmental Sciences-China*, 20(19), 363-372.
- Wang, P., Zhang, W., Jin, J., Wang, T., Wang, J., Jiang, B. (2020). A high-efficiency phenanthrene-degrading *Diaphorobacter* sp. Isolated from PAH-contaminated river sediment. *Science of the total Environment*, 746, 2-8.
- Waigi, M., Kang, F., Goikavi, C., Ling, W., Gao, Y. (2015). Phenanthrene biodegradation by sphingomonads and its application in the contaminated soils and sediments: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 104, 333-349.
- WHO (World Health Organization). (2003). (World Health Organization). Polynuclear aromatic hydrocarbons in drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality.



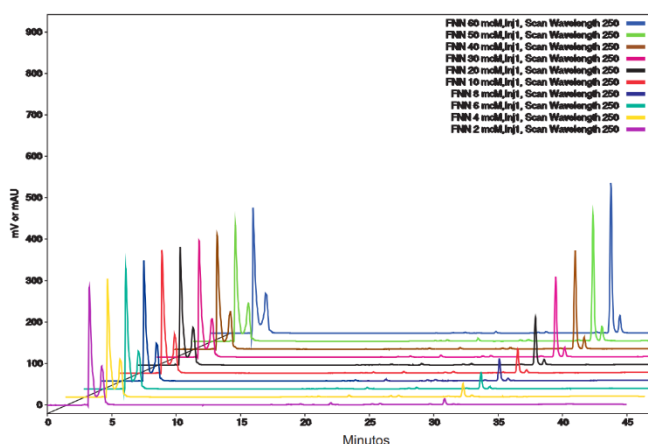
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

- Wong-Villareal, A., Reyes-Lopez, L., Corzo-Gonzalez, H., Blanco-Gonzalez, C., Yañez-Ocampo, G. (2016). Characterization of bacteria Isolation of bacteria from Pinyon Rhizosphere, producing biosurfactantes from Agro-Industrial Waste. *Polish Journal of Microbiology*, 65 (2), 183-189.
- Yuan, S.T, Chang, J.S., Yen, J.H, Chang, B.V. (2001). Biodegradation of phenantrene in river sediment. *Chemosphere*, 43, 273-278.
- Zhao, H. P., Liang, S. H., & Yang, X. (2011). Isolation and characterization of catechol 2,3-dioxygenase genes from phenanthrene degraders *Sphingomonas* sp. ZP1 and *Pseudomonas* sp ZP2. *Environmental Technology*, 32(16), 1895–1901.
- Zeng, Z., Liu, Y., Zhong, H., Xiao, R. (2018). Mechanisms for rhamnolipids-mediated biodegradation of hydrophobic organic compounds. *Science of the Total Environment*, 634, 1-11.
- Zhong, Y., Luan, T., Wang, X., Lan, C., Tam, N., (2007). Influence of growth medium on cometabolic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas* sp, strain Phe B4. *Appl Microbiol Biotechnol*, 75, 175-186.

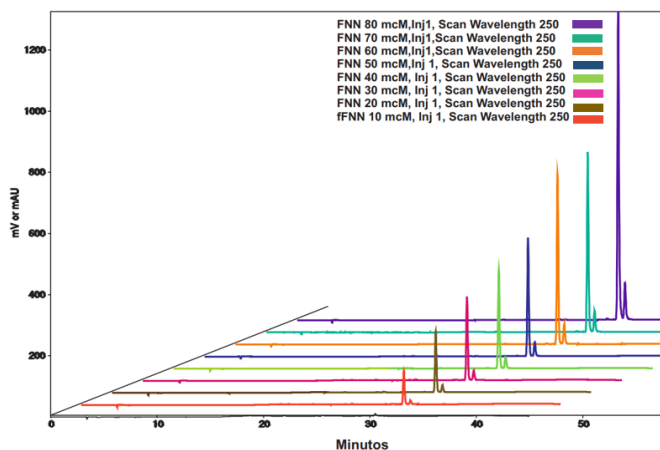
11.Anexos



Anexo 1. Curva de calibración del fenantreno (FNN).



Anexo 2. Cromatograma del fenantreno a partir de la curva de calibración.



Anexo 3. Cromatograma del fenantreno a partir de la curva de calibración.