



UNIVERSIDAD DE IXTLAHUACA CUI

INCORPORADA A LA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

Clave 091-Q

“Capacidad de degradación de los hidrocarburos pireno, fluoranteno, fenantreno y naftaleno por los actinomicetos haloalcalotolerantes *Kocuria rosea*, *Kocuria palustris* y *Microbacterium testaceum*”

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

Laura Leticia De la luz Barrueta

DIRIGIDA POR:

Tutor Académico: Dr. en C. Leobardo Gómez Oliván (UAEMex)

Tutor Externo: Dra. en C. Ninfa Ramírez Durán (UAEMex)

Asesora: Dra. en C. Keila Isaac Olivé (UAEMex)



Ixtlahuaca, Estado de México, Noviembre 2017



Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Médica y Ambiental (Cuerpo Académico Salud Ambiental) y en el Laboratorio de Fotomedicina, Biofotónica y Espectroscopia Láser de Pulsos Ultracortos (Cuerpo Académico Física Médica), ambos de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex), como parte las actividades del proyecto de investigación : “Estudio de la degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos por actinomicetos halo-alcalotolerantes utilizando métodos de espectrofluorimetría”, llevado a cabo por la “Red-Hispano-Mexicana para la búsqueda y aprovechamiento de microorganismos extremófilos con aplicaciones ambientales y biomédicas”, financiada por la Secretaría de Educación Pública a través del Programa para el Desarrollo Profesional Docente para el Tipo Superior (PRODEP), en su convocatoria para la integración de Redes Temáticas de Colaboración Académica PRODEP 2015. El proyecto anteriormente mencionado está registrado ante la Secretaria de Investigación y Estudios Avanzados de la UAEM con la clave: 4035/2016RED.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma del Estado de México por la oportunidad de realizar mi proyecto de tesis en sus instalaciones.

Dedicado de manera especial a todas y cada una de las personas que colaboraron en la elaboración de este trabajo.

En especial a:

Dra. en C. Keila Isaac Olive.

Dra. en C. Ninfa Ramírez Duran.

Por su apoyo y sobre todo al tiempo dedicado para el trabajo experimental y escrito. Me quiero ver reflejada en ellas por sus grandes virtudes y por su gran corazón que me lleva a admirarlas cada día más.

Mencionar a mi compañera Gabriela Nava Solís por su apoyo.

Sin dejar de lado a mis padres que siempre me han mostrado apoyo incondicionalmente, así como la confianza que han depositado en mí. Sentaron en mí las bases de responsabilidad y deseos de superación.

Correspondiendo a la confianza y el apoyo con la presentación de este trabajo. Y mostrando mi crecimiento profesional

Gracias a Dios por la oportunidad de llegar aquí

ÍNDICE

Contenido	Página
RESUMEN	i
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Planteamiento del problema	4
1.3. Justificación	4
1.4. Hipótesis	5
1.5. Objetivos	5
CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO	7
2.1. Hidrocarburos policíclicos aromáticos	7
2.1.1. Fuente de hidrocarburos policíclicos aromáticos	7
2.1.2 Propiedades fisicoquímicas de los HPA	8
2.1.3. Efecto de los HPA en el ambiente y la salud humana	9
2.2. Microorganismos del suelo	10
2.2.1. Microorganismos degradadores de HPA	10
2.2.2. Bacterias halófilas y halotolerantes degradadoras de HP	10
2.2.3. Bacterias alcalófilas/alcalotolerantes degradadoras de HPA	12
2.2.4. Bacterias haloalcalófilas/haloalcalotolerantes degradadoras de HPA	12
2.2.5. Actinomicetos degradadores de HPA	13
2.3. Curvas de crecimiento de microorganismos	14
2.4. Métodos analíticos para la determinación de HPA	16
2.4.1. Cromatografía de gases	16
2.4.2. Cromatografía líquida	16
2.4.3. Espectrometría de fluorescencia (fluorimetría o espectrofluorimetría)	17
CAPÍTULO 3: MATERIALES Y REACTIVOS	20
CAPÍTULO 4: METODOLOGÍA	21

4.1. Reactivación de las cepas	21
4.1.1. Cepas	21
4.1.2. Medio para microorganismos halófilos (MH)	21
4.1.3. Sembrado de las cepas:	21
4.2. Comprobación de la caracterización fisiológica de las cepas aisladas. Determinación de la concentración (%) de NaCl y pH óptimos para el crecimiento bacteriano	22
4.3. Tolerancia de las cepas a los hidrocarburos naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno	23
4.3.1. Preparación de soluciones estándares de los hidrocarburos naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno	23
4.3.2. Sembrado de las cepas en los medios MH contenientes de los hidrocarburos naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno	23
4.4. Utilización de los hidrocarburos naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno como única fuente de carbono y energía.	25
4.4.1. Medio de sales mínimo (MSM).	25
4.4.2. Preparación del pre-inóculo de las cepas.	25
4.4.3. Curvas de crecimiento de las bacterias en el MSM suplementado con hidrocarburos y sin suplementar.	26
4.5. Determinación de la concentración residual de fenantreno, fluoranteno y pireno en cultivos de <i>Kocuria rosea</i> , <i>Kocuria palustris</i> y <i>Microbacterium testaceum</i> .	27
4.5.1. Preparación de cultivos bacterianos de <i>Kocuria rosea</i> , <i>Kocuria palustris</i> y <i>Microbacterium testaceum</i> suplementados con 0.5 mg/L de fenantreno, fluoranteno y 0.05 mg/L de pireno.	27
4.5.2. Determinación de la proliferación bacteriana en los cultivos suplementados con hidrocarburos a diferentes tiempos.	27

4.5.3. Determinación de los espectros de excitación, emisión y sincronos de los sobrenadantes de los cultivos bacterianos suplementados con hidrocarburos	28
CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
5.1. Reactivación de las cepas	29
5.2. Comprobación de la caracterización fisiológica de las cepas aisladas. Determinación de la concentración (%) de NaCl y pH óptimos para el crecimiento bacteriano	32
5.3. Tolerancia de las cepas a los hidrocarburos naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno	37
5.4. Utilización de los hidrocarburos naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno como única fuente de carbono y energía	38
5.5. Determinación de la concentración residual de fenantreno, fluoranteno y pireno en cultivos de <i>Kocuria rosea</i> , <i>Kocuria palustris</i> y <i>Microbacterium testaceum</i> .	46
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES	71
CAPÍTULO 7: REFERENCIAS	73
ANEXOS: Presentaciones del trabajo en congresos	86

RESUMEN

Introducción: Las actinobacterias haloalcalotolerantes *Kocuria rosea*, *Microbacterium testaceum* y *Kocuria palustris* son potencialmente útiles en la biorremediación de ambientes salinos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA). Recientemente se demostró que éstas son capaces de biotransformar al antraceno. En este trabajo de investigación se evaluó si estos organismos son capaces de biotransformar a los HPA fenantreno, fluoranteno y pireno. **Metodología:** La capacidad de biodegradación de las actinobacterias a cada HPA se determinó inoculándolas en el medio moderado para bacterias halófilas con agar (MH), suplementado con 0.01, 0.1, 1, 10, 100, o 1000 mg/L del HPA correspondiente. Se evaluó, además, la utilización de cada HPA como una fuente de carbono y energía construyendo las curvas de crecimiento de cada actinobacteria inoculada en el medio de sales mínimo (MSM) suplementado y no suplementado con 0.5 mg/L del HPA correspondiente. La concentración residual de cada HPA se determinó a varios tiempos en los cultivos bacterianos suplementados con hidrocarburos. Para esto se separó el sobrenadante de la biomasa por centrifugación y éste se analizó por fluorescencia de excitación, de emisión y síncronos. Finalmente, se determinó para cada cultivo bacteriano suplementado con HPA a varios tiempos post-inoculación, si una alícuota de éstos fue capaz de proliferar cuando era transferida a medio MH en agar. **Resultados:** Las tres cepas de actinobacterias crecieron en presencia de todas las concentraciones de HPA evaluadas en el medio MH agar. Las curvas de crecimiento construidas en el medio MSM mostraron que no hubo mayor crecimiento en los medios suplementados con 0.5 mg/L de cada HPA con respecto a los medios libres de hidrocarburo. La concentración residual de cada hidrocarburo no disminuyó en el tiempo. Por último, después de 196 h de inoculadas las cepas en el medio MSM con HPA, estas aún fueron capaces de proliferar cuando se traspasaban a medio MH agar. **Conclusiones:** Los resultados obtenidos mostraron que actinobacterias biodegradan a los HPA evaluados, sin embargo, no hay evidencia de que los biotransformen.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

La contaminación de suelos con petróleo y sus derivados es uno de los mayores problemas que enfrenta el planeta como ecosistema, y el hombre como habitante de éste. El petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos y compuestos derivados clasificados como alifáticos y asfaltenos. [1]. Particularmente estos últimos se han acumulado en el ambiente, se caracterizan por su toxicidad, destacando actividades mutagénicas y carcinogénicas [2]. Dependiendo del número de anillos bencénicos que contengan se clasifican en dos categorías, los de bajo peso molecular (tienen tres anillos o menos) y los de alto peso (tienen cuatro o más) [3]. Los que presentan mayor número de anillos bencénicos o más, tienen a adsorberse muy fuerte en el suelo [4]. La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) agrupa a 16 de estos HPA como contaminantes prioritarios. Entre ellos se encuentran: naftaleno, antraceno, fenantreno, fluoranteno y pireno (www.campro.eu/PDF/Brochures/Flyer-CHIRON/2009-09-BMF-40-PAHs.pdf).

Una opción viable para eliminar a los HPA del medio ambiente es la utilización de microorganismos nativos de suelos contaminados, o no nativos pero capaces de adaptarse a vivir en presencia del hidrocarburo [5, 6]. En ambos casos se requiere que consuman y metabolicen el hidrocarburo. Muchos de los suelos contaminados con HPA son suelos con valores de salinidad y pH diferentes a los que no están contaminados, por lo que los microorganismos más adecuados, en estos casos, son los halófilos, alcalófilos o los haloalcalotolerantes [7-11].

Durante las últimas décadas se han aislado bacterias capaces de degradar hidrocarburos como el antraceno, naftaleno, fenantreno y/o pireno. Estas bacterias se han aislado de suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos.

En su gran mayoría pertenecen a los géneros *Burkholderia* [12], *Dietzia* [13] y *Sphingomonas* [14].

En dependencia de las condiciones fisiológicas (salinidad y pH) requeridas para su crecimiento, los microorganismos se clasifican como halófilos, halotolerantes, alcalófilos o alcalotolerantes. Teniendo en cuenta la salinidad, un microorganismo se considera halófilo cuando requiere de NaCl para crecer y vivir. [15]. Un microorganismo se clasifica como halotolerante cuando puede vivir en un medio con concentraciones de NaCl desde 0 hasta 25% [16]. Teniendo en cuenta la tolerancia al pH, un microorganismo es alcalófilo o alcalotolerante cuando requiere o puede tolerar respectivamente valores de pH mayores a 9 [17]. La clasificación de haloalcalófilo se le da a un microorganismo que requiere tanto la presencia de NaCl (en concentraciones hasta 30%) y un pH alcalino [17]. Finalmente, se considera a un microorganismo haloalcalotolerante a aquel que vive y crece tanto en presencia como en ausencia de NaCl, y crecen en un amplio intervalo de pH (>8). Debido a los rangos de pH y salinidad tolerados por los microorganismos haloalcalotolerantes, éstos son un buen prospecto para la biorremediación de suelos contaminados con HPA.

Dentro del grupo de microorganismos pobladores de los suelos se encuentran las actinobacterias o actinomicetos. Estas bacterias se caracterizan por ser Gram positivas y tienen un alto contenido de G+C [18]. Son capaces de producir varias enzimas extracelulares, biotransformar compuestos orgánicos complejos y producir biosurfactantes [11,19-21]. Si a estas características se les suma que las actinobacterias sean halófilas, alcalófilas o haloalcalotolerantes, se vuelven microorganismos prácticamente ideales para utilizarlas en procesos de biorremediación. Si los microorganismos son haloalcalotolerantes son más versátiles, pues se pueden adaptar no sólo a un valor de sal y pH, sino que toleran un amplio intervalo. [9-11].

La biorremediación de ambientes contaminados con HPA se ha informado con actinobacterias alcalotolerantes y halotolerantes nativas, como se muestra en los estudios con *Arthrobacter crystallopoietes* y *Arthrobacter arilaitensis* [7] y *Micrococcus* sp., *Dietzia* sp. y *Rhodococcus* sp. [8]. Sin embargo, prácticamente nada se conoce acerca de la utilización de actinobacterias haloalcalotolerantes para este fin.

Recientemente se han aislado las actinobacterias haloalcalotolerantes *Kocuria rosea*, *Microbacterium testaceum* y *Kocuria palustris* de suelos cercanos a áreas con actividad petrolera en el estado de Veracruz, México [9]. Estas actinobacterias toleraron %NaCl y pH en los siguientes rangos: *Kocuria rosea* (0-10%; pH 5-11), *Microbacterium testaceum* (0-10%; pH 5-11), y *Kocuria palustris* (0-25%; pH 5-12). Las mismas demostraron capacidad para producir biosurfactantes y para biotransformar al antraceno, por lo que potencialmente son útiles en procesos de biorremediación [9-11].

La capacidad biotransformadora se determinó a partir de la disminución de la concentración residual del antraceno en cultivos bacterianos utilizando fluorescencia de excitación, emisión y sincrónica, dado el alto rendimiento cuántico de estos compuestos. De las tres modalidades la fluorescencia de excitación y emisión resultaron las más adecuadas. La biotransformación también se evidenció por espectroscopía infrarroja, lo que complementó el resultado encontrado por fluorescencia, y demostró que ésta, aunque no muy utilizada para este tipo de estudios, es una opción viable y asequible [9-10].

El antraceno es un hidrocarburo policíclico aromático lineal y de bajo peso molecular. A fin de continuar el estudio de la capacidad biotransformadora de estas cepas, es necesario estudiar otros hidrocarburos con diferente geometría (como el fenantreno, que también es de bajo peso molecular pero diferente estructura química) y de otros pesos moleculares (como el fluoranteno y pireno que son hidrocarburos de 4 anillos, o el naftaleno que solo tiene 2).

1.2. Planteamiento del problema

México es uno de los grandes productores de petróleo a nivel mundial. De ahí que existan numerosas áreas del país dedicadas a esta actividad. Es de esperarse entonces que estas áreas, y otras cercanas, estén contaminadas con petróleo y sus derivados. Una opción posible para el rescate y restauración de estas áreas es la biorremediación con cepas nativas o adaptadas a vivir en estas condiciones. Los microorganismos haloalcalotolerantes parecen ser los más indicados para este fin, por su facilidad para adaptarse a vivir en ambientes con diferentes concentraciones de sal (NaCl) y pH.

Las actinobacterias haloalcalotolerantes *Kocuria rosea*, *Kocuria palustris* y *Microbacterium testaceum*, aisladas de zonas cercanas a áreas con actividad petrolera en el estado de Veracruz en México mostraron, mediante fluorescencia y FT-IR, la capacidad de biotransformar al antraceno. El problema a abordar en esta tesis es el de proponer o no a estas cepas de actinobacterias como posibles biorremediadoras de HPA. Para ello el estudio de biotransformación tiene que ampliarse a otro tipo de hidrocarburo, como pueden ser el pireno, fluoranteno, fenantreno y naftaleno. Por tanto, la pregunta de investigación de este trabajo es la siguiente: ¿Las actinobacterias haloalcalotolerantes *Kocuria rosea*, *Kocuria palustris* y *Microbacterium testaceum* serán capaces de biotransformar a los hidrocarburos policíclicos aromáticos pireno, fluoranteno, fenantreno y naftaleno?

1.3. Justificación

La contaminación ambiental por petróleo y sus derivados (entre los que se encuentran los hidrocarburos policíclicos aromáticos) es uno de los mayores problemas en materia de contaminación que enfrenta el planeta. Una de las estrategias más prometedoras en la actualidad es la biorremediación, es decir utilizar microorganismos que sean capaces de biotransformar y degradar al

contaminante. La búsqueda de microorganismos con tales capacidades es una de las líneas actuales de la microbiología ambiental.

Debido a las características fisicoquímicas de los ambientes contaminados, los microorganismos haloalcalotolerantes son una buena opción. Estos organismos requieren o toleran altas concentraciones de sal y pH. La búsqueda a nivel de laboratorio de tales microorganismos implica aislarlos y, una vez aislados, comprobar su crecimiento en presencia de varias concentraciones de NaCl, valores de pH y del HPA bajo estudio.

1.4. Hipótesis

En concordancia con la pregunta se plantea como hipótesis alterna: Los actinomicetos haloalcalotolerantes *Kocuria rosea*, *Kocuria palustris* y *Microbacterium testaceum* tienen la capacidad de biotransformar a los hidrocarburos naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno, y esta biotransformación es posible monitorearla y cuantificarla mediante fluorescencia de excitación, emisión o sincronos.

Por lo tanto, la hipótesis nula de esta investigación es: Los actinomicetos haloalcalotolerantes *Kocuria rosea*, *Kocuria palustris* y *Microbacterium testaceum* no tienen la capacidad de biotransformar a los hidrocarburos naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno.

1.5. Objetivos

Objetivo General

Determinar la capacidad de los actinomicetos haloalcalotolerantes *Kocuria rosea*, *Kocuria palustris* y *Microbacterium testaceum* para biotransformar a los hidrocarburos policíclicos aromáticos naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno.

Objetivos específicos

- Preparar el medio de cultivo MH suplementado con 3% ó 10% de NaCl y ajustado en ambos casos a pH 8.
- Reactivar cada cepa en el medio MH correspondiente solidificado con agar.
- Determinar la tolerancia de las cepas a cada hidrocarburo al cultivarlas en medio MH solidificado con agar, el cual contiene al hidrocarburo. Evaluar concentraciones de 0.01, 0.1, 1, 10, 100, y 1 000 $\mu\text{g/mL}$. de cada hidrocarburo en el medio MH.
- Determinar para cada cepa la utilización de los hidrocarburos, como única fuente de carbono y energía, mediante curvas de crecimiento en el medio de sales mínimo suplementado 3% o 10% de NaCl (MSM-3% y MSM-10%). Para ello, se construirán las curvas de crecimiento de cada cepa en ausencia de hidrocarburo y en presencia de cada uno de estos.
- Determinar la concentración residual de cada hidrocarburo en el tiempo de los cultivos bacterianos de cada cepa en su medio MSM correspondiente (MSM-3% o MSM-10%).

CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1. Hidrocarburos policíclicos aromáticos

Los HPA son contaminantes prioritarios debido a su toxicidad potencial, mutagenicidad y carcinogenicidad [22]. Son un grupo de compuestos que se encuentran en el aire, agua, sedimentos y suelos. Dependiendo del número de anillos bencénicos, se han clasificado en 2 categorías: los de bajo peso molecular (que contienen 3 o menos anillos) y los de alto peso (que contienen 4 o más). [3].

2.1.1. Fuente de hidrocarburos policíclicos aromáticos

Se ha reportado la presencia de diversos HPA en muestras de aire [23], agua [24], sedimentos [24-25] y suelos [26].

Los HPA se han acumulado en el medio ambiente debido a actividades antropogénicas y naturales [27]. Son el producto de la combustión incompleta de materiales orgánicos, combustibles fósiles, diversas actividades industriales, incendios forestales, erupciones volcánicas y derrames de productos de petróleo [28].

Dentro de los derrames accidentales de petróleo que han causado gran preocupación, por sus potenciales daños ambientales, se pueden citar: el Amoco Cadiz ocurrido en Bretaña en 1978, el Exxon Valdez en 1989 en el Principe William Sound, el Haven en las costas de Italia en 1991, el buque tanque Nakhodka en Japón en 1997, el buque tanque San Jorge en Uruguay en 1997, el Nissos Amorgos en Venezuela en 1997 [29], el accidente del buque Prestige ocurrido en España en el 2002 [30] y, recientemente, el derrame de petróleo causado por el hundimiento de la plataforma Deepwater Horizon en el Golfo de México, en el 2010 [31].

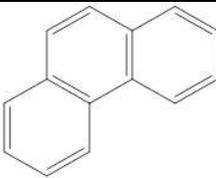
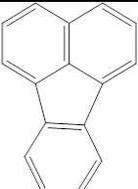
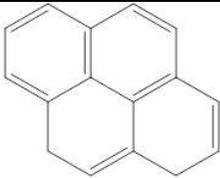
2.1.2. Propiedades fisicoquímicas de los HPA

Los HPA son compuestos orgánicos que contienen dos o más anillos de benceno fusionados presentados en diversas configuraciones estructurales [3]. Su hidrofobicidad generalmente aumenta conforme aumenta la masa molecular [33].

Debido a su naturaleza hidrofóbica, los HPA presentes en los ecosistemas terrestres se adhieren a partículas de suelo y sedimentos, disminuyendo su disponibilidad y, por lo tanto, presentando una mayor tendencia a acumularse en los alimentos [33].

La persistencia de los HPA en el medio ambiente depende de las características físicas y químicas del medio y de los HPA, la concentración, la dispersión y la biodisponibilidad del contaminante. A mayor peso molecular del HPA mayor es su toxicidad y persistencia en el ambiente [34]. La tabla 1 muestra algunas de las características físico-químicas del naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno.

Tabla 1. Estructura química y principales características físicas de los HPA naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno.

	Naftaleno	Fenantreno	Fluoranteno	Pireno
Estructura química				
Densidad	1.14 g/cm ³	1.18 g/cm ³	1.25 g/cm ³	1.27 g/cm ³
Masa molar	128.17 g/mol	178.23 g/mol	202.26 g/mol	202.25 g/mol
Punto de fusión	80.26°C	101°C	110.8°C	145-148°C
Punto de ebullición	218°C	332°C	375°C	404°C
Solubilidad en agua (25°C)	31.6 mg/L	1.6 mg/L	0.265 mg/L	0.135 mg/L

2.1.3. Efecto de los HPA en el ambiente y la salud humana

La Agencia de Protección Ambiental de los EE.UU. (EPA) ha enumerado a 16 HPA como contaminantes prioritarios para el ambiente por su peligrosidad para la salud humana (www.campro.eu/PDF/Brochures/Flyer-CHIRON/2009-09-BMF-40-PAHs.pdf). Por otra parte, la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) ha referido el nivel de riesgo cancerígeno de cada uno de estos.[22].

La exposición humana a los HPA puede tener lugar por inhalación de aire contaminado, por el consumo de alimentos contaminados, por el consumo accidental de polvo o suelo contaminado, por absorción a través de la piel y por exposición ocupacional [35].

Logan en 2007 [36], tras una extensa búsqueda bibliográfica, enlistó los efectos adversos que se han observado en diversas especies de peces en presencia de HPA: narcosis, mortalidad en todas las etapas de la vida, disminución en el crecimiento, factor de condición inferior, edema, disfunción cardíaca, deformidades, lesiones y tumores de la piel y el hígado, cataratas, daños en los sistemas inmunes e inmunidad comprometida, efectos estrogénicos. Eom y col., en 2007[37] reportaron la inhibición del crecimiento de plantas (*Lactuca sativa L.*, lechuga y *Brassica chinensis J.*, col china) sembradas en suelos inoculados con HPA.

La presencia de HPA representa un riesgo importante a la salud humana [38] ya que ejerce efectos citotóxicos, mutagénicos y carcinogénicos en pulmón, intestino, hígado, páncreas y piel [22]. La exposición humana a productos que contienen HPA se ha asociado con un incremento en el riesgo a padecer cáncer [39]. Kamangar y col. [40] concluyen que los altos niveles de HPA a los que están expuestas las personas en el noreste de Irán pueden contribuir a las altas tasas de carcinoma de células escamosas del esófago observadas en este sitio.

2.2. Microorganismos del suelo

El suelo es un ecosistema con una gran variedad de organismos [41], especialmente bacterias [42], las cuales contribuyen al mantenimiento y productividad del ecosistema. El suelo contiene el más alto número de grupos filogenéticos existentes, aproximadamente hay $>10^9$ células bacterianas por gramo de suelo [43].

2.2.1. *Microorganismos degradadores de HPA*

Una de las vías más efectiva y económica para disminuir y/o eliminar los HPA es la degradación microbiana [5]. La utilización de microorganismos nativos es un mecanismo por el cual los hidrocarburos pueden eliminarse de las zonas contaminadas [6], ya que ellos están adaptados a vivir en presencia de éstos.

Tras realizar una extensa revisión bibliográfica, Zhang y col., [44] enlistaron los siguientes géneros de microorganismos aislados de suelos con capacidad para degradar hidrocarburos policíclicos aromáticos de alto y bajo peso molecular: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Cunninghamella*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Syncephalastrum*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Corynebacterium*, *Cycloclasticus*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, *Vibrio*, *Gordonia*, *Nocardia* y *Streptomyces*. Kanaly y Harayama [45].mencionan que los microorganismos degradadores de HPA poseen enzimas que metabolizan estos compuestos.

2.2.2. *Bacterias halófilas y halotolerantes degradadoras de HPA*

Los microorganismos halófilos son organismos que para vivir requieren altas concentraciones de sal [15].

Kushner y Kamekura [16].propusieron en 1988 la clasificación de microorganismos dependiendo de la concentración de sal que requieren para su crecimiento óptimo Los microorganismos no halófilos son aquellos que requieren menos del 1% de NaCl. Los microorganismos halotolerantes son no halófilos que pueden tolerar altas

concentraciones de sal, en algunos casos hasta 25% de NaCl. Los microorganismos halófilos débiles son aquellos que crecen mejor en medios que contienen una concentración de 1 a 3% de NaCl. Los microorganismos halófilos moderados son aquellos que crecen óptimamente en medios con 3 a 15% de NaCl. Los microorganismos halófilos extremos son los que crecen en medios que contienen de 15 a 25% de NaCl y son capaces de crecer incluso a concentraciones salinas saturadas. Cabe señalar que el requerimiento y la tolerancia de sal de muchas especies bacterianas varían de acuerdo la composición del medio de cultivo y la temperatura de crecimiento [46].

Los microorganismos halófilos aislados se encuentran en los 3 dominios: Arquea, Eucarya y Bacteria. El dominio Bacteria contiene muchos tipos de halófilos y halotolerantes, repartidas en un gran número de subgrupos filogenéticos [46]. Las bacterias halófilas pueden ser aerobias y anaerobias [47]. Tras una extensa búsqueda bibliográfica Castillo-Carvajal y Barragán-Huerta [48].enlistaron los siguientes géneros identificados como halófilos: *Acetahalobium*, *Halorhodospira*, *Actinopolyspora*, *Salinibacter*, *Halanaerobium*, *Halothermothrix*, *Halocella*, *Halobacteroides*, *Haloanaerobacter*, *Salibacillus*, *Halobacillus*, *Marinococcus*, *Salinococcus*, *Tetragenococcus*, *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Salipiger* y *Palleronia*.

Dentro de las investigaciones realizadas para aislar bacterias halófilas o halotolerantes con capacidad para degradar eficientemente uno o más HPA, se pueden mencionar los trabajos realizados por Kumar y col., [49, 50]. Ellos reportaron, el aislamiento de cepas halotolerantes y termotolerantes de *Bacillus licheniformis* y *Pseudomonas aeruginosa* a partir de suelos contaminados y demostraron que pueden degradar fenantreno, pireno y/o dibenzotiofeno en diferentes valores de temperatura y salinidad.

Plotnikova y col. [7].mencionan que las bacterias halotolerantes *Arthrobacter crystallopoietes* y *Arthrobacter arilaitensis* aisladas a partir de suelos y sedimentos

contaminados con residuos industriales en Berezniki, Rusia, son capaces de utilizar naftaleno y antraceno en presencia de 60 mg/L de NaCl.

2.2.3. *Bacterias alcalófilas/alcalotolerantes degradadoras de HPA*

Aunque no existe una definición exacta de lo que caracteriza a un organismo alcalófilo o alcalotolerante, el término “alcalófilo” se utiliza para designar a los microorganismos que crecen óptimamente a valores de pH superiores a 9, pero no pueden crecer a valores de pH cercanos a 6.5 [17].

Diversas especies de microorganismos alcalófilos pertenecientes a los géneros: *Thioalcalimicrobium*, *Thioalcalivibrio*, *Thioalkalicoccus*, *Thioalkalispira* han sido aislados de ambientes alcalinos [51-53]. Habe y col. [54].aislaron la cepa alcalófila *Mycobacterium sp.*, a partir de una muestra de suelo y reportaron que ella puede crecer en pireno como única fuente de carbono y energía.

2.2.4. *Bacterias haloalcalófilas/haloalcalotolerantes degradadoras de HPA*

Muchos de los extremófilos que son capaces de crecer en ambientes con más de una condición física extrema reciben el nombre de multi o poli-extremófilos, tal es el caso de los microorganismos conocidos como haloalcalófilos y haloalcalotolerantes [55].

Los microorganismos haloalcalófilos requieren una salinidad de hasta 33% peso/vol. de NaCl y un pH alcalino (pH 9) [17] y los haloalcalotolerantes son aquellos que pueden vivir tanto en ausencia como en presencia de sal, incluso pueden tolerar altas concentraciones y son capaces de crecer óptimamente a pH 8 y tolerar hasta pH de 9 a 11.

Dentro del grupo de los microorganismos poli-extremófilos, los alcalófilos y halófilos son candidatos potenciales para el tratamiento de aguas residuales contaminadas que tienen altos valores de pH y alta concentración de sales [56].

Usami y col.[57].aislaron la bacteria halófila, moderadamente alcalófila, *Alkalibacillus silvisoli* sp. nov. a partir de suelos forestales de Japón. La cepa moderadamente halófila y alcalotolerante *Natribacillus halophilus* gen. nov., sp. nov. fue aislada a partir de suelo de un jardín en Japón por Echigo y col. [58]. Por otra parte, Oie y col. [56]. reportaron que la bacteria alcalófila y halofila moderada *Halomonas campisalis* degradan los compuestos aromáticos benzoato y salicilato.

2.2.5. Actinomicetos degradadores de HPA

El *phylum* Actinobacteria acoge gran parte de los microorganismos del suelo responsables de la degradación de materiales orgánicos [18]. Los actinomicetos son un grupo de bacterias que se han utilizado para la biodegradación de contaminantes orgánicos en ambientes contaminados, con excelentes resultados [20]. Dichas bacterias, producen enzimas extracelulares que tienen la capacidad de degradar numerosos compuestos orgánicos [19].

Algunos autores han reportado el aislamiento de actinomicetos a partir de suelos contaminados con HPA, los cuales poseen la capacidad para degradar naftaleno y fenantreno. *Kocuria rosea* y *Kocuria flava* fueron aisladas a partir de suelos contaminados con hidrocarburos de Pakistan [59]. *Kocuria flavus*, *Microbacterium marinilacus*, *Nocardia farcinica* y *Cellulomonas bogoriaensis* fueron aisladas a partir de suelos con HPA de Kuwait [13].

Aun cuando se ha reportado la producción de biosurfactantes y la biodegradación de HPA por actinomicetos aislados de suelos contaminados con hidrocarburos, hasta el momento solo constan los trabajos de Lara-Severino y col. [9-11], relacionados con el uso de actinomicetos haloalcalotolerantes aislados de ambientes posiblemente contaminados con hidrocarburos capaces de producir biosurfactantes y biodegradar HPA (particularmente antraceno).

2.3. Curvas de crecimiento de microorganismos

Se define como crecimiento microbiano al aumento de la cantidad de constituyentes y estructuras celulares. Cuando hay crecimiento en ausencia de división celular hay aumento en el tamaño y peso de la célula. Mientras que cuando el crecimiento es seguido de división celular hay un aumento en el número de células [60].

El crecimiento de una población es el aumento del número de células como consecuencia de un crecimiento individual y posterior división. Esto ocurre de una manera exponencial. El crecimiento exponencial es una consecuencia del hecho de que cada célula se divide dando dos células. Este proceso de aumento en la población del microorganismo tiene 4 fases, las cuales se muestran en la figura 1.

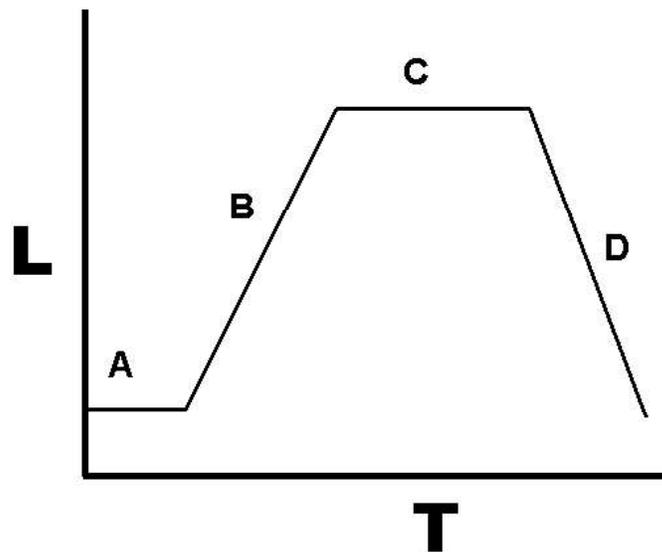


Figura 1. Representación de la curva de crecimiento de microorganismos.

En la figura el eje x representado por T es el tiempo y el eje y representado por L es el crecimiento expresado como $\log(N)$ donde N es el número de colonias por mL con actividad reproductora positiva. Hay cuatro fases identificadas con las letras A, B, C y D, las cuales representan [60]:

A: Fase de latencia

Cuando una población bacteriana se inocula en un medio fresco el crecimiento no suele comenzar de inmediato, sino después de un tiempo llamado latencia. La fase

de latencia representa un periodo de transición para los microorganismos cuando son transferidos a una nueva condición. En esta etapa se producen las enzimas necesarias para que ellos puedan crecer en un nuevo medio ambiente y, aunque no hay incremento de células, hay gran actividad metabólica, aumento en el tamaño individual de las células, su contenido proteico, ADN y peso seco.

B: Fase exponencial o logarítmica

Es el periodo de la curva del crecimiento en el cual el microorganismo crece exponencialmente, es decir que cada vez que pasa un cierto tiempo de generación la población se duplica. Bajo condiciones apropiadas, la velocidad de crecimiento es máxima ya que las condiciones ambientales afectan esta velocidad exponencial.

C: Fase estacionaria

En cultivos que se encuentran en recipientes cerrados la población de células no puede crecer indefinidamente de forma exponencial. Las limitaciones de crecimiento ocurren ya sea por agotamiento de algún nutriente esencial, por acumulación de productos tóxicos, porque se alcance un número de células elevado para el espacio disponible, o por combinación de las causas anteriores.

D: Fase de muerte

Si la incubación continua después de que una población microbiana alcanza la fase estacionaria, las células pueden continuar vivas y seguir metabolizando, pero va a comenzar una disminución progresiva en el número de células viables, y cuando esto ocurre se dice que la población ha entrado en fase de muerte.

2.4. Métodos analíticos para la determinación de HPA

Los HPA pueden ser cuantificados mediante los siguientes métodos:

2.4.1. Cromatografía de gases

La cromatografía de gas-líquido, conocida como cromatografía de gases (CG) es una de las técnicas más utilizadas en análisis cualitativo; se fundamenta en el

reparto del analito entre una fase móvil gaseosa y una líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte [61].

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) es una técnica ampliamente utilizada para la identificación, separación y cuantificación de mezclas de compuestos volátiles y termoestables, al hacer coincidir los espectros medidos con los espectros de referencia. Algunos autores, han aplicado esta técnica para la detección de HPA [62] y derivados mono y dihidroxi de HPA [63], previo pretratamiento de la muestra.

2.4.2. Cromatografía líquida

En la cromatografía líquida la fase móvil es un líquido. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) puede utilizarse con compuestos no volátiles (iones inorgánicos) no termoestables [61].

Diversos autores han aplicado esta técnica con resultados satisfactorios, como lo demuestra el trabajo realizado por Sigvardson y col. [64].al utilizar HPLC-fluorescencia para detectar amino-HPA, mencionando que la alta selectividad del método de fluorescencia permite la identificación de amino-HPA en mezclas complejas sin que se requiera un método de separación previo

2.4.3. Espectrometría de fluorescencia (fluorimetría o espectrofluorimetría)

La medida de la emisión y la absorción de la luz por parte de las sustancias se denomina espectrofotometría. Esta técnica mide 2 variables: la longitud de onda de la radiación y la cantidad de radiación de esa longitud de onda. Cuando un compuesto absorbe energía de la luz, absorbe únicamente ciertas longitudes de onda y cuando una molécula emite luz, solo lo hace a sus longitudes de onda características. Estas longitudes de onda permanecen invariables independientemente de la cantidad de analito presente [65].

La fluorescencia es un proceso de fotoluminiscencia en el que los átomos y moléculas se excitan con la absorción de la radiación electromagnética. La especie excitada se relaja al estado fundamental y emite su exceso de energía como fotones. La principal característica de esta técnica es su sensibilidad, su amplio intervalo de concentración lineal [61], no se requieren reactivos, ni aplicar un tratamiento previo a la muestra [66].

La espectrofluorimetría es un método simple, con el cual se pueden alcanzar límites de detección muy bajos utilizando equipos convencionales [61]. Los compuestos con anillos aromáticos presentan emisión de fluorescencia molecular intensa [61]. La sustitución en un anillo aromático produce variación en la longitud de onda de los máximos de absorción y cambios en los picos de fluorescencia [61].

Por lo tanto, los HPA pueden ser cuantificados por técnicas luminiscentes como la fluorescencia. Debido a su alto rendimiento cuántico [67], esta técnica es entre 10-1000 veces más sensible que la espectroscopia de absorción UV-Vis convencional [68], pues la medición directa de la intensidad de luz emitida con poco o nada de ruido es más sensible que la medición de la absorbancia a una determinada longitud de onda. Downare y col. [69] reportan que, debido a su alto rendimiento cuántico, los HPA pueden ser detectados en cantidades trazas sin necesidad de aplicar un tratamiento previo a la muestra.

Los HPA pueden ser cuantificados por medio de espectroscopia de fluorescencia: de emisión, de excitación y sincrónica (SFS), dependiendo del objetivo de la determinación, como lo hicieron Dissanayake y Galloway [70], quienes utilizaron estos métodos para cuantificar el área debajo del espectro sincrónico y la intensidad del espectro de emisión y excitación de naftaleno, pireno y benzo(a)pireno.

La espectroscopía de fluorescencia convencional implica la generación de un espectro de emisión mediante el escaneo de la longitud de onda de emisión (λ_{em}), mientras que la muestra se irradia a una determinada longitud de onda de excitación

(λ_{exc}). A esta técnica se le conoce como Espectroscopia de Fluorescencia de Emisión. Por otro lado, la excitación registra un espectro mediante el escaneo de la longitud de onda de excitación (λ_{exc}) mientras se fija la longitud de onda de emisión (λ_{em}) [61].

La espectroscopia de fluorescencia de emisión y excitación son técnicas muy utilizadas en el análisis individual de HPA debido a su alta sensibilidad, selectividad, rapidez y bajo costo [71]. Estas técnicas se han utilizado para cuantificar antraceno, benz[a]antraceno, benzo[a]pireno, criseno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, naftaleno, perileno y pireno de una mezcla de 10 HPA con resultados efectivos al cuantificar a cada uno de ellos [71].

Existe una tercera modalidad en la espectrofluorimetría que es la espectroscopia de fluorescencia sincrónica (SFS). Esta otra modalidad de espectroscopia es conocida por ser un método utilizado para la determinación simultánea de compuestos en muestras multi-componentes, lo que supera a la fluorescencia convencional de excitación-emisión [72].

El espectro de fluorescencia sincrónica se obtiene por la exploración simultánea de los monocromadores de excitación y emisión con un $\Delta\lambda$ constante entre ambos, lo que le transfiere algunas ventajas, como: la simplificación espectral, el estrechamiento del ancho de banda, la reducción de la dispersión interferencia, y una mejor resolución. SFS representa una alternativa para la diferenciación simultánea de varios compuestos en una mezcla de HPA [73-75].

Diversos autores han aplicado esta técnica con resultados satisfactorios, como lo demuestran los trabajos realizados por Lage-Yusty y col., [76] al detectar la presencia de diversos HPA en concentraciones del orden de μg ; Dissanayake y Galloway [70] compararon la cuantificación de HPA a partir del área del pico y la intensidad del pico de espectros de fluorescencia de excitación-emisión y fluorescencia sincrónica. Sang y col., [77] utilizaron el método de SFS para

determinar la biodegradación de los HPA: acenaftileno, fenantreno y pireno por los actinomicetos *Mycobacterium duvalii* y *Mycobacterium flavescens* con resultados satisfactorios.

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y REACTIVOS

Espectrofluorómetro (Horiba, Fluoromax-3), cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico para fluorescencia, balanza analítica (ADAM), espectrofotómetro (Globe CS-200PC), micropipetas 1 000 μ L y 200 μ L, gradillas, tubos de ensayo, cajas de Petri, frascos de Erlenmeyer de 125 mL con tapa de rosca, matraz volumétrico de 10 mL, papel parafilm.

Agua destilada, metanol (JT Baker), acetona (Fermont)

Naftaleno (Sigma Aldrich 98%), fenantreno (Sigma Aldrich 98%), fluoranteno (Sigma Aldrich 98%), pireno (Sigma Aldrich 98%).

Cloruro de sodio: NaCl (Sigma Aldrich 99%), proteosa peptona (BD Bacto), glucosa (Reasol), extracto de levadura (BD Bioxon), agar bacteriológico (BD Bioxon), sulfato de amonio: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Allied Chemical), hidrógeno fosfato de sodio (Na_2HPO_4) (JT Baker), hidrógeno fosfato de potasio (K_2HPO_4) (JT Baker), sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (JT Baker), cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Fermont), cloruro de hierro (III) monohidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Fermont), molibdato de amonio monihidratado ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Fermont)

Solución crómica: 6 gramos de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (Monterrey 99%) disueltos en el menor volumen de agua destilada posible, completar a 200 mL con H_2SO_4 (conc) (Fermont)

Cepas haloalcalotolerantes de los actinomicetos *Kocuria rosea*, *Microbacterium testaceum* y *Kocuria palustris*.

CAPÍTULO 4: METODOLOGÍA

4.1. Reactivación de las cepas

4.1.1. *Cepas*: Se utilizaron tres cepas de actinomicetos haloalcalotolerantes aisladas de suelos alcalinos de Veracruz cercanos a actividad petrolera, y previamente identificadas por la secuencia 16 rRNA. Las cepas toleran los siguientes rangos de pH y %NaCl: *Kocuria palustris* (0–25%; pH 5–12), *Kocuria rosea* (0–10%; pH 5–11); *Microbacterium testaceum* (0–10%; pH 5–11). Sin embargo, el crecimiento óptimo de estas cepas es *Kocuria palustris* (10% NaCl); *Kocuria rosea* y *Microbacterium testaceum* (3% NaCl); todas a pH 8 [9-11]. En este trabajo las cepas siempre fueron cultivadas en sus condiciones óptimas para garantizar la máxima actividad bacteriana. Todas están depositadas en el GenBank con las secuencias KP100512 to KP100514.

4.1.2. *Medio para microorganismos halófilos (MH)*: Este medio se preparó como lo reporta Lara-Severino y col.[9-11]. Se disolvieron conjuntamente en agua destilada las cantidades necesarias de los siguientes componentes para obtener las concentraciones finales respectivas: extracto de levadura 10 g/L, proteosa-peptona 5 g/L; glucosa 1 g/L, y agar 18 g/L. Esta solución fue suplementada con 3% o 10% de NaCl. La suplementada con 3% de NaCl se llamó medio MH-3% y en ella se cultivaron las cepas *Kocuria rosea* y *Microbacterium testaceum*. La suplementada con 10% de NaCl se llamó medio MH-10% y en ella se cultivó la cepa de *Kocuria palustris*. Ambos medios fueron ajustados a pH 8 y se esterilizaron en autoclave a 120 °C durante 15 minutos dejándolos enfriar a temperatura ambiente antes de ser utilizados.

4.1.3. *Sembrado de las cepas*: Una vez preparados los medios MH-3% y MH-10% (sección 4.2), estos se dejaron enfriar a temperatura ambiente, cuidando de que no solidificaran. Los mismos se vertieron en cajas de Petri en la campana para evitar contaminación y se dejaron solidificar toda una noche. Posteriormente las cepas se

sembraron en el medio correspondiente (*Kocuria rosea* y *Microbacterium testaceum* en el MH-3%, y *Kocuria palustris* en el MH-10%) utilizando la técnica de estría, y se dejaron en incubación durante 24 horas. Se revisaron cada 24 h durante 7 días para comprobar el crecimiento bacteriano. Para determinar la pureza de cada una se les realizó la tinción de Gram para observar su morfología. A partir de este cultivo bacteriano purificado se tomaron los inóculos para la comprobación de la caracterización fisiológica y para los estudios de tolerancia.

4.2. Comprobación de la caracterización fisiológica de las cepas aisladas. Determinación de la concentración (%) de NaCl y pH óptimos para el crecimiento bacteriano.

Se determinó el rango y concentración óptimos para el crecimiento de las cepas purificadas inoculando cada cepa en medio MH utilizando la técnica de estrías. El medio se ajustó a las siguientes concentraciones (%) de NaCl: 0, 0.5, 3, 5, 10, 15, 20, 25 y 30%, todas a pH 7. Este cultivo se incubó a 37 °C y el crecimiento se revisó cada 24 h durante 10 días. La escala utilizada para reportar el crecimiento fue la siguiente: crecimiento nulo (-), crecimiento muy escaso (+), crecimiento escaso (++) , crecimiento moderado (+++), y crecimiento abundante (++++). Este experimento se repitió 3 veces.

La comprobación del pH óptimo se realizó en medio MH líquido (sin presencia de agar), el cual fue ajustado a la concentración de NaCl (%) a la cual se observó el máximo crecimiento. Este fue ajustado a los siguientes valores de pH: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12. Una asada de la cepa se inoculó en el medio de cultivo y el frasco de Erlenmeyer se incubó a 37°C. El crecimiento microbiano se determinó comparando la turbidez del cultivo con la turbidez de los tubos correspondientes al nefelómetro de Mcfarland; las lecturas se tomaron a las 0 h y cada 24 h por 10 días. El grupo de valores de pH para los cuales la turbidez del medio correspondía con el tubo 2 del nefelómetro se consideró como el rango de pH para crecimiento. El valor de pH al

cual se registró la mayor turbidez se consideró como el pH de crecimiento óptimo. Este experimento se repitió 3 veces.

4.3. Tolerancia de las cepas a los hidrocarburos naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno

4.3.1. Preparación de soluciones estándares de los hidrocarburos naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno: En una balanza analítica se pesaron 0.05 g de cada hidrocarburo (naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno), los cuales se disolvieron en un volumen mínimo de metanol y se completó el volumen a 10 mL con metanol utilizando un matraz volumétrico. A partir de esta solución inicial de 5000 mg/L se prepararon mediante las diluciones correspondientes 25 mL de las concentraciones 1000, 100 y 1 mg/L de cada hidrocarburo en metanol (a partir de los volúmenes (5000, 500 y 5) μ L respectivamente).

4.3.2. Sembrado de las cepas en los medios MH contenientes de los hidrocarburos naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno: Se disolvieron conjuntamente en agua destilada las cantidades necesarias para preparar los medios MH-6% y MH-20%, es decir al doble de la concentración reportada anteriormente (sección 4.2). Las concentraciones finales respectivas de los componentes fueron: extracto de levadura 20 g/L, proteosa-peptona 10 g/L; glucosa 2 g/L, y agar 36 g/L. Estas soluciones fueron suplementadas con 6% o 20% de NaCl según correspondiera y se les ajustó el pH a 8. Previo a verter las soluciones en las cajas de Petri, se le añadieron a 50 mL del medio MH-6% y a 25 mL del MH-20% los volúmenes correspondientes de las soluciones patrones de hidrocarburos previamente preparadas (sección 4.4), de manera que al completar el volumen a 50 mL y 25 mL respectivamente con agua destilada, se obtuvieran finalmente 100 mL del medio MH-3% y 50 mL del MH-10%, ambos suplementados con hidrocarburos. Las concentraciones finales de los hidrocarburos en los medios fueron (0.01, 0.1, 1, 10, 100 y 1000) mg/L que equivalen a (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , y 0.1) % de hidrocarburo respectivamente. La Tabla 2 muestra en detalle las cantidades de MH-

6%, MH-20%, los volúmenes de soluciones patrones utilizados y de agua destilada para obtener los medios MH-3% y MH-10% suplementados con hidrocarburos.

Tabla 2. Preparación de los medios MH suplementados con varias concentraciones de los HPA fenantreno, fluoranteno y pireno.

Medio de partida*	Solución patrón de HPA (mg/L)	Volumen de solución patrón (mL)	Volumen de agua destilada (mL)	Concentración final de HPA (mg/L y %)
MH-6%	1	1	49	0.01 mg/L
MH-20%		0.5	24.5	10 ⁻⁶ %
MH-6%		10	40	0.1 mg/L
MH-20%		5	20	10 ⁻⁵ %
MH-6%	100	1	49	1 mg/L
MH-20%		0.5	24.5	10 ⁻⁴ %
MH-6%		10	40	10 mg/L
MH-20%		5	20	10 ⁻³ %
MH-6%	1000	1	49	100 mg/L
MH-20%		0.5	24.5	10 ⁻² %
MH-6%		10	40	1000 mg/L
MH-20%		5	20	0.1%

*El volumen de partida del MH-6% siempre fue 50 mL y el del MH-20% 25 mL

Los 100 mL de MH-3% y los 50 mL del MH-10%, ambos suplementados con hidrocarburos, se vertieron en cajas de Petri (6 cajas con MH-3% y 3 cajas con MH-10%) y se dejaron solidificar toda una noche. Posteriormente, las cepas se sembraron por triplicado en el medio correspondiente (*Kocuria rosea* y *Microbacterium testaceum* en el MH-3%, y *Kocuria palustris* en el MH-10%) utilizando la técnica de estría, y se dejaron en incubación durante 24 horas. Se revisaron cada 24 h durante 7 días para comprobar crecimiento bacteriano. La escala de crecimiento utilizada fue la misma descrita en la sección 4.2 (nulo, muy escaso, escaso, moderado y abundante).

4.4. Utilización de los hidrocarburos naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno como única fuente de carbono y energía.

4.4.1. Medio de sales mínimo (MSM): Este medio se preparó como lo reporta Lara-Severino y col. [9-11]. Se disolvieron conjuntamente en agua destilada las cantidades necesarias de las siguientes sales para obtener las concentraciones finales respectivas: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1000 mg/L, Na_2HPO_4 800 mg/L, K_2HPO_4 200 mg/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 200 mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100 mg/L, $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 5mg/L y $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1 mg/L). Esta solución de sales fue suplementada con 3% o 10% de NaCl. La solución suplementada con 3% de NaCl se llamó medio MSM-3% y en ella se cultivaron las cepas *Kocuria rosea* y *Microbacterium testaceum*. La suplementada con 10% de NaCl se llamó medio MSM-10% y en ella se cultivó la cepa de *Kocuria palustris*. Ambos medios fueron ajustados a pH 8 y se esterilizaron en autoclave a 120 °C durante 15 minutos dejándolos enfriar a temperatura ambiente antes de ser utilizados.

4.4.2. Preparación del pre-inóculo de las cepas: Una asada de cada cepa proveniente de un cultivo sólido en medio agar (sección 4.3) fue trasvasada a un frasco de Erlenmeyer que contenía 100 mL del medio MH correspondiente. Se tomaron alícuotas de 3 mL a varios intervalos de tiempo y se trasvasaron a la cubeta del espectrofotómetro donde se determinó la densidad óptica a 600 nm. A partir de estos datos se construyeron las curvas de crecimiento hasta alcanzar la fase estacionaria. Una vez determinada la fase exponencial de la curva, se estableció que el tiempo en el cual se alcanza la mitad de esta fase sería el establecido para tomar el inóculo a sembrar.

4.4.3. Curvas de crecimiento de las bacterias en el MSM suplementado y sin suplementar con hidrocarburos: Una vez sembrado el pre-inóculo se tomó 1 mL del cultivo al tiempo en el cual se alcanza la mitad de la fase exponencial. Este mL fue

ajustado con el medio MSM correspondiente hasta obtener una lectura de densidad óptica a 600 nm de 0.25 (correspondiente a 0.5 unidades nefelométricas (NTU)). Un mL de esta suspensión ajustada a 0.5 NTU fue inoculado en 100 mL de los medios MSM-3% y MSM-10%, según correspondiera, contenidos en un frasco de Erlenmeyer con tapa de rosca. Los frascos fueron cubiertos con papel metálico para alejarlos de la luz, e incubados a 150 rpm a temperatura ambiente.

El crecimiento microbiano se determinó midiendo a diferentes tiempos su densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro. Para construir las curvas de crecimiento se colectaron datos durante 96 horas comenzando con tomas de muestras cada 30 minutos durante 4 h, posteriormente cada hora hasta llegar a las 12 horas, y a partir de las 12 horas cada 24 horas. Este experimento se realizó por triplicado.

Para determinar la capacidad de crecimiento de las cepas en presencia del hidrocarburo, y para ver si estas eran capaces de consumir a estos como fuentes de carbono, se realizó el mismo experimento anteriormente descrito pero en este caso las cepas fueron inoculadas en los medios MSM-3% y MSM-10% que contenían 0.5 mg/L de hidrocarburos (se añadió 10 μ L de las soluciones de 5000 mg/L de los hidrocarburos naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno). Se determinó el crecimiento de cada cepa en presencia de cada hidrocarburo. Este experimento se realizó por triplicado.

4.5. Determinación de la concentración residual de fenantreno, fluoranteno y pireno en cultivos de *Kocuria rosea*, *Kocuria palustris* y *Microbacterium testaceum*.

*4.5.1. Preparación de cultivos bacterianos de *Kocuria rosea*, *Kocuria palustris* y *Microbacterium testaceum* suplementados con 0.5 mg/L de fenantreno, fluoranteno y 0.05 mg/L de pireno.* Un volumen de 120 μ L de una solución 500 mg/L (dilución 1:10 de la inicial de 5000 mg/L) de los hidrocarburos fenantreno y fluoranteno y de una solución de 50 mg/L (dilución 1:10 de la inicial de 500 mg/L) de pireno se

transfirió a tres frascos de Erlenmeyer con tapa de rosca (un frasco para cada hidrocarburo). El volumen de cada frasco se completó a 119 mL con MSM-3% o MSM-10% según correspondiera. Un mL de pre-inóculo de las tres bacterias, ajustado a 0.5 NTU (densidad óptica de 0.25 a 600 nm) se añadió a cada frasco de Erlenmeyer para completar 120 mL de cultivo bacteriano que contenía 0.5 mg/L de los hidrocarburos fenantreno, fluoranteno y 0.05 mg/L de pireno respectivamente. Los frascos fueron cubiertos con papel metálico para alejarlos de la luz. Se tomaron alícuotas de 3 mL de los cultivos bacterianos a los 15 min, 24 h, 72 h, 96 h, 120 h y 192 h, se centrifugaron a 5000 rpm por 5 min para separar el sobrenadante de la biomasa. Este experimento se repitió por triplicado (tres cultivos de cada bacteria con cada hidrocarburo).

4.5.2. Determinación de la proliferación bacteriana en los cultivos suplementados con hidrocarburos a diferentes tiempos. Alícuotas de 200 μ L de los cultivos bacterianos suplementados con hidrocarburos y muestreados a las 24 h, 72 h, 96 h, 120 h y 192 h se sembraron en cajas de Petri que contenían medio MH-3% o MH-10% según correspondiera. El medio fue preparado como se describió anteriormente (secciones 4.2 y 4.3). Las muestras sembradas se dejaron en incubación durante 24 horas. Se revisaron cada 24 h durante 7 días para comprobar crecimiento bacteriano.

4.5.3. Determinación de los espectros de excitación, emisión y síncronos de los sobrenadantes de los cultivos bacterianos suplementados con hidrocarburos. Utilizando los sobrenadantes colectados de los cultivos bacterianos con hidrocarburos, como se describió anteriormente (sección 4.9), se registraron los espectros de excitación, emisión y síncronos de cada sobrenadante utilizando las condiciones descritas en la tabla 3 para cada hidrocarburo, las cuales ya estaban establecidas previamente en el laboratorio. A partir de los datos colectados de todos los sobrenadantes se determinó el % de concentración residual de los mismos en el tiempo con respecto al tiempo 0 h.

Tabla 3. Condiciones experimentales (longitudes de onda) para la determinación de los HPA fenantreno, fluoranteno y pireno.

Hidrocarburo	Modo Excitación	Modo Emisión	Modo Síncrono
Fenantreno	λ_{exc} : (240-340) nm λ_{exc} : 252 nm λ_{emi} : 363 nm	λ_{emi} : (320-420) nm λ_{emi} : 363 nm λ_{exc} : 252 nm	λ = 294 nm $\Delta\lambda$ = 70 nm
Fluoranteno	λ_{exc} : (250-350) nm λ_{exc} : 285 nm λ_{emi} : 460 nm	λ_{emi} : (410-510) nm λ_{emi} : 460 nm λ_{exc} : 285 nm	λ = 360 nm $\Delta\lambda$ = 80 nm
Pireno	λ_{exc} : (250-350) nm λ_{exc} : 334 nm λ_{emi} : 393 nm	λ_{emi} : (350-450) nm λ_{emi} : 393 nm λ_{exc} : 334 nm	λ = 360 nm $\Delta\lambda$ = 40 nm

Se utilizaron como controles soluciones de 0.5 mg/L de fenantreno y fluoranteno en medio MSM-3% y MSM-10% así como 0.05 mg/L de pireno en los dos medios. De estas, también se registraron los espectros de excitación, emisión y sincronicos a los mismos tiempos que fueron muestreados los cultivos: 15 min, 24 h, 72 h, 96 h, 120 h y 192 h.

Todos los espectros de excitación, emisión y sincrónicos de este trabajo se registraron utilizando como condiciones instrumentales las siguientes: tiempo de integración de 0.5 s, e incremento de 2 nm. Todos los espectros de excitación se registraron utilizando como slits 0.5 mm. En el caso de los espectros de emisión y sincrónicos las slits utilizadas fueron de 2 nm. En todos los casos se utilizó una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico para fluorescencia (con sus cuatro lados transparentes).

CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Reactivación de las cepas:

La Figura 2 muestra las características morfológicas de las cepas. Se observa una pequeña o mediana elevación de los bordes, colonias suaves de color crema o amarilloso, con forma circular o irregular, opacas o brillosas y con ausencia de micelio. No hay pigmento difuso al medio, y en el microscopio se observan cocoides únicos y en hebras, bacilos pequeños o células filamentosas ramificadas. Todas fueron Gram positivas.





Figura 2. Características morfológicas de las cepas *Kocuria rosea* (panel superior), *Microbacterium testaceum* (panel central) y *Kocuria palustris* (panel inferior).

Las características antes descritas coinciden con la descripción morfológica de las cepas cuando fueron previamente aisladas en el laboratorio por Lara-Severino y col [9]. Esto indica que las mismas fueron reactivadas sin contaminación.

5.2. Comprobación de la caracterización fisiológica de las cepas aisladas. Determinación de la concentración (%) de NaCl y pH óptimos para el crecimiento bacteriano.

Para determinar la concentración (%) óptima de NaCl para el crecimiento bacteriano, se sembraron las cepas en medio MH, ajustado a pH 8 y suplementado con varias concentraciones de NaCl. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 4 – 6.

Tabla 4. Resultado del crecimiento de *Kocuria rosea* en medio MH ajustado a pH 7 y a varias concentraciones de NaCl (%).

Concentración NaCl (%)	Crecimiento bacteriano
0	++
0.5	+++
3	++++
5	+++
10	++
15	-
20	-
25	-
30	-

La tabla 4 muestra que *Kocuria rosea* tolera concentraciones de NaCl (%) entre 0 y 10%, siendo su máximo crecimiento al 3%. Este resultado concuerda con lo anteriormente reportado por Lara-Severino y col [9-11].

Tabla 5. Resultado del crecimiento de *Microbacterium testaceum* en medio MH ajustado a pH 7 y a varias concentraciones de NaCl (%).

Concentración NaCl (%)	Crecimiento bacteriano
0	++
0.5	+++
3	++++
5	+++
10	++
15	-
20	-
25	-
30	-

La tabla 5 muestra que *Microbacterium testaceum* tolera concentraciones de NaCl (%) entre 0 y 10%, siendo su máximo crecimiento al 3%.

Tabla 6. Resultado del crecimiento de *Kocuria palustris* en medio MH ajustado a pH 7 y a varias concentraciones de NaCl (%).

Concentración NaCl (%)	Crecimiento bacteriano
0	+
0.5	+
3	+++
5	+++
10	++++
15	+++
20	++
25	+
30	-

La tabla 6 muestra que la *Kocuria palustris* tolera concentraciones de NaCl (%) entre 0 y 10%, siendo su máximo crecimiento al 3%. Estos resultados concuerdan con lo anteriormente reportado por Lara-Severino y col [9-11].

Para determinar el valor de pH óptimo para el crecimiento bacteriano, las cepas fueron sembradas en medio MH líquido, suplementado con la concentración de NaCl (%) óptima para su crecimiento y ajustado a varios valores de pH. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 7 – 9.

Tabla 7. Resultado del crecimiento de *Kocuria rosea* en medio MH suplementado con 3% de NaCl y varios valores de pH.

pH	Crecimiento bacteriano
5	+
6	++
7	+++
8	++++
9	+++
10	++
11	+
12	-

La tabla 7 muestra que *Kocuria rosea* tolera valores de pH entre 5 y 11, siendo su máximo crecimiento a pH 8.

Tabla 8. Resultado del crecimiento de *Microbacterium testaceum* en medio MH suplementado con 3% de NaCl y varios valores de pH.

pH	Crecimiento bacteriano
5	+
6	++
7	+++
8	++++
9	+++
10	++
11	+
12	-

La tabla 8 muestra que *Microbacterium testaceum* tolera valores de pH entre 5 y 11, siendo su máximo crecimiento a pH 8. Estos resultados concuerdan con lo anteriormente reportado por Lara-Severino y col [9-11].

Tabla 9. Resultado del crecimiento de *Kocuria palustris* en medio MH suplementado con 10% de NaCl y varios valores de pH.

pH	Crecimiento bacteriano
5	++
6	+++
7	+++
8	++++
9	+++
10	++
11	++
12	+

La tabla 9 muestra que *Kocuria palustris* tolera valores de pH entre 5 y 12, siendo su máximo crecimiento a pH 8. Este resultado concuerda con lo anteriormente reportado por Lara-Severino y col [9-11].

El crecimiento bacteriano en el caso de la determinación del rango y la concentración óptima de NaCl se evaluó cualitativamente como: nulo (-), muy escaso (+), escaso (++) , moderado (+++) y abundante (++++). En el caso de la determinación del rango de pH así como su valor puntual para un crecimiento óptimo, se utilizó la escala del nefelómetro de Mcfarland donde una turbidez igual o menor a la del tubo 1 se consideró crecimiento negativo, una turbidez comparable a la del tubo 2 se consideró muy escaso (+), la turbidez del tubo 3 se consideró escasa (++) , la del tubo 4 abundante (+++) y la del tubo 5 muy abundante (++++).

La figura 3 indica en la práctica los niveles de crecimiento de la escala cualitativa para el caso de la tolerancia a varias concentraciones de NaCl.



Figura 3. Representación visual de la escala de crecimiento cualitativa utilizada para evaluar el crecimiento de las cepas en presencia de hidrocarburos: nulo (-), muy escaso (+), escaso (++), moderado (+++), abundante (++++).

Los resultados de este experimento coinciden con los reportados por Lara-Severino y Col [9-11]. *Kocuria rosea* y *Microbacterium testaceum* efectivamente crecen en concentraciones de NaCl (%) de 0 a 10, con un crecimiento óptimo al 3%. En cuanto a los valores de pH, crecen en el rango de 5 a 11, con un crecimiento óptimo de pH 8. Se comprobó que *Kocuria palustris* crece en un rango de concentraciones de NaCl de 0 – 25%, con un óptimo en 10%, y a valores de pH de 5 a 12, siendo el valor óptimo el de pH 8. Debido a que, de acuerdo a las concentraciones utilizadas en este trabajo, el crecimiento de las bacterias fue directamente proporcional a las concentraciones utilizadas, se tomó en cuenta una escala de este tipo para poder diferenciar el crecimiento de cada una.

Ambas pruebas, las morfológicas (sección 5.1) y las fisiológicas realizadas en esta sección corroboran que las cepas reactivadas son la *Kocuria rosea*, *Microbacterium testaceum* y *Kocuria palustris* utilizadas anteriormente en los estudios de biotransformación de antraceno y que son el objeto de estudio de este trabajo. Las pruebas fisiológicas además corroboraron que las mismas son haloalcalotolerantes.

5.3. Tolerancia de las cepas a los hidrocarburos naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno

Para evaluar la tolerancia de las cepas a los hidrocarburos naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno, éstas fueron sembradas en medio MH sólido correspondiente (suplementado con 3% o 10% NaCl según correspondiera) a varias concentraciones de hidrocarburos. En estas condiciones se determinó si había crecimiento o no al cabo de 3 días. La escala de crecimiento utilizada es la representada en la figura 3. Los resultados obtenidos en el estudio de tolerancia se muestran en las tablas 7-9.

Tabla 7. Tolerancia de *Kocuria rosea*, a diferentes concentraciones de hidrocarburos naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno (n = 3).

Concentración (mg/L)	<i>Kocuria rosea</i>			
	Naftaleno	Fenantreno	Fluoranteno	Pireno
0.01	++++	++++	++++	++++
0.1	++++	++++	++++	++++
1	++++	+++	+++	++++
10	+++	+++	+++	++++
100	+++	+++	++	+++
1000	++	++	++	++

Tabla 8. Tolerancia de *Microbacterium testaceum*, a diferentes concentraciones de hidrocarburos naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno (n = 3).

Concentración (mg/L)	<i>Microbacterium testaceum</i>			
	Naftaleno	Fenantreno	Fluoranteno	Pireno
0.01	++++	++++	++++	++++
0.1	++++	++++	++++	++++
1	++++	++++	+++	+++
10	+++	+++	++	+++
100	+++	+++	++	+++
1000	++	++	+	+++

Tabla 9. Tolerancia de *Kocuria palustris*, a diferentes concentraciones de hidrocarburos naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno (n = 3).

Concentración (mg/L)	<i>Kocuria palustris</i>			
	Naftaleno	Fenantreno	Fluoranteno	Pireno
0.01	++++	++++	++++	++++
0.1	++++	++++	++++	++++
1	++++	++	+++	++++
10	+++	++	+++	++++
100	+++	++	+++	++++
1000	++	++	+++	++++

No se evaluaron concentraciones más altas a 1000 mg/L pues los hidrocarburos precipitaron en el medio, volviéndose estos opacos, lo que imposibilitaba llevar a cabo el ensayo.

Los resultados de las tablas indican que las cepas en estudio son capaces de crecer en el medio nutritivo MH en presencia de los hidrocarburos. Como el medio MH contiene proteosa-peptona y glucosa, estos componentes fueron la fuente principal para obtener el carbono, por tanto las cepas no crecieron a expensas de consumir únicamente el carbono de los hidrocarburos. Por esta razón este experimento demuestra tolerancia, es decir, las cepas pueden reproducirse en presencia de los hidrocarburos. De manera general, se observó una tendencia a la disminución del crecimiento con el aumento de la concentración del hidrocarburo, lo cual es un resultado esperado. Sin embargo, el rango de concentraciones estudiadas no fue letal para los microorganismos, y estas fueron bien toleradas.

5.4. Utilización de los hidrocarburos naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno como única fuente de carbono y energía.

Para determinar si las cepas eran capaces de consumir los hidrocarburos, se sembraron en medio de sales carente de fuente de carbono. Este medio se suplementó con 0.5 mg/L de los hidrocarburos. El crecimiento bacteriano se monitoreó por el incremento de la densidad óptica a 600 nm.

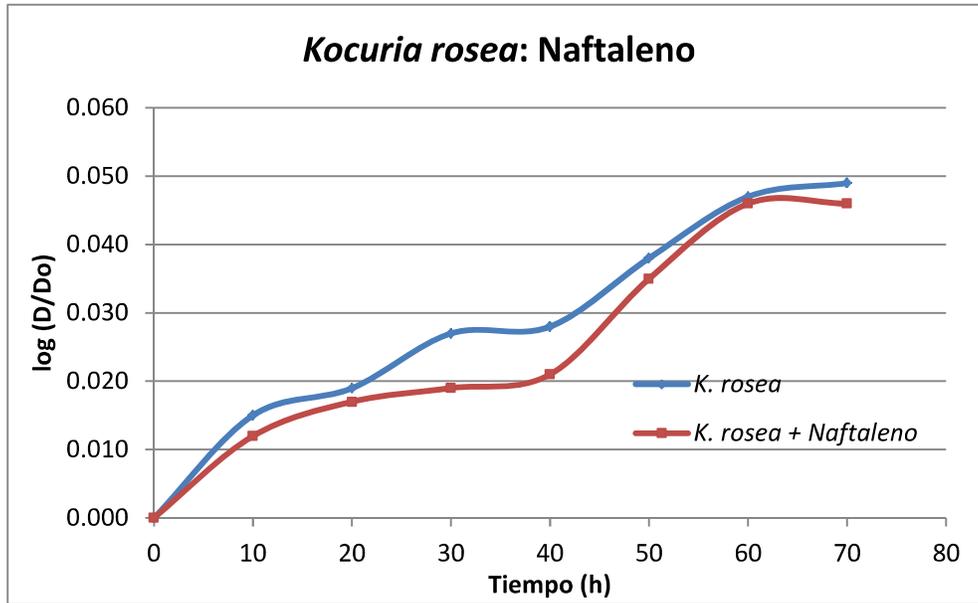


Figura 4. Curva de crecimiento de *Kocuria rosea* en el MSM-3%NaCl suplementado y sin suplementar con naftaleno.

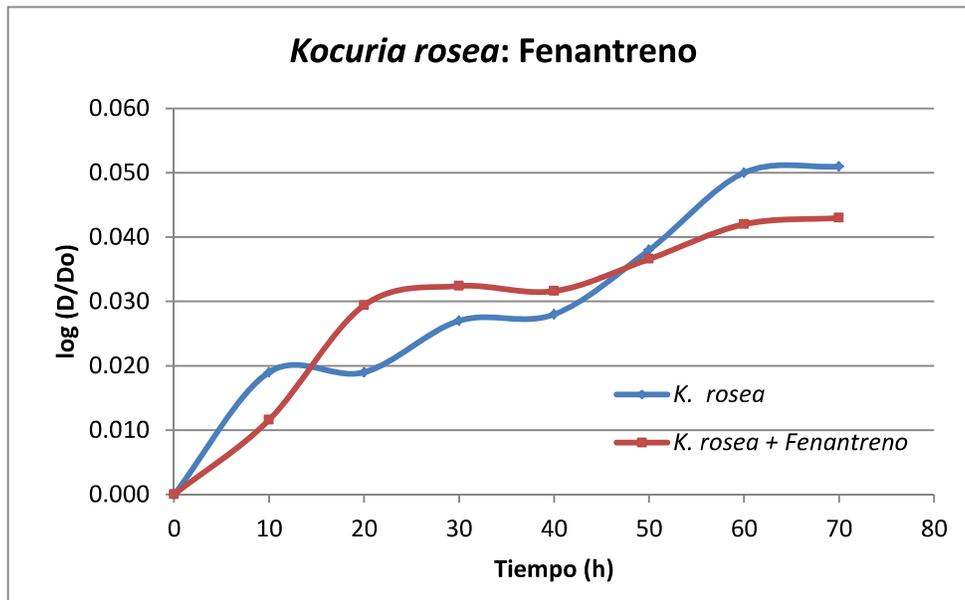


Figura 5. Curva de crecimiento de *Kocuria rosea* en el MSM-3%NaCl suplementado y sin suplementar con fenantreno.

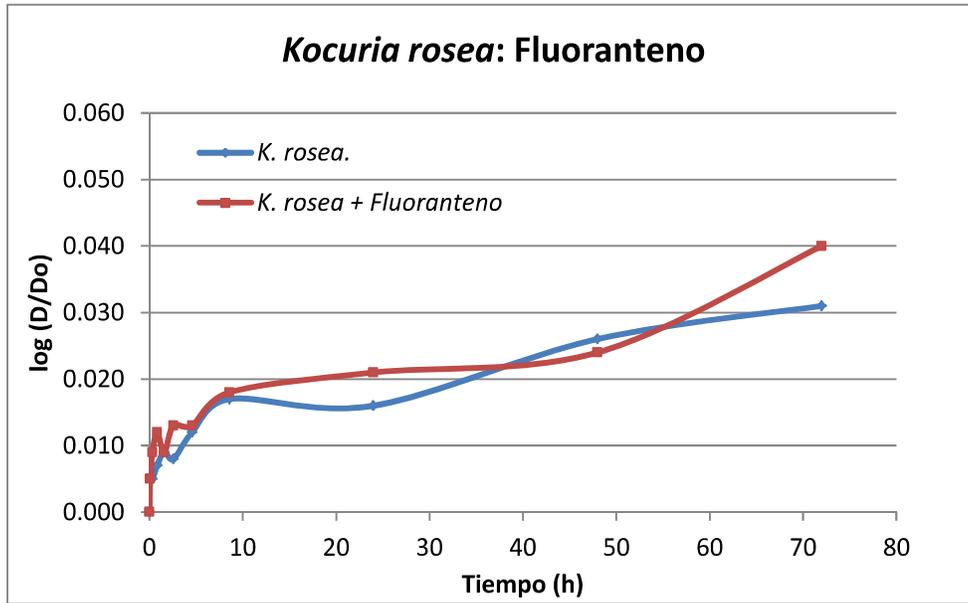


Figura 6. Curva de crecimiento de *Kocuria rosea* en el MSM-3%NaCl suplementado y sin suplementar con fluoranteno.

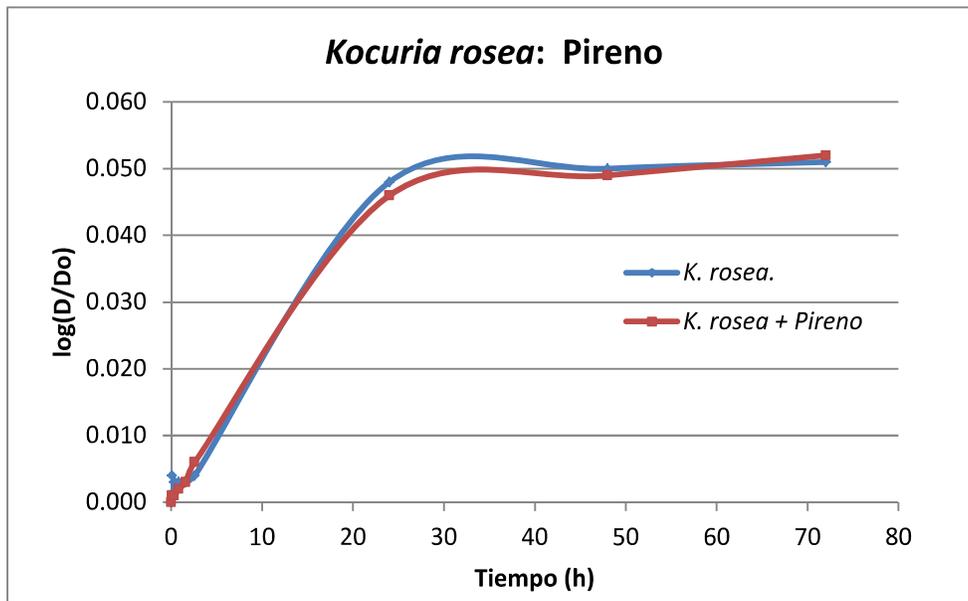


Figura 7. Curva de crecimiento de *Kocuria rosea* en el MSM-3%NaCl suplementado y sin suplementar con pireno.

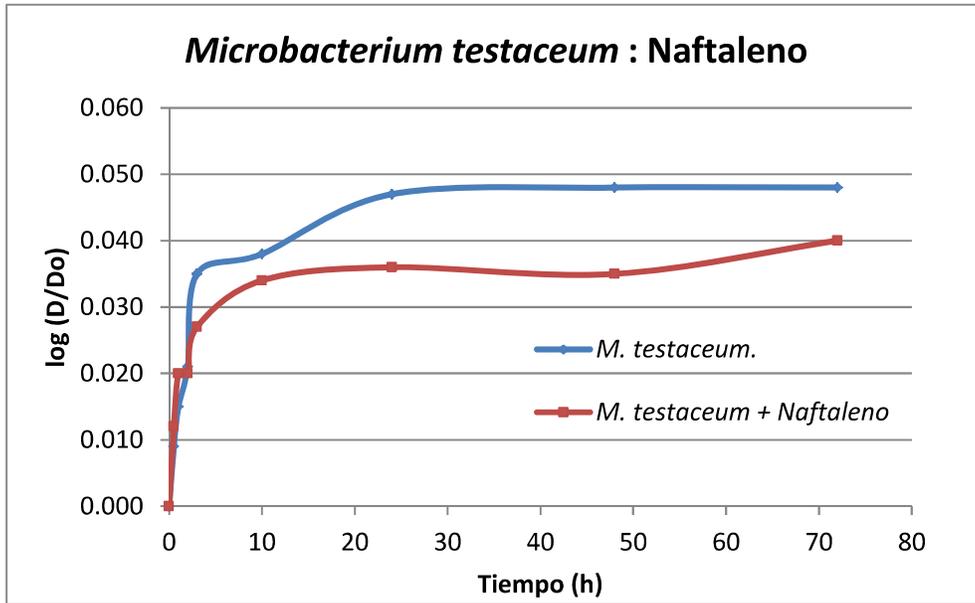


Figura 8. Curva de crecimiento de *Microbacterium testaceum* en el MSM-3%NaCl suplementado y sin suplementar con naftaleno.

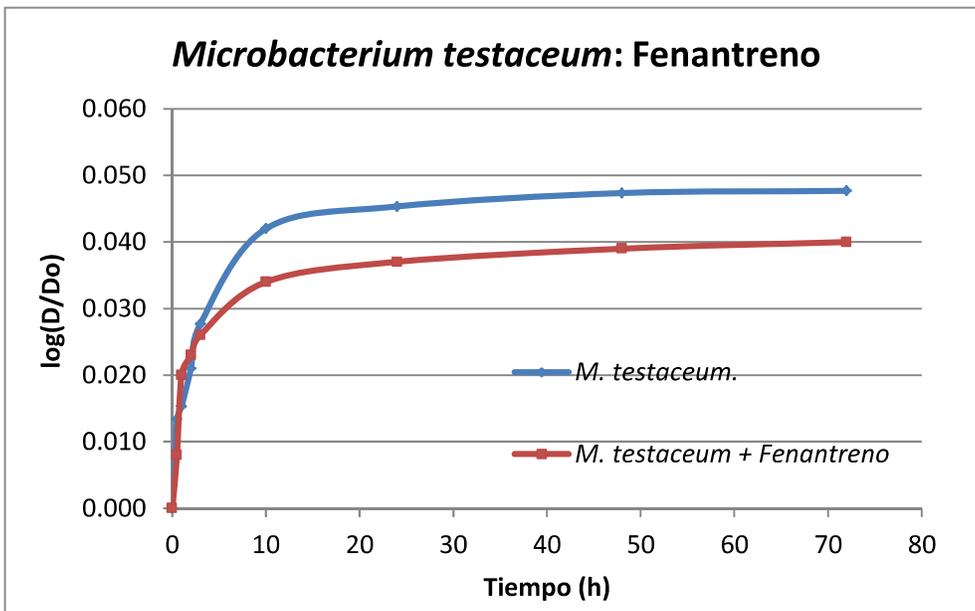


Figura 9. Curva de crecimiento de *Microbacterium testaceum* en el MSM-3%NaCl suplementado y sin suplementar con fenantreno.

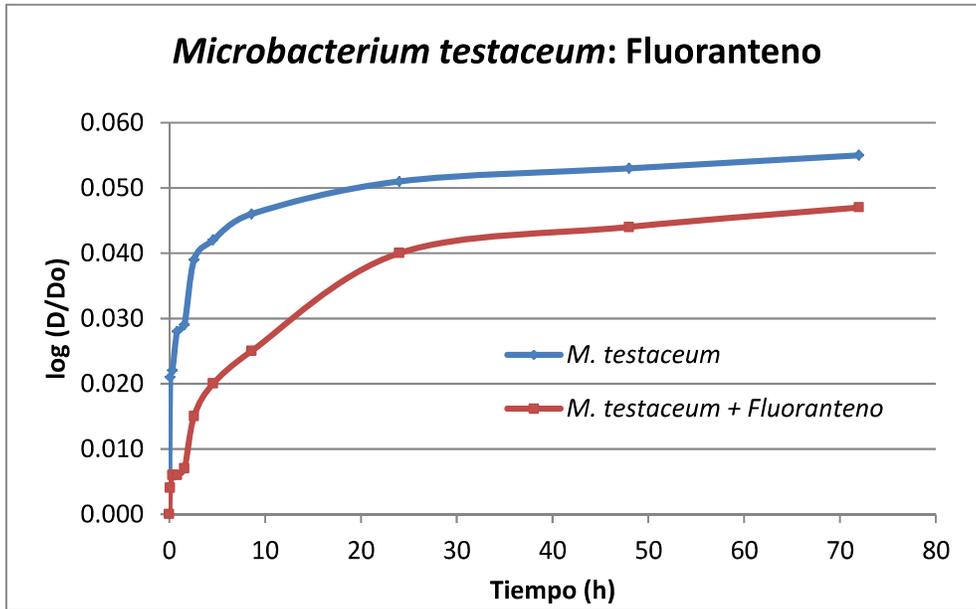


Figura 10. Curva de crecimiento de *Microbacterium testaceum* en el MSM-3%NaCl suplementado y sin suplementar con fluoranteno.

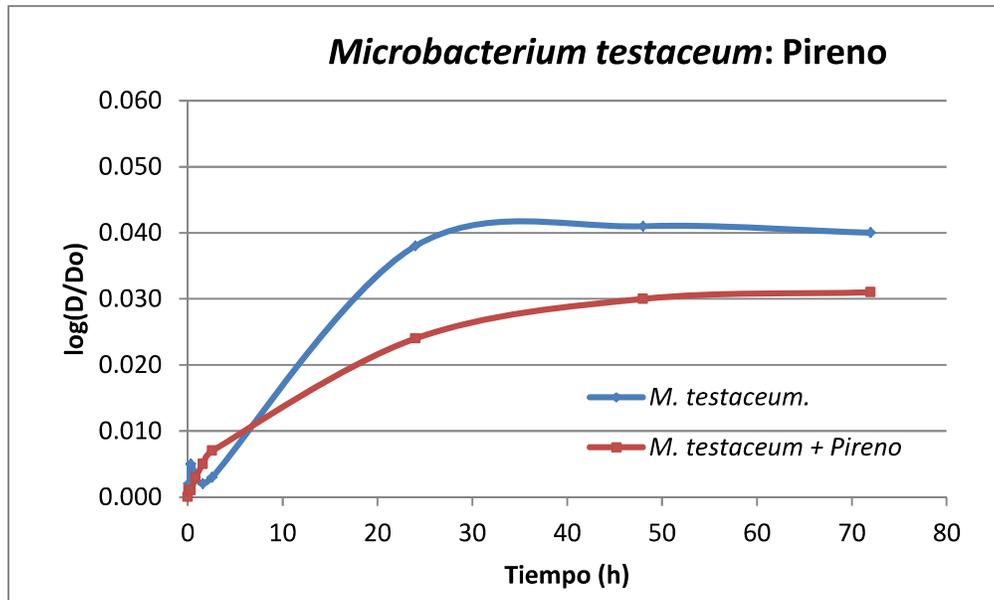


Figura 11. Curva de crecimiento de *Microbacterium testaceum* en el MSM-3%NaCl suplementado y sin suplementar con pireno.

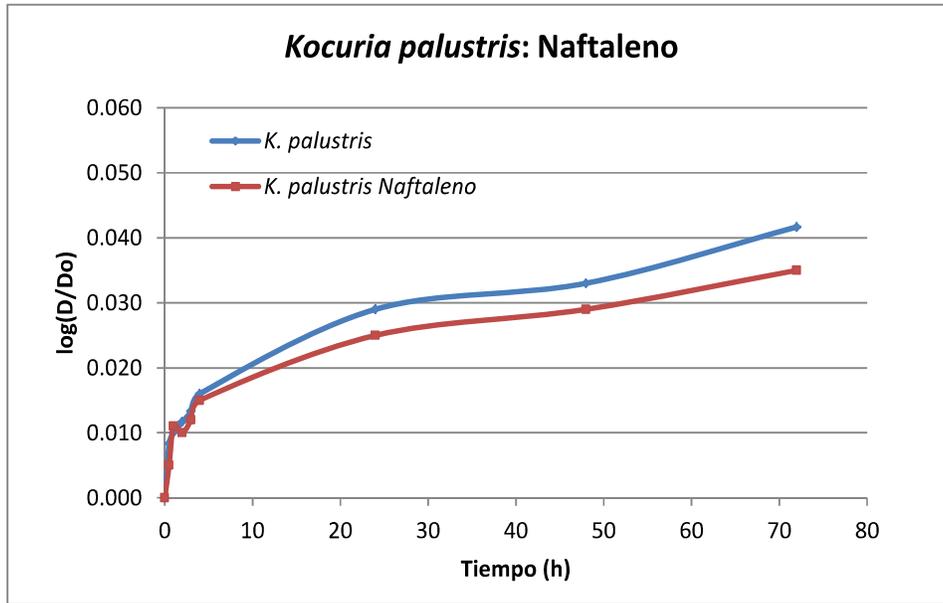


Figura 12. Curva de crecimiento de *Kocuria palustris* en el MSM-3%NaCl suplementado y sin suplementar con naftaleno.

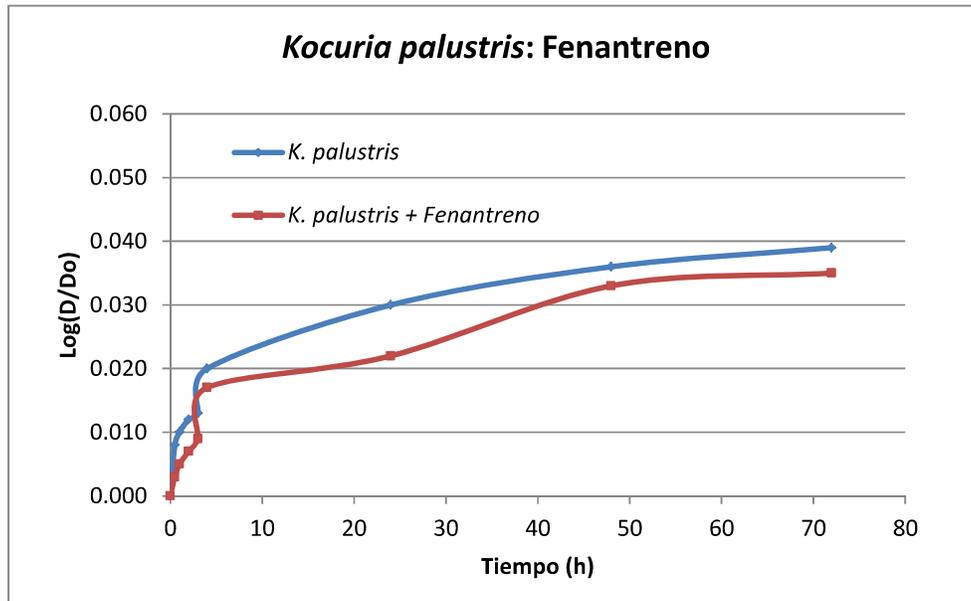


Figura 13. Curva de crecimiento de *Kocuria palustris* en el MSM-3%NaCl suplementado y sin suplementar con fenantreno.

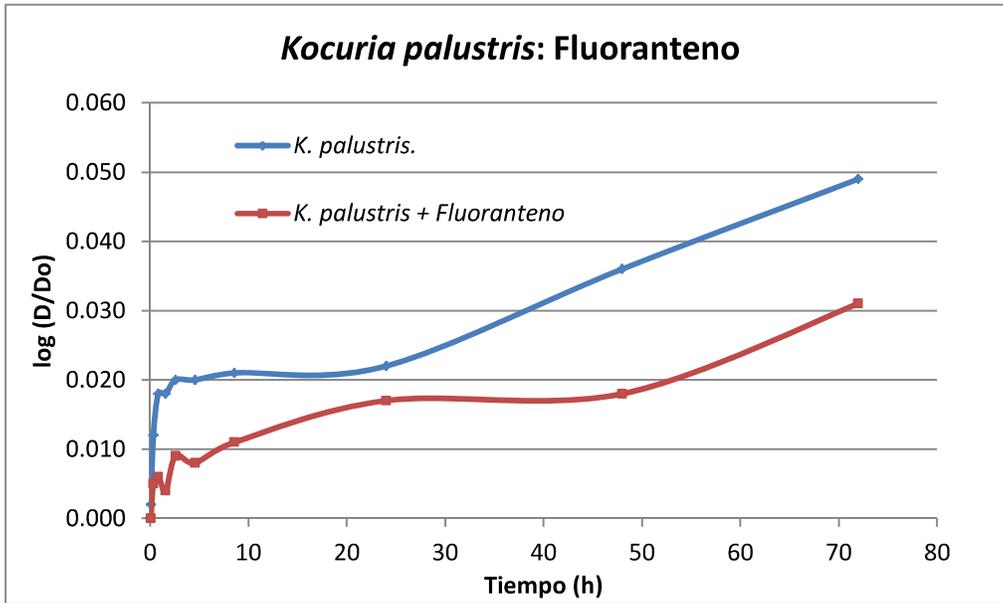


Figura 14. Curva de crecimiento de *Kocuria palustris* en el MSM-3%NaCl suplementado y sin suplementar con fluoranteno.

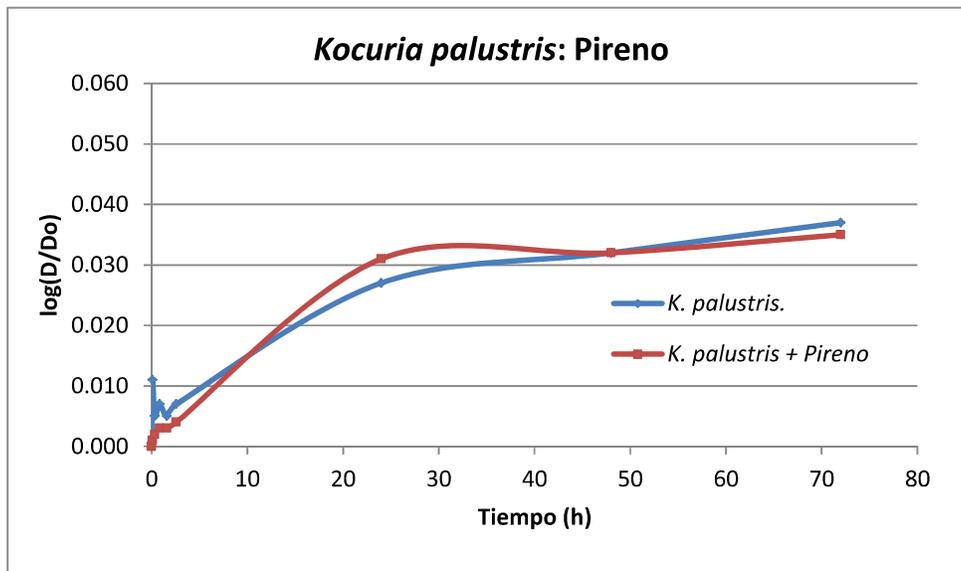


Figura 15. Curva de crecimiento de *Kocuria palustris* en el MSM-3%NaCl suplementado y sin suplementar con pireno.

Los resultados obtenidos para cada cepa se muestran en la figuras 4-15. Las figuras se construyeron con el promedio de 3 lecturas por puntos, obtenidas a partir de 3

cultivos independientes, las barras de error no se muestran en las figuras por estética de las mismas, pero las variaciones se mantuvieron en todos los casos menores al 10%.

Las figuras muestran que todas las cepas fueron capaces de crecer en el medio MSM suplementado con hidrocarburo, resultado que corrobora la tolerancia a estos hidrocarburos previamente mostrada en las tablas 7-9. La forma de las curvas de crecimiento en los medios con HPA es muy similar a la forma de las curvas cuando crecen sin hidrocarburo. Vale recalcar el hecho que el número de bacterias inoculadas en cada caso era equivalente ($1 \text{ mL de DO}_{600 \text{ nm}} = 0.25$). Sin embargo, en ningún caso las curvas con hidrocarburo logran alcanzar valores superiores a las curvas sin hidrocarburos. Este hecho indica que las cepas toleran a estos hidrocarburos pero no los consumen, pues el crecimiento no supera al del cultivo sembrado en ausencia de fuente de carbono y, en la mayoría de los casos, este se ve inhibido en cierto grado.

Si las cepas no consumen a estos hidrocarburos, entonces el crecimiento de estas en el MSM (independientemente de que contenga o no hidrocarburo) se debe a la acumulación de fuentes de carbono que reservaron mientras estuvieron en el medio nutritivo MH, en el cual se encontraban antes de ser inoculadas en el MSM.

El comportamiento de estas cepas fue totalmente diferente al descrito por Lara-Severino y col [9-11] al inocular a las mismas cepas en medio MSM suplementado con antraceno. En ese caso, las curvas de crecimiento en el medio MSM con antraceno alcanzaban valores de $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ mayores que los del cultivo sin antraceno, por lo que era un buen indicio de que las cepas consumían al antraceno, hecho que luego fue comprobado determinando la concentración de antraceno residual por fluorescencia y corroborado mediante estudios de FT-IR [9-10].

En todos los casos, tanto con y sin hidrocarburo, a las 24 h se había alcanzado la fase estacionaria. Este resultado sí concuerda con lo que anteriormente había sido reportado por Lara-Severino y col [9-11]).

5.5. Determinación de la concentración residual de fenantreno, fluoranteno y pireno en cultivos de *Kocuria rosea*, *Kocuria palustris* y *Microbacterium testaceum*.

Al igual que el trabajo previo de Lara-Severino y col [9-11], en este trabajo se inocularon las cepas en MSM por dos razones. Una, para obligarlas a consumir los hidrocarburos en caso de que fueran capaces de metabolizarlos y dos, porque el MSM es incoloro, por lo que la autoabsorción de la luz emitida (efecto del filtro interno) y la señal blanco se minimizan durante la determinación por fluorescencia de la concentración residual de los HPA. Veamos cada hidrocarburo por separado.

Naftaleno

No fue posible evitar la pérdida del naftaleno de las muestras de cultivos bacterianos, por esta razón no se presentan los resultados de la concentración residual del mismo en el tiempo.

Fenantreno

Las figuras 16-24 muestran el comportamiento de la concentración residual de fenantreno en los cultivos bacterianos de *Kocuria rosea*, *Microbacterium testaceum* y *Kocuria palustris* determinada por fluorescencia de excitación, emisión y sincronos. Las barras de error se graficaron como %RSD y en todos los casos se obtuvieron a partir de 3 repeticiones. Las barras representadas en cada figura corresponden al valor máximo de %RSD encontrado (un valor para el control, y un valor para las muestras). En las muestras medidas por excitación y emisión, el %RSD de los controles fue ligeramente mayor que el de las muestras. En la fluorescencia sincronos ocurrió lo contrario.

Para el control MSM-3%NaCl, los valores de %RSD fueron 10% y 11% en las modalidades de excitación y emisión. En el caso del control MSM-10%NaCl estos valores fueron 9% para ambas modalidades. En la modalidad sincrónica el %RSD fue 12 para el control MSM-3%NaCl y 11 para el MSM-10%NaCl. Las dispersiones máximas de las muestras fueron las siguientes: *Kocuria rosea* (7%, 4% y 15%), *Microbacterium testaceum* (9%, 10%, 17%) y *Kocuria palustris* (5%, 6% y 18%) para las modalidades fluorescencia de excitación, emisión y sincronos respectivamente.

Las figuras 16-18 muestran particularmente los resultados obtenidos en la concentración residual de fenantreno en cultivos de *Kocuria rosea* por fluorescencia de excitación, emisión y sincronos. De manera análoga las figuras 19-21 y 22-24 muestran los resultados obtenidos con el *Microbacterium testaceum* y la *Kocuria palustris* respectivamente.

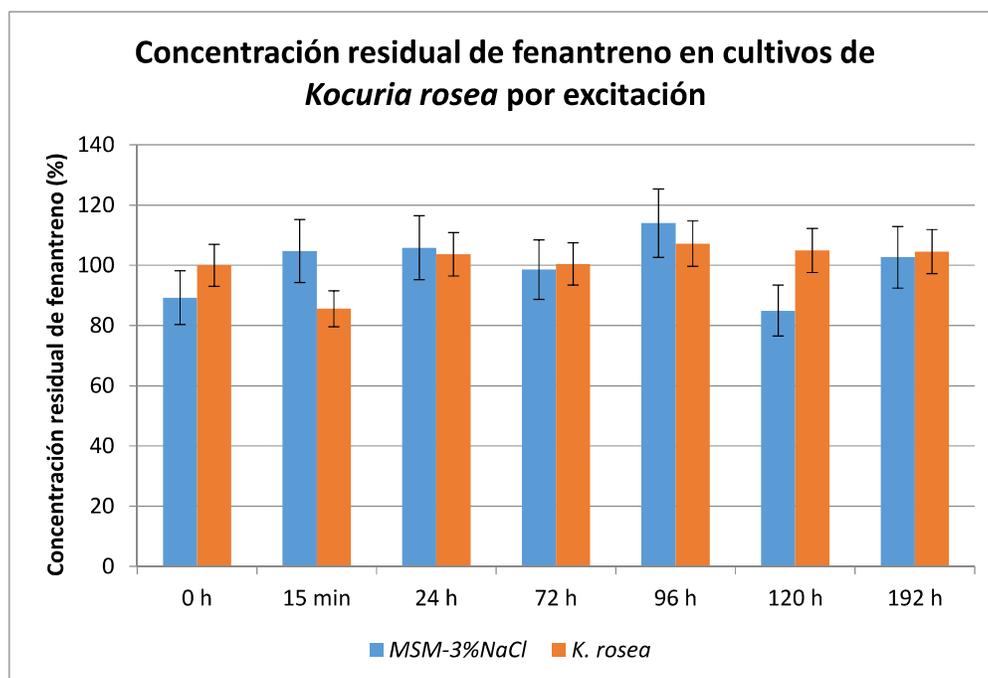


Figura 16. Concentración residual de fenantreno en medios de cultivo de *K. rosea* determinada por excitación, con $\lambda_{emi} = 363$ nm.

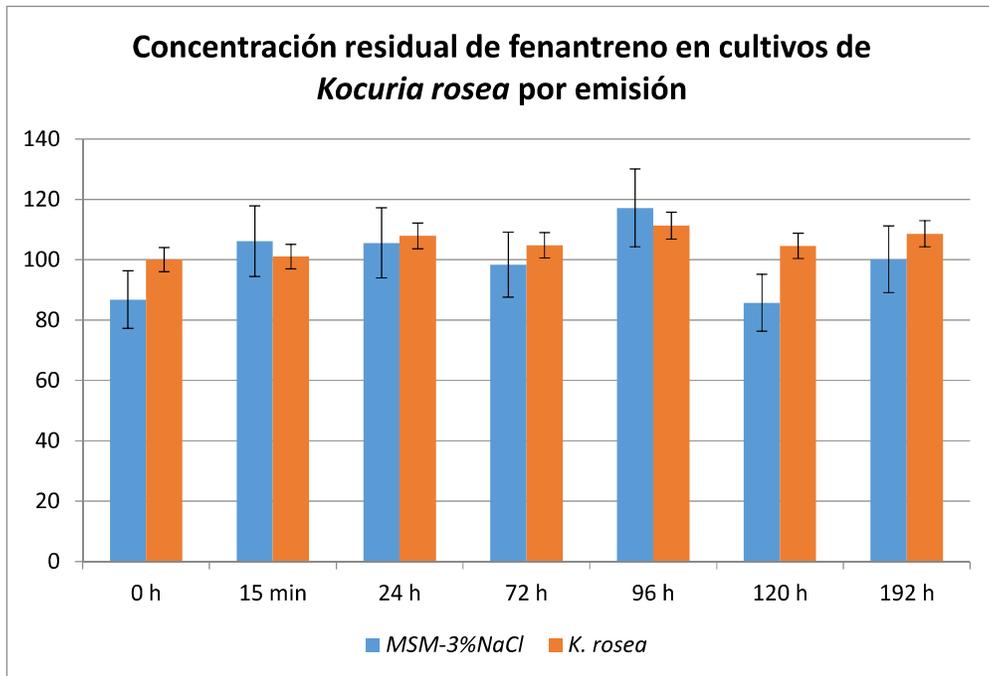


Figura 17. Concentración residual de fenantreno en medios de cultivo de *K. rosea* determinada por emisión, con $\lambda_{exc} = 252$ nm.

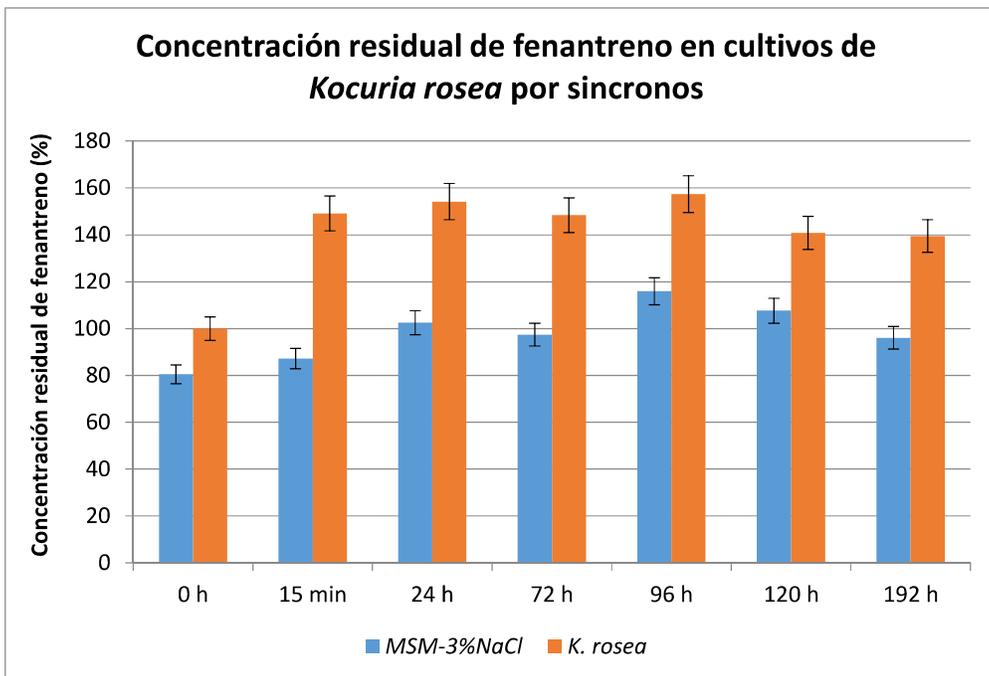


Figura 18. Concentración residual de fenantreno en medios de cultivo de *K. rosea* determinada por sincronicos, con $\Delta\lambda = 70$ nm y $\lambda_{sin} = 294$ nm.

La concentración residual de fenantreno en el cultivo de *Kocuria rosea* se mantiene constante en el tiempo cuando las muestras se miden utilizando fluorescencia de excitación o emisión. En el caso de las concentraciones determinadas por fluorescencia sincronicas se observa un aumento en la intensidad de la señal con respecto a las otras dos modalidades, pero que se estabiliza en el tiempo.

No hay diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de los controles y las muestras en las modalidades excitación y emisión ($p > 0.05$) y tampoco entre los valores de las muestras a los diferentes tiempos. En el caso de la modalidad sincronicas hay diferencias entre controles y muestras ($p < 0.05$), pero no hay diferencias entre las muestras entre sí a lo largo del tiempo. El comportamiento de las tres modalidades indica ausencia de transformación del hidrocarburo por la actinobacteria ya que la concentración residual del hidrocarburo no disminuye monótonamente como era de esperar en caso de ocurrir degradación, sino que tiene un comportamiento fluctuante. El aumento de la señal en la modalidad sincronicas se asocia a un efecto de la matriz. Se llama efecto matriz a la influencia que tienen los componentes de la muestra, diferentes al analito, sobre la señal del analito. Este efecto se evidencia ya sea incrementando o disminuyendo la señal del analito, por encima o por debajo de lo esperado. Para determinarlo cuantitativamente es necesario separar al analito de la muestra, determinar su señal aislado, y luego determinar la señal de este en la muestra sin separarlo.

La concentración residual a los 15 min en el espectro de excitación pareciera indicar una disminución de la concentración, pero esta es solo aparente, pues no es estadísticamente significativa (t-student, $p > 0.05$) con respecto al tiempo cero y porque además, el espectro de emisión indica que no hay tal cambio.

En el caso de la fluorescencia sincronicas el aumento de la concentración no puede asociarse a un aumento en la concentración del analito (pues la bacteria no produce fenantreno), y si a un efecto matriz debido a la producción de enzimas, compuestos, etc. de la bacteria en el cultivo.

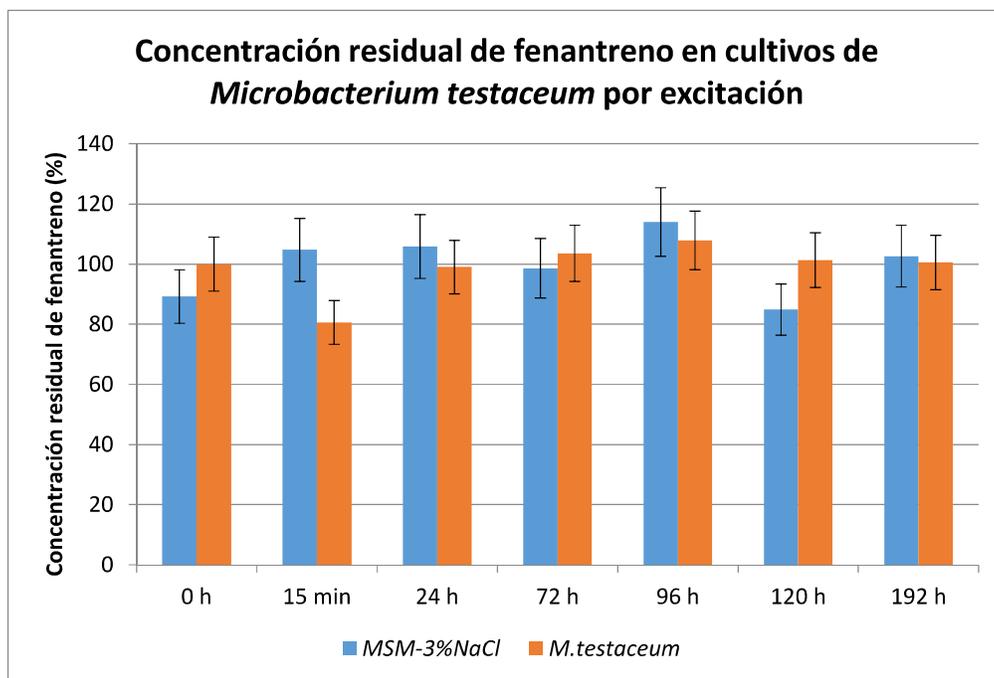


Figura 19. Concentración residual de fenantreno en medios de cultivo de *M. testaceum* determinada por excitación, con $\lambda_{emi} = 363$ nm.

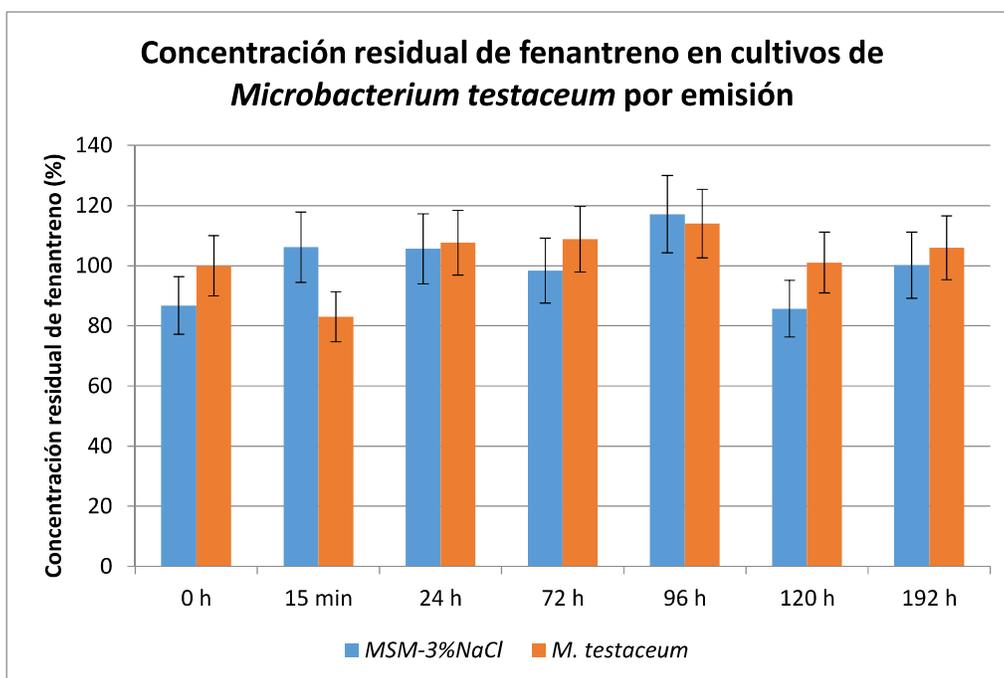


Figura 20. Concentración residual de fenantreno en medios de cultivo de *M. testaceum* determinada por emisión, con $\lambda_{exc} = 252$ nm.

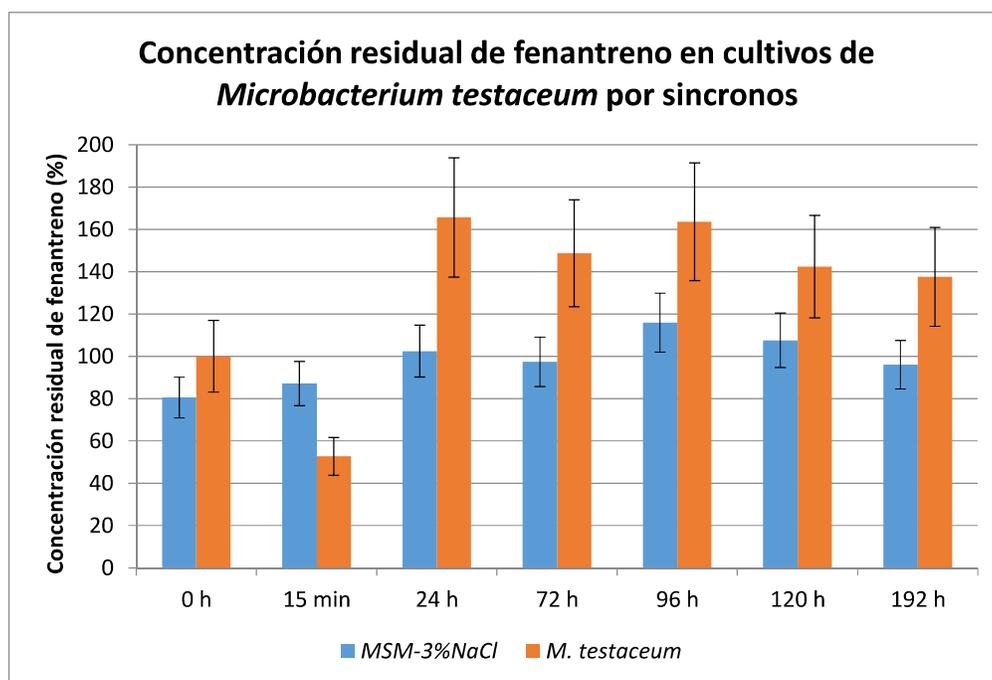


Figura 21. Concentración residual de fenantreno en medios de cultivo de *M. testaceum* determinada por sincronos, con $\Delta\lambda = 70$ nm y $\lambda_{\text{sin}} = 294$ nm.

Los resultados obtenidos en el caso del fenantreno en cultivos de *Microbacterium testaceum* son, de manera general, los mismos que los obtenidos en los cultivos de *Kocuria rosea*. La concentración residual del hidrocarburo determinada por fluorescencia de excitación y emisión se mantiene en el tiempo. No hay diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones determinadas a los diferentes tiempos por ambas modalidades, por lo que, al igual que en el caso anterior, no hay evidencias de que el fluoranteno sea biotransformado por el microorganismo.

Una vez más se evidencia un efecto matriz en la determinación de la concentración residual de este hidrocarburo por fluorescencia sincronos, pues hay diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las soluciones controles (que no presentan microorganismos) y las soluciones muestras. Sin embargo, a partir de las 24 h la señal de las muestras se estabiliza y no disminuye, por lo que tampoco hay evidencia de biotransformación.

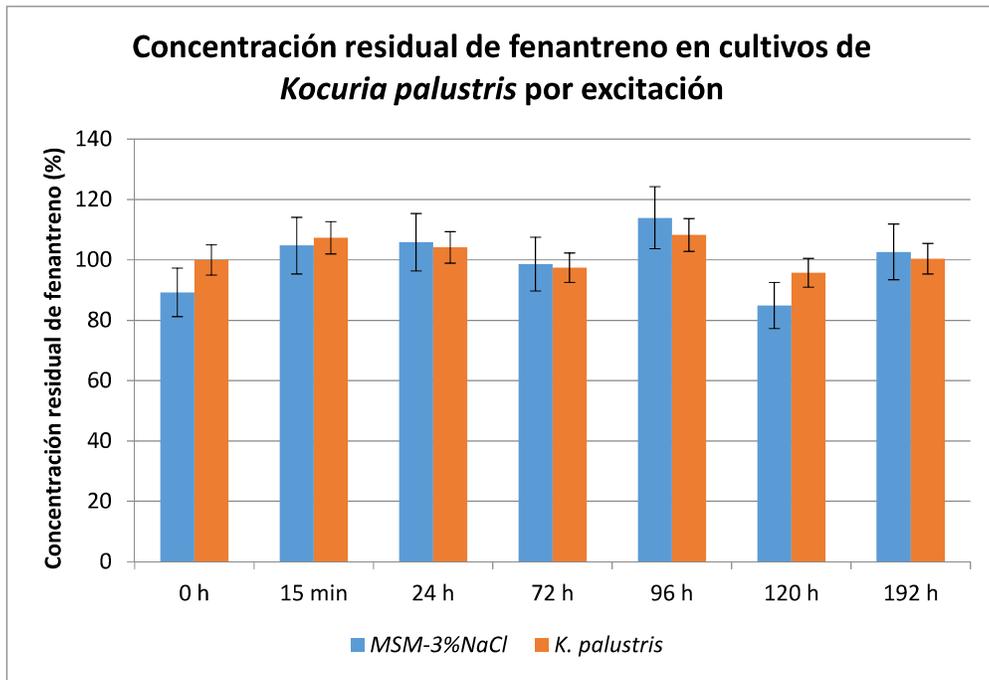


Figura 22. Concentración residual de fenantreno en medios de cultivo de *K. palustris* determinada por excitación, con $\lambda_{emi} = 363$ nm.

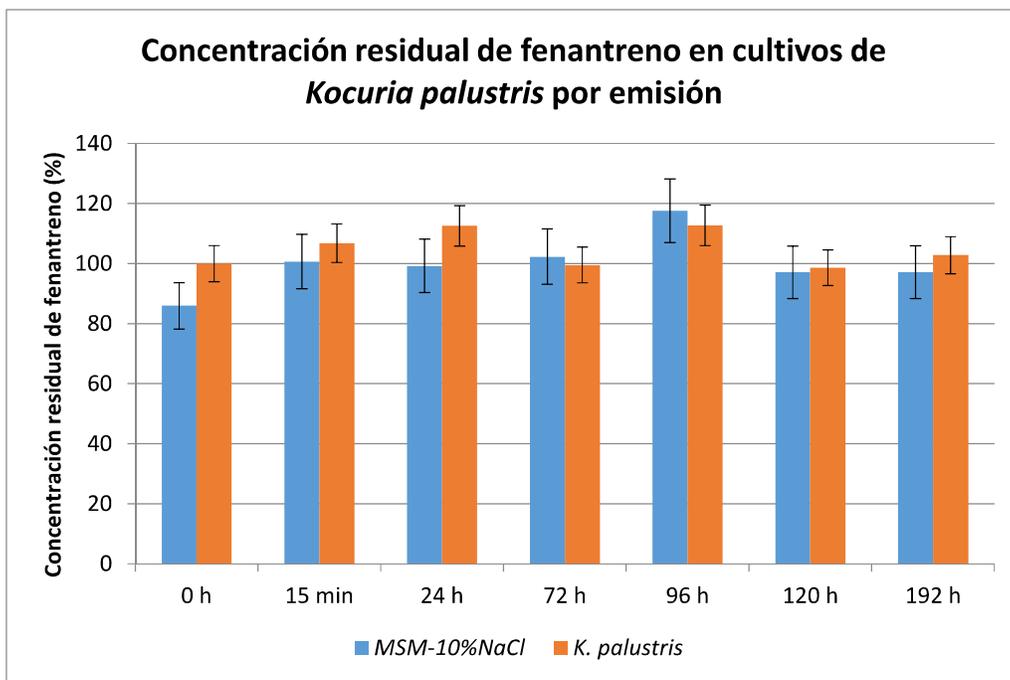


Figura 23. Concentración residual de fenantreno en medios de cultivo de *K. palustris* determinada por emisión, con $\lambda_{exc} = 252$ nm.

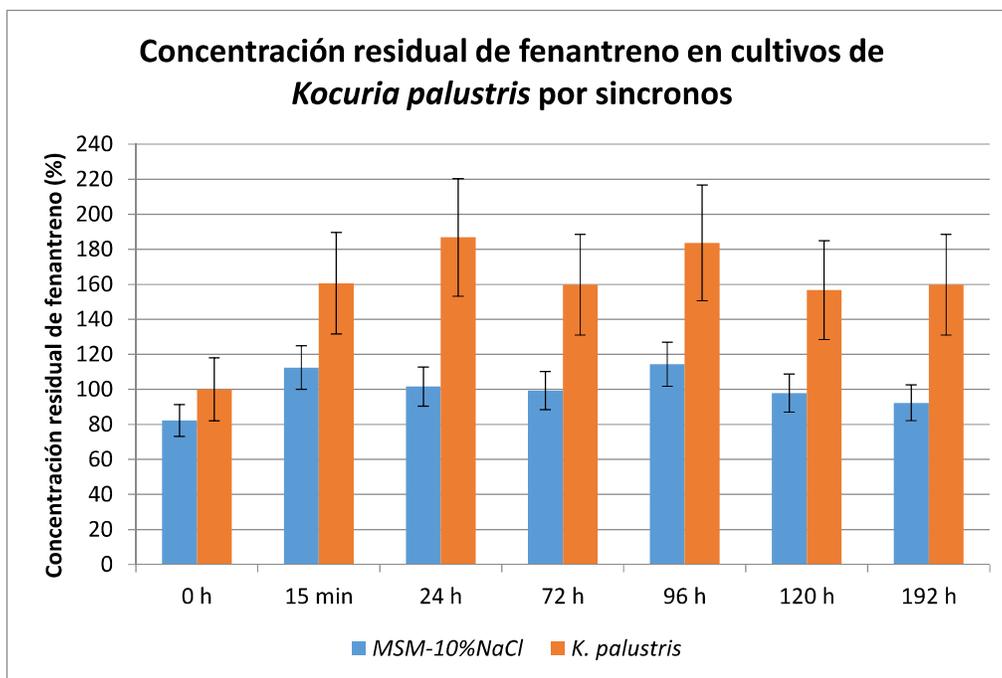


Figura 24. Concentración residual de fenantreno en medios de cultivo de *K. palustris* determinada por sincronos, con $\Delta\lambda = 70$ nm y $\lambda_{\text{sin}} = 294$ nm.

El análisis de la concentración residual en la cepa *Kocuria palustris* conlleva a los mismos resultados anteriormente descritos para las cepas *Kocuria rosea* y *Microbacterium testaceum*. No hay diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones residuales a los diferentes tiempos con respecto a la solución control en las modalidades de fluorescencia excitación y emisión. Tampoco hay diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos por las modalidades de fluorescencia excitación y emisión para un mismo tiempo, tanto en la solución control como en las muestras. Esto ocurre con los tres hidrocarburos estudiados. Por lo que se concluye que cualquiera de estas dos modalidades es adecuada para este estudio. En la fluorescencia sincronos la señal de las muestras aumenta con respecto al control pero se estabiliza en el tiempo a un valor constante. Los resultados a los que se arriban son similares a las otras dos modalidades, con la característica que en esta modalidad hay un efecto matriz. Como resultado final, se tiene que no hay evidencias que alguna de las tres cepas biotransforme al fenantreno en el tiempo de monitoreo realizado en este estudio.

Fluoranteno

Las figuras 25-33 muestran el comportamiento de la concentración residual de fluoranteno en los cultivos bacterianos de *Kocuria rosea*, *Microbacterium testaceum* y *Kocuria palustris* determinada por fluorescencia de excitación, emisión y sincronos. Al igual que en el caso anterior, las barras de error se graficaron como %RSD y en todos los casos se obtuvieron a partir de 3 repeticiones. Las barras representadas en cada figura corresponden al valor máximo de %RSD encontrado (un valor para el control, y un valor para las muestras). En las muestras medidas por excitación y emisión en medio MSM-3%NaCl, el %RSD de los controles fue ligeramente menor que el de las muestras. Lo mismo ocurrió con las muestras medidas en el medio MSM-10%NaCl por sincronos. En los otros casos, muestras medidas en medio MSM-10%NaCl por excitación y emisión y las medidas en medio MSM-3%NaCl por sincronos ocurrió al contrario.

Para el control MSM-3%NaCl, los valores de %RSD fueron 10%, 14% y 25% en las modalidades de excitación, emisión y sincronos. En el caso del control MSM-10%NaCl estos valores fueron 20%, 16% y 13%. Las dispersiones máximas de las muestras fueron las siguientes: *Kocuria rosea* (18%, 19% y 27%), *Microbacterium testaceum* (14%, 15%, 17%) y *Kocuria palustris* (14%, 9% y 22%) para las modalidades fluorescencia de excitación, emisión y sincronos respectivamente. De manera general, las concentraciones residuales determinadas por las tres modalidades de fluorescencia en cultivos de *Microbacterium testaceum* tuvieron menor precisión que las correspondientes realizadas en cultivos de *Kocuria rosea*.

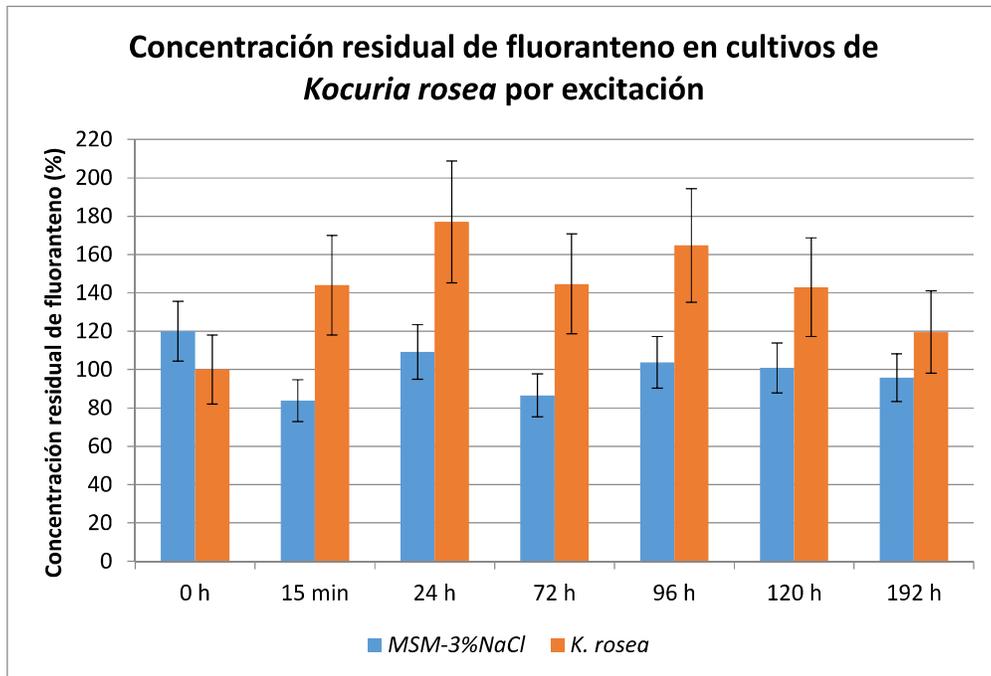


Figura 25. Concentración residual de fluoranteno en medios de cultivo de *K. rosea* determinada por excitación, con $\lambda_{emi} = 460$ nm.

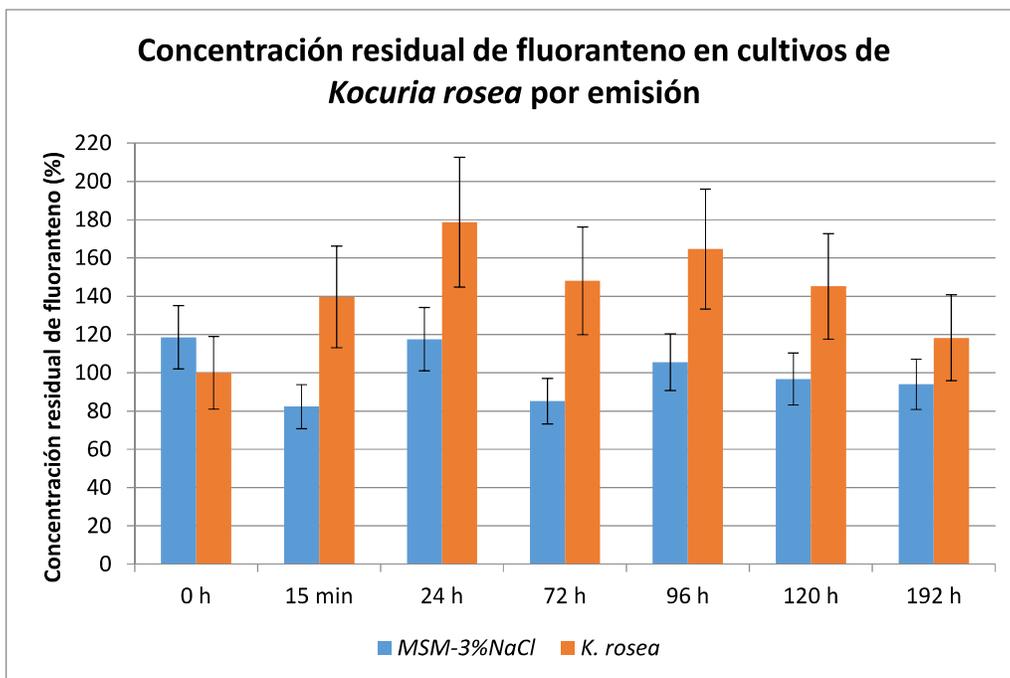


Figura 26. Concentración residual de fluoranteno en medios de cultivo de *K. rosea* determinada por emisión, con $\lambda_{exc} = 285$ nm.

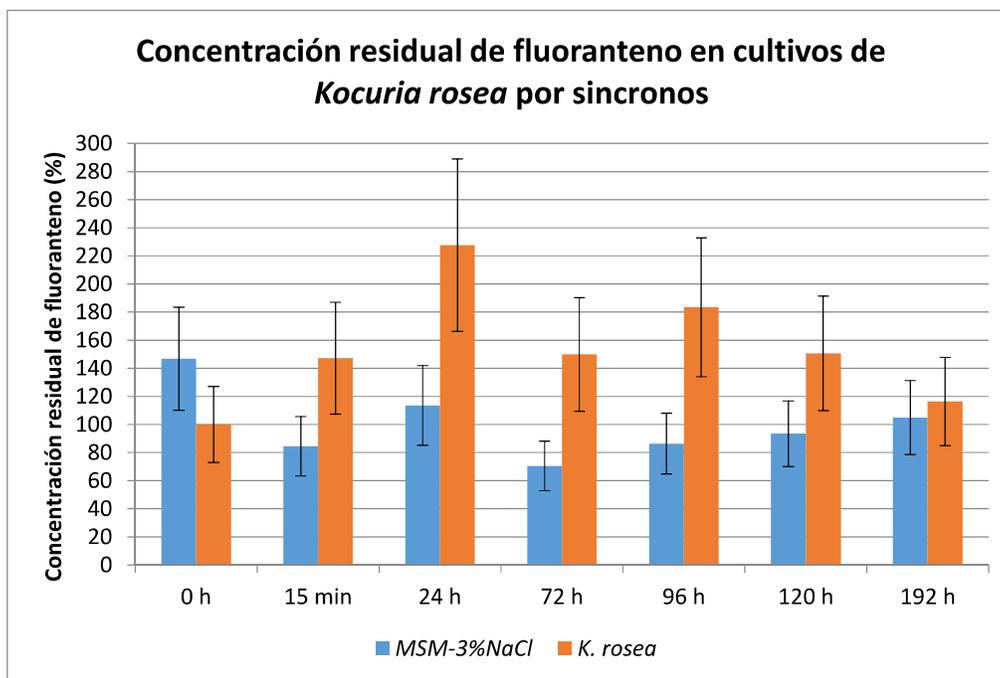


Figura 27. Concentración residual de fluoranteno en medios de cultivo de *K. rosea* determinada por sincronos, con $\Delta\lambda = 80$ nm y $\lambda_{\text{sin}} = 360$ nm.

Las figuras 25-27 muestran que en las tres modalidades de fluorescencia, la señal de la muestra se incrementó a los 15 min, alcanzando un máximo a las 24 h para luego estabilizarse a los siguientes tiempos. Como no hubo toma de muestras a las 144 h y 168 h, no se sabe el comportamiento a estos tiempos. Este resultado indica que la bacteria de manera casi inmediata reacciona en el medio cambiando sus propiedades fluorescentes y haciéndolo sensible a las condiciones del fluoranteno ($\lambda_{\text{exc}} = 285$ nm, $\lambda_{\text{emi}} = 460$ nm, $\Delta\lambda = 80$ nm, $\lambda_{\text{sin}} = 360$ nm). En esta circunstancia no es posible determinar si hay transformación del hidrocarburo por parte de la bacteria, pues la señal del blanco se incrementó considerablemente (hay un efecto matriz).

Por lo tanto, basados en este estudio, la fluorescencia de excitación, emisión y sincronos no son adecuadas para monitorear la concentración residual de fluoranteno en el cultivo de *Kocuria rosea* en MSM de la manera implementada en este trabajo. Para disminuir el efecto de la matriz (medio de cultivo) en fluorescencia, se requeriría separar al hidrocarburo (analito) del medio de cultivo (matriz) por

extracción por solvente por ejemplo, o utilizar otro método de detección y cuantificación que incluya separación química, como son los basados en cromatografía gaseosa o líquida.

A diferencia con *Kocuria rosea*, en el caso de *Microbacterium testaceum* (figuras 28-30) no hay un aumento de la señal de fluorescencia de las muestras con respecto a los controles en ninguna de las tres modalidades. De hecho, no hay diferencias estadísticamente significativas entre el control y la muestra para un mismo tiempo en las tres modalidades de fluorescencia (excepto en sincronos a tiempo 0h). Por lo tanto, para esta cepa no hay efecto matriz presente. De manera general hay una mayor precisión en las determinaciones por excitación y emisión. Como resultado, se puede concluir que no hay evidencias de que la cepa de *Microbacterium testaceum* biotransforme al fluoranteno.

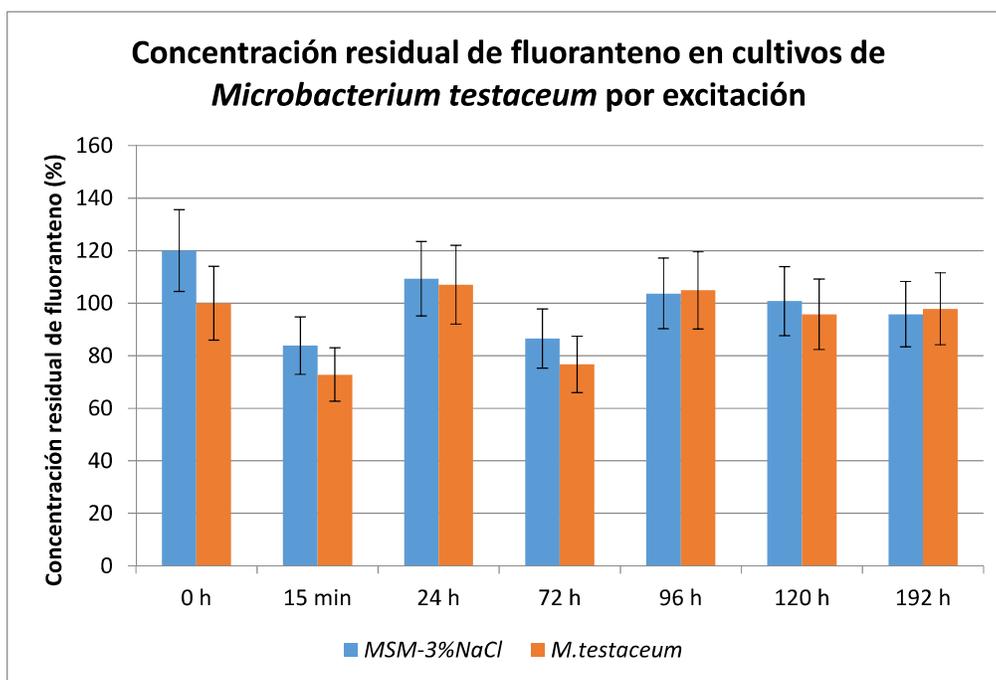


Figura 28. Concentración residual de fluoranteno en medios de cultivo de *M. testaceum* determinada por excitación, con $\lambda_{emi} = 460$ nm.

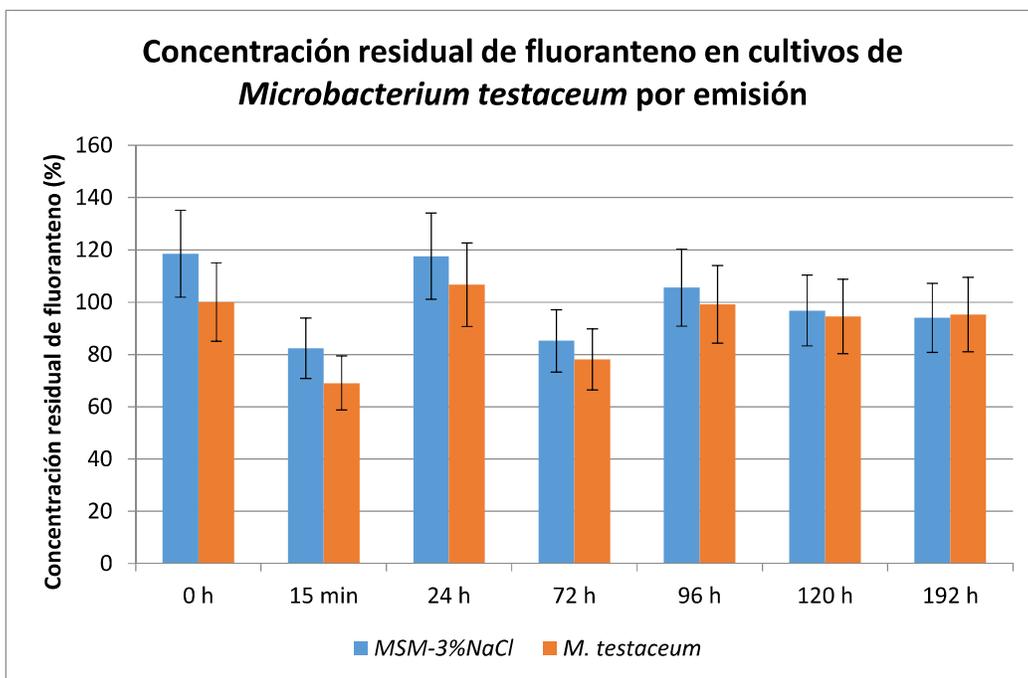


Figura 29. Concentración residual de fluoranteno en medios de cultivo de *M. testaceum* determinada por emisión, con $\lambda_{exc} = 285 \text{ nm}$

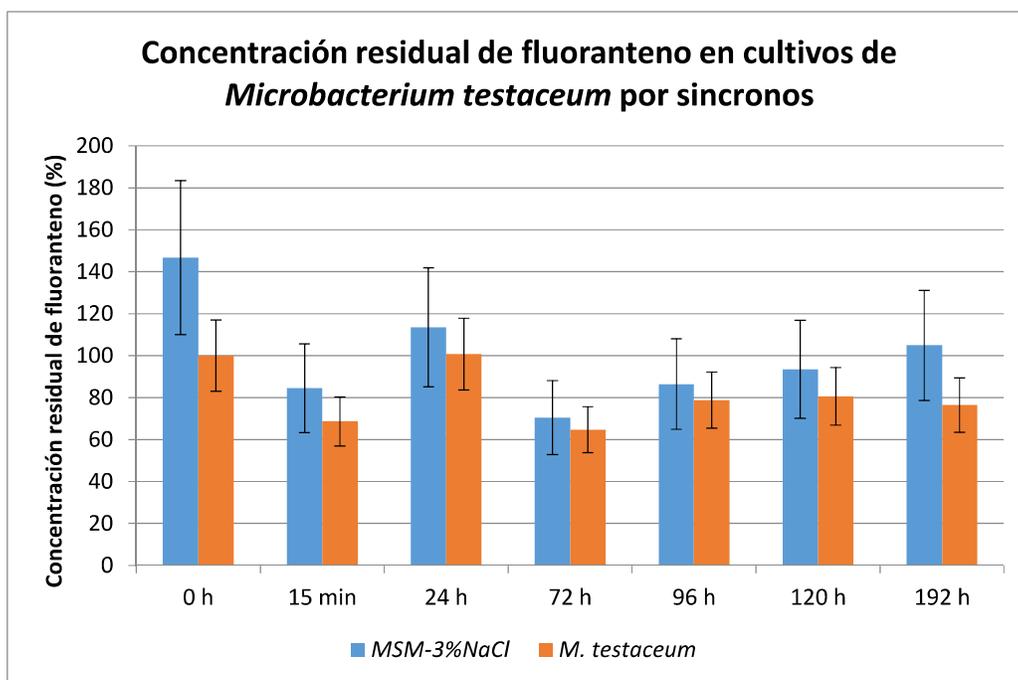


Figura 30. Concentración residual de fluoranteno en medios de cultivo de *M. testaceum* determinada por sincros, con $\Delta\lambda = 80 \text{ nm}$ y $\lambda_{sin} = 360 \text{ nm}$.

Las figuras 31-33 muestran los resultados de la determinación de la concentración residual de fluoranteno en cultivos de *Kocuria palustris* por las tres modalidades de fluorescencia empleadas en este trabajo. En ellas se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los controles y las muestras en el caso de las modalidades de excitación y emisión. Estas diferencias si existen sin embargo, en la modalidad sincronos para los tiempos 72 h, 96 h y 120 h, pero desaparecen nuevamente para el tiempo 192 h. Dado que en las tres modalidades no hay diferencias significativas entre controles y muestras a las 192 h y no hay diferencias significativas entre el tiempo 0 h y 192 h se concluye que no hay evidencias que indiquen biotransformación del hidrocarburo por las tres cepas en estudio.

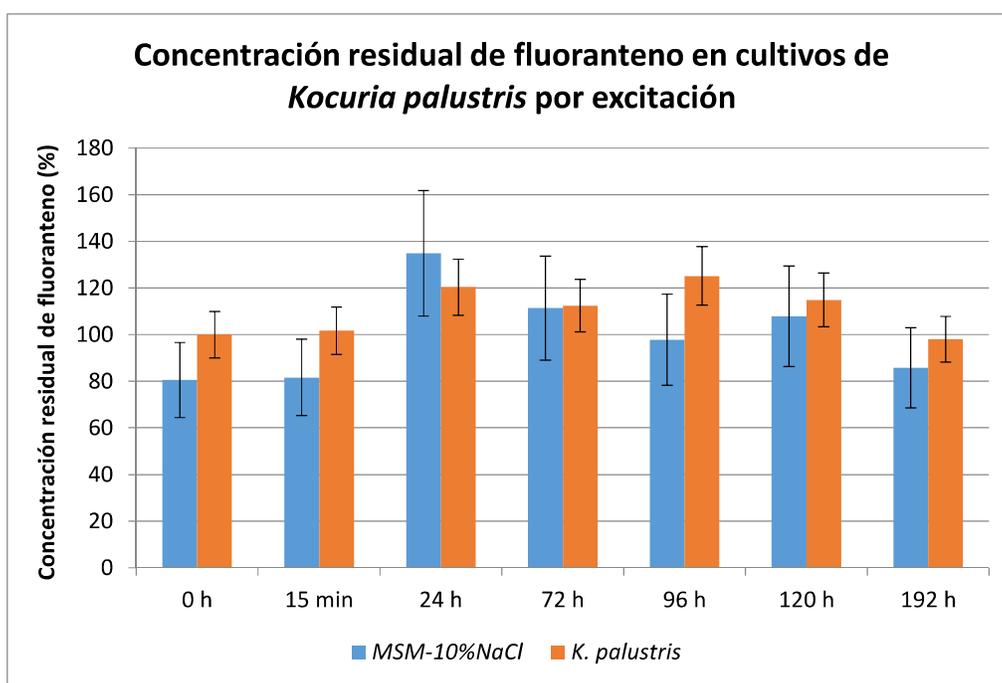


Figura 31. Concentración residual de fluoranteno en medios de cultivo de *K. palustris* determinada por excitación, con $\lambda_{emi} = 460$ nm.

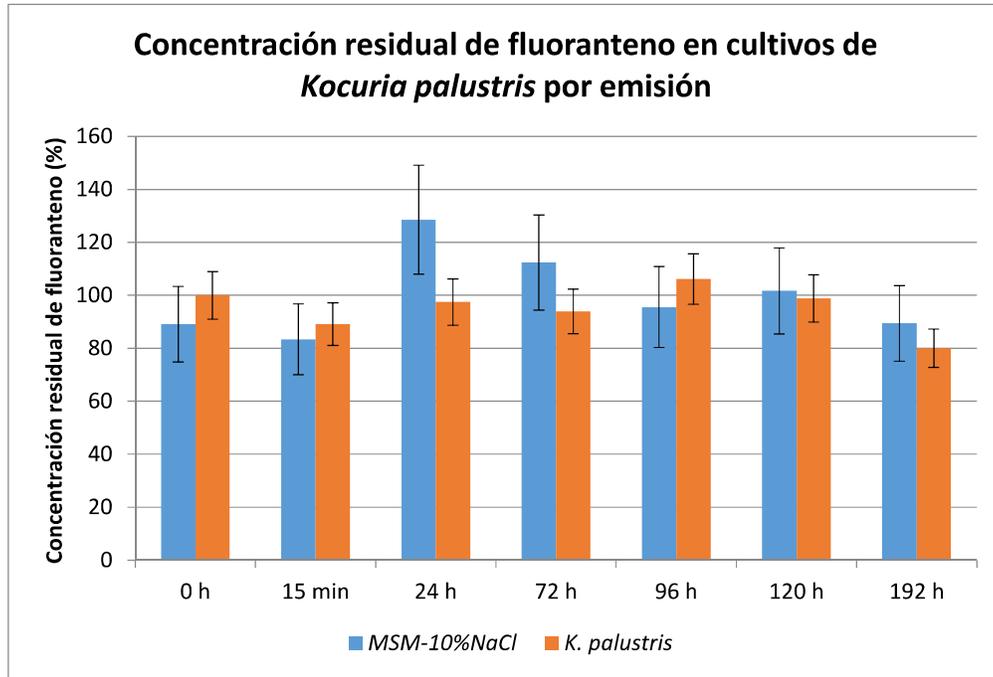


Figura 32. Concentración residual de fluoranteno en medios de cultivo de *K. palustris* determinada por emisión, con $\lambda_{exc} = 285$ nm.

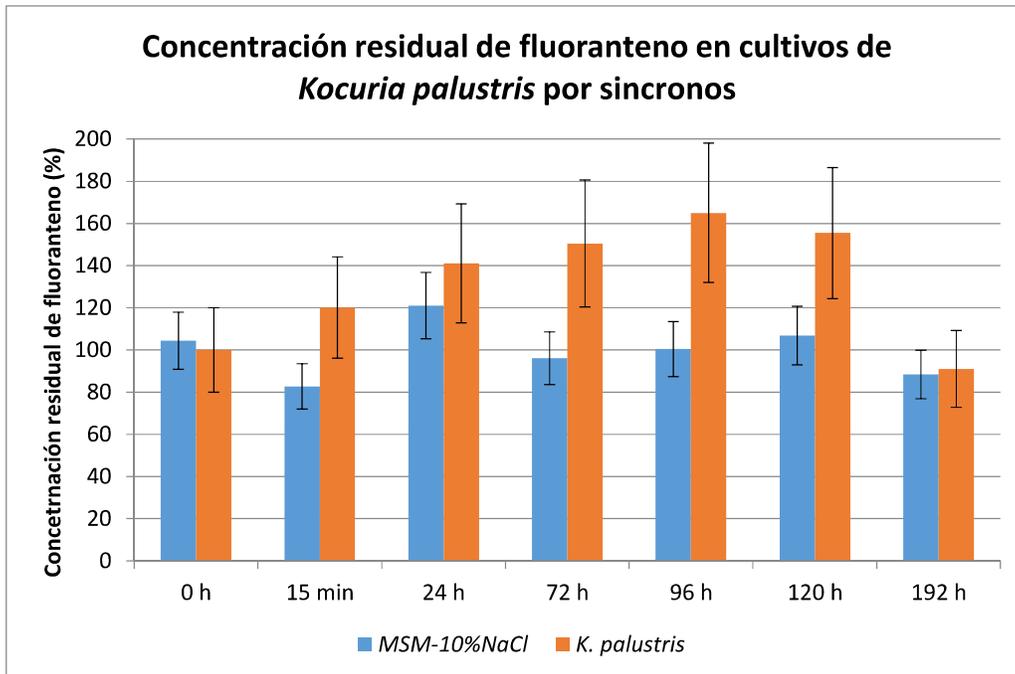


Figura 33. Concentración residual de fluoranteno en medios de cultivo de *K. palustris* determinada por sincronicos, con $\Delta\lambda = 80$ nm y $\lambda_{sin} = 360$ nm.

La concentración de fluoranteno determinada por fluorescencia sincronicos en cultivos de *Kocuria palustris* muestra la misma tendencia de las curvas de crecimiento determinadas anteriormente (figuras 4-15). Si la concentración de la muestra (barra naranja) se asocia a la actividad metabólica o capacidad de reproducción de la bacteria se obtienen resultados muy similares. Por tanto, valdría la pena estudiar si las condiciones de determinación de fluoranteno por fluorescencia sincronicos pudiera ser un método más a utilizar para determinar la curva de crecimiento de las bacterias (esto es solo una hipótesis remota).

Como conclusión se puede señalar que la fluorescencia de excitación y emisión parecen ser más adecuadas para determinar la concentración residual del fluoranteno en cultivos de *Microbacterium testaceum* y *Kocuria palustris* que la fluorescencia sincronicos, dado que esta última tiende a presentar efecto matriz. Las tres modalidades presentaron efecto matriz en la determinación de fluoranteno en cultivos de *Kocuria rosea*. En ningún caso hay evidencia de biotransformación del hidrocarburo por ninguna de las tres cepas, en ninguna de las tres modalidades de fluorescencia empleadas.

Pireno

Las figuras 34-42 muestran el comportamiento de la concentración residual de pireno en los cultivos bacterianos de *Kocuria rosea*, *Microbacterium testaceum* y *Kocuria palustris* determinada por fluorescencia de excitación, emisión y sincronicos. Al igual que en los casos anteriores, las barras de error se graficaron como %RSD y en todos los casos se obtuvieron a partir de 3 repeticiones. Las barras representadas en cada figura corresponden al valor máximo de %RSD encontrado (un valor para el control, y un valor para las muestras).

Para el control MSM-3%NaCl, los valores de %RSD fueron 12%, 7% y 7% en las modalidades de excitación, emisión y sincronicos. En el caso del control MSM-10%NaCl estos valores fueron 13%, 16% y 4%. Las dispersiones máximas de las muestras fueron las siguientes: *Kocuria rosea* (10%, 8% y 15%), *Microbacterium*

testaceum (10%, 10%, 15%) y *Kocuria palustris* (11%, 19% y 7%) para las modalidades fluorescencia de excitación, emisión y sincronos respectivamente.

Las figuras 34-36 muestran los resultados obtenidos en los cultivos de *Kocuria rosea*. Los resultados obtenidos por las tres modalidades de fluorescencia empleadas coinciden. Excepto para los tiempos de 192 h (excitación y emisión) y 24 h (sincronos), no hay diferencias estadísticamente significativas entre los controles y las muestras para ningún tiempo. Incluso, no hay diferencias estadísticamente significativas entre las tres modalidades empleadas para la mayoría de los tiempos. Hay una ligera tendencia a que la concentración residual de pireno sea mayor en las muestras que en los controles en las modalidades de excitación y emisión. Esto pudiera atribuírsele a un efecto matriz, sin embargo esto necesita ser comprobado. No hay una disminución estadísticamente significativa de la concentración residual de pireno, por tanto no hay evidencias de que este hidrocarburo sea transformado por el microorganismo.

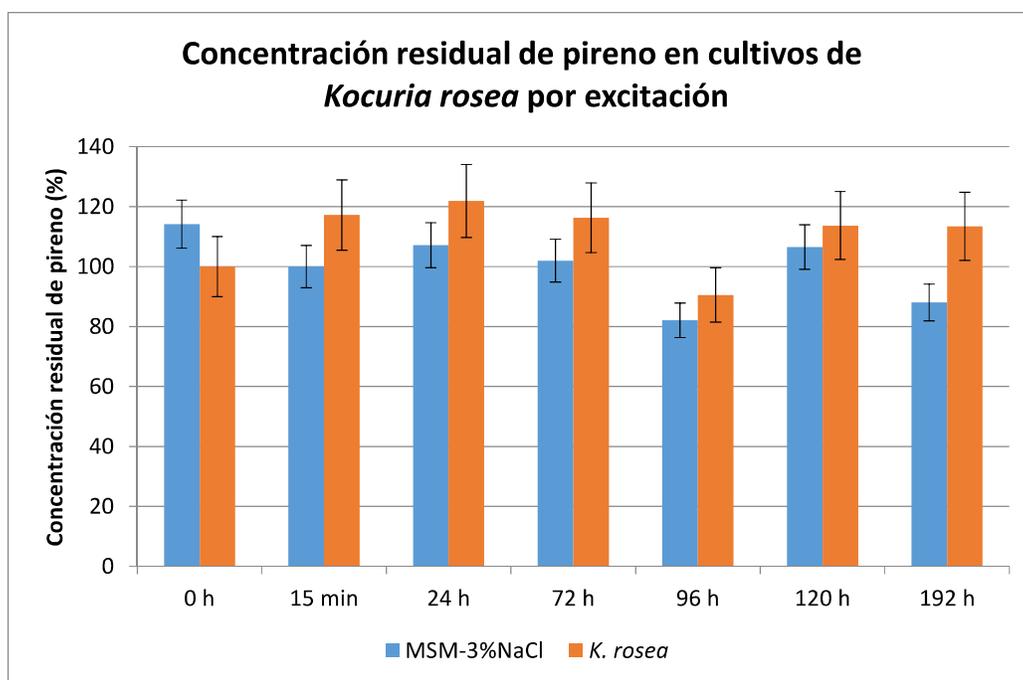


Figura 34. Concentración residual de pireno en medios de cultivo de *K. rosea* determinada por excitación, con $\lambda_{emi} = 393$ nm.

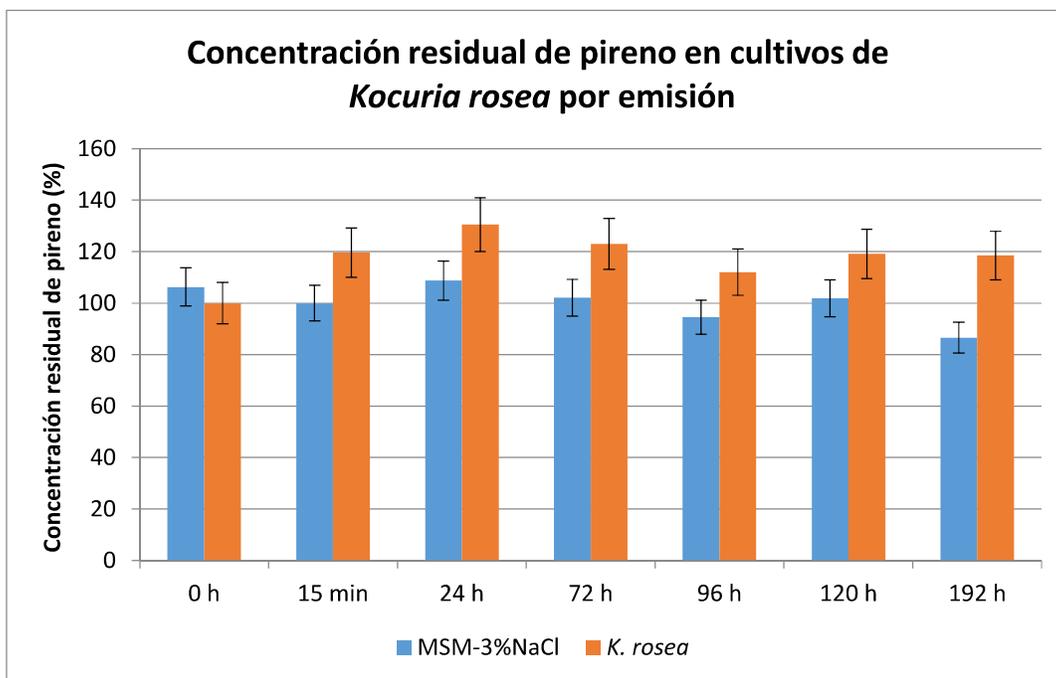


Figura 35. Concentración residual de pireno en medios de cultivo de *K. rosea* determinada por emisión, con $\lambda_{exc} = 334$ nm.

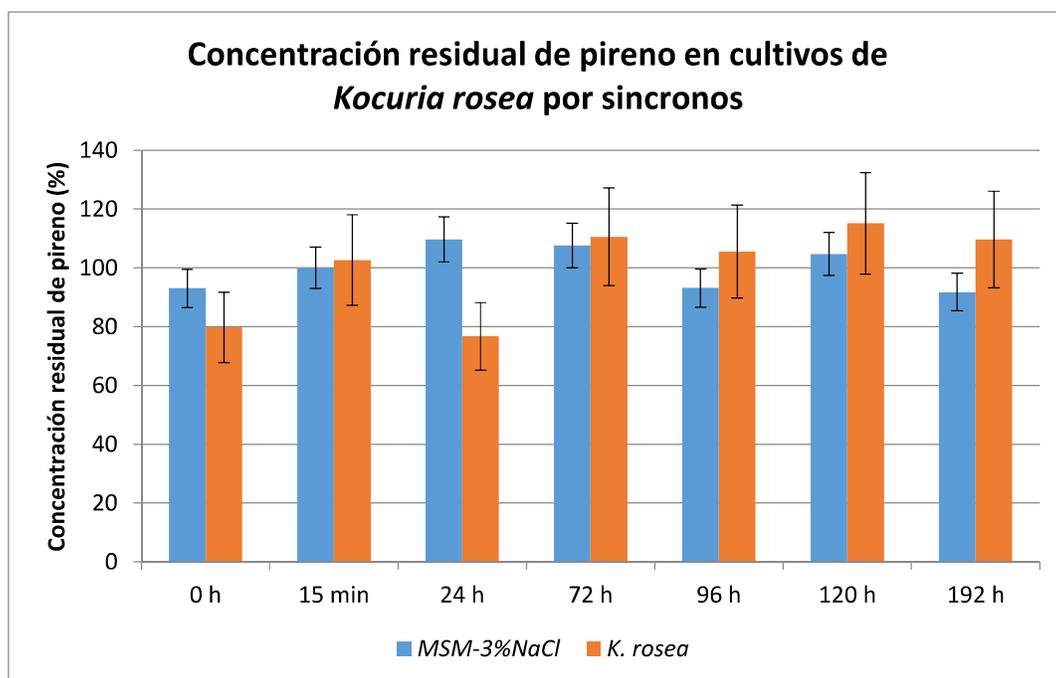


Figura 36. Concentración residual de pireno en medios de cultivo de *K. rosea* determinada por sincronicos, con $\Delta\lambda = 40$ nm y $\lambda_{sinc} = 334$ nm.

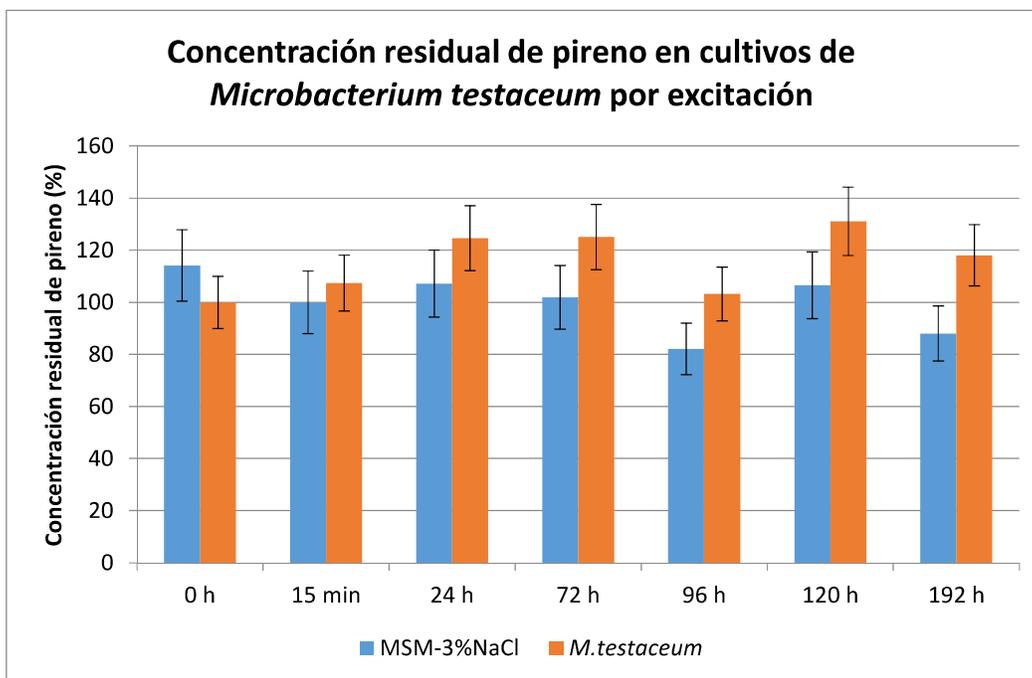


Figura 37. Concentración residual de pireno en medios de cultivo de *M. testaceum* determinada por excitación, con $\lambda_{emi} = 393$ nm.

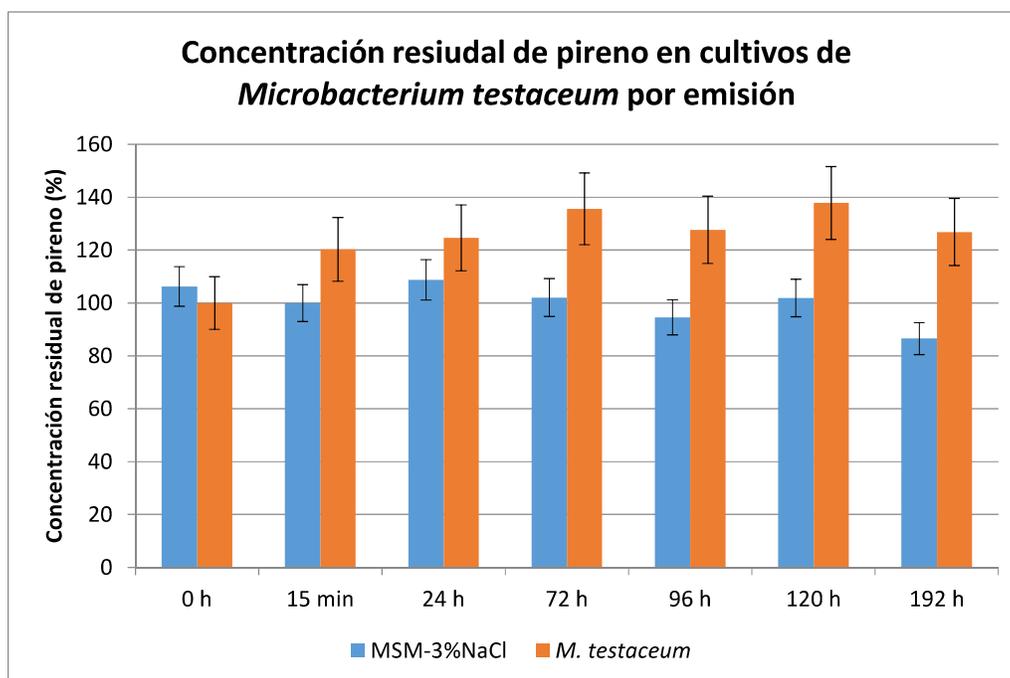


Figura 38. Concentración residual de pireno en medios de cultivo de *M. testaceum* determinada por emisión, con $\lambda_{exc} = 334$ nm.

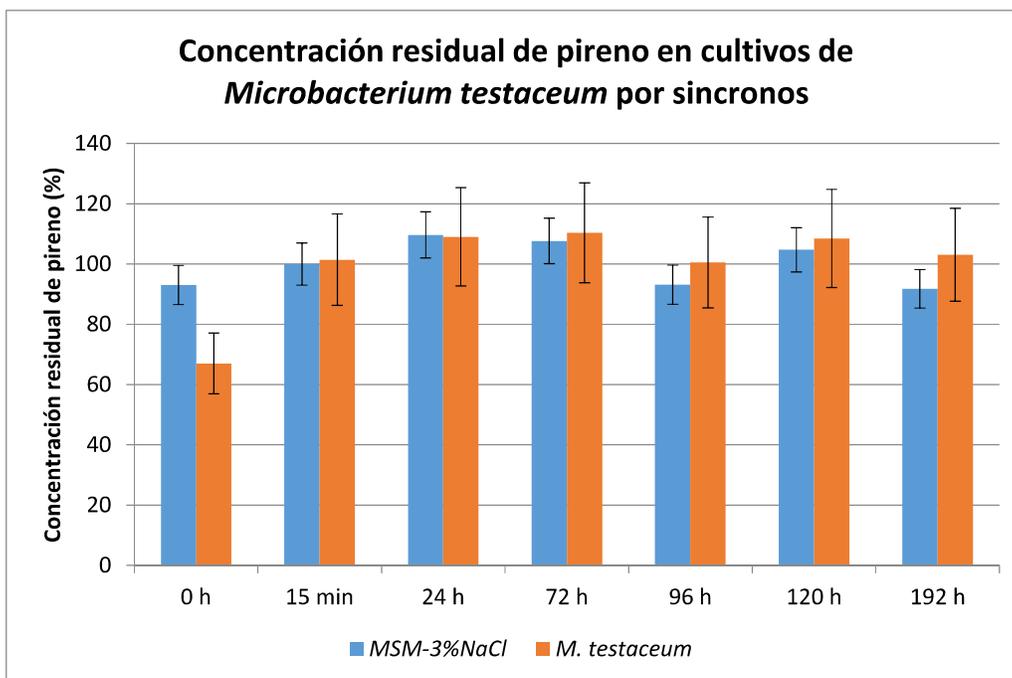


Figura 39. Concentración residual de pireno en medios de cultivo de *M. testaceum* determinada por sincronos, con $\Delta\lambda = 40$ nm y $\lambda_{\text{sin}} = 334$ nm.

En el caso de *Microbacterium testaceum*, los resultados obtenidos son iguales que los obtenidos con *Kocuria palustris*. La diferencia más notable es que en este caso la diferencia entre controles y muestras en fluorescencia de emisión es más marcada, por lo que se le atribuye a un efecto matriz. Las tres modalidades arrojan resultados similares mostrando que no hay evidencias de que este hidrocarburo sea biotransformado por el microorganismo.

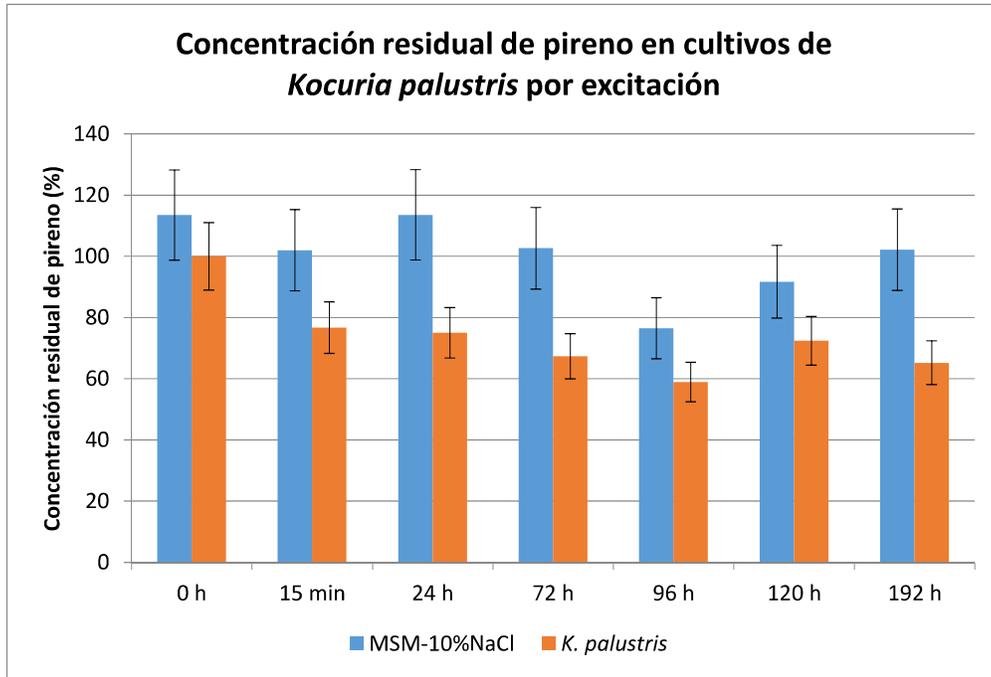


Figura 40. Concentración residual de pireno en medios de cultivo de *K. palustris* determinada por excitación, con $\lambda_{emi} = 393$ nm.

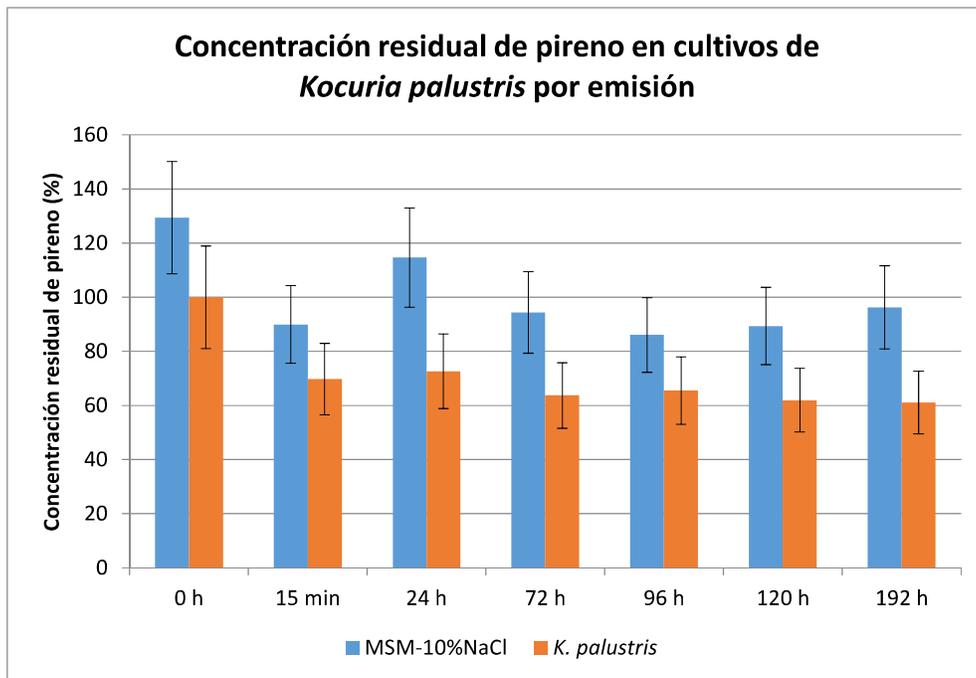


Figura 41. Concentración residual de pireno en medios de cultivo de *K. palustris* determinada por emisión, con $\lambda_{exc} = 334$ nm.

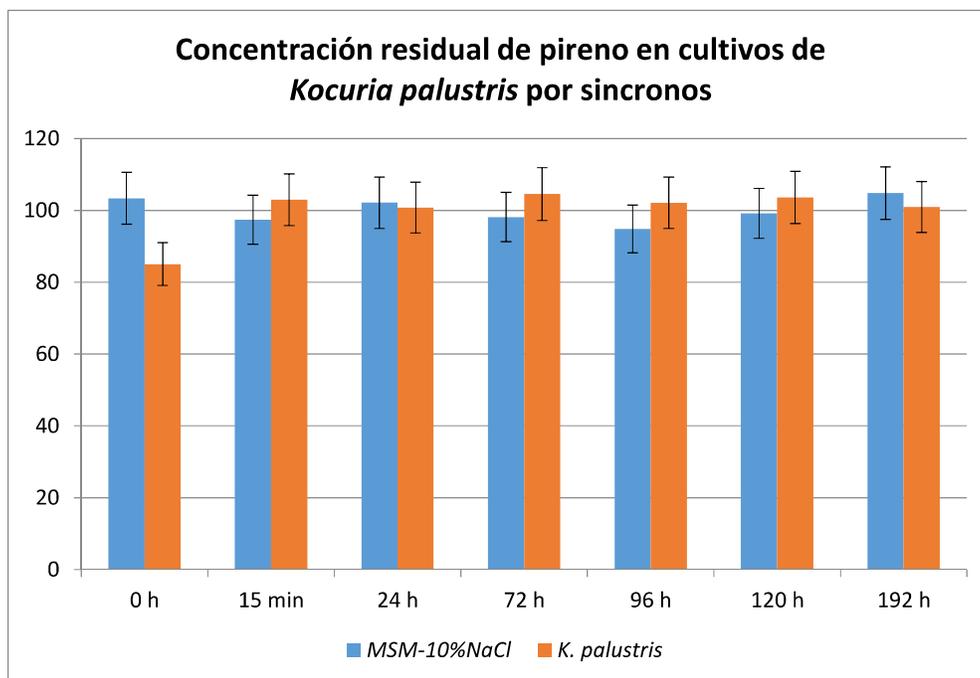


Figura 42. Concentración residual de pireno en medios de cultivo de *K. palustris* determinada por sincronos, con $\Delta\lambda = 40$ nm y $\lambda_{\text{sin}} = 334$ nm.

Las figuras 40-42 muestran los resultados obtenidos en el caso de la *Kocuria palustris*. En este caso, y a diferencia de todos los demás, en las modalidades de excitación y emisión hay una disminución de la concentración residual de pireno en el tiempo con respecto a los controles. Aparentemente hay un proceso de biotransformación, pero el mismo fue descartado por las siguientes razones: (i) la concentración disminuye a los 15 min y se estabiliza en ese valor, no continúa disminuyendo. Esto no es consistente con una biotransformación continua en el medio; (ii) este comportamiento solo se observa en las modalidades excitación y emisión pero no en sincronos.

El comportamiento anterior se puede asociar o a un efecto matriz (que en lugar de incrementar la señal del analito como en los casos anteriores la disminuye), o a un efecto de adsorción del hidrocarburo en la pared celular del microorganismo. El pireno es el más hidrofóbico de los hidrocarburos estudiados, por lo que explicaría por qué el efecto se ve en el pireno y no en los demás hidrocarburos. La composición hidrófoba de la membrana celular de la *Kocuria palustris* es un 32% [78]. Sin

embargo, al no observarse tal efecto en la modalidad sincronos, lo más probable es que sea un efecto matriz. La conclusión en este caso, es que tampoco hay evidencias que indiquen que el hidrocarburo está siendo biotransformado por el microorganismo.

Proliferación bacteriana de los cultivos suplementados con hidrocarburos

En todos los casos, luego de extraer muestras del sobrenadante del cultivo bacteriano suplementado con hidrocarburo para determinar la concentración residual del mismo, una alícuota del medio fue inoculada en el medio MH sólido correspondiente (utilizando la técnica de estría), a fin de determinar si había crecimiento bacteriano. Las tablas 10-12 muestran los resultados del crecimiento observado a las 24 h de inoculadas en el medio nutritivo MH.

Tabla 10. Proliferación bacteriana a las 24 h de *Kocuria rosea* proveniente de cultivos suplementados con 0.5 mg/L de HPA a varios tiempos.

Tiempo	<i>Kocuria rosea</i>		
	Fenantreno	Fluoranteno	Pireno
0 h	++++	++++	++++
15 min	++++	++++	++++
24 h	++++	++++	++++
72 h	+++	++++	+++
96 h	+++	++++	+++
120 h	++	++	++
192 h	+	+	+

Tabla 11. Proliferación bacteriana a las 24 h de *Microbacterium testaceum* proveniente de cultivos suplementados con 0.5 mg/L de HPA a varios tiempos.

Tiempo	<i>Microbacterium testaceum</i>		
	Fenantreno	Fluoranteno	Pireno
0 h	++++	++++	++++
15 min	++++	++++	++++
24 h	++++	++++	++++
72 h	+++	+++	+++
96 h	+++	+++	+++
120 h	++	++	++
192 h	+	+	+

Tabla 12. Proliferación bacteriana a las 24 h de *Kocuria palustris* proveniente de cultivos suplementados con 0.5 mg/L de HPA a varios tiempos.

Tiempo	<i>Kocuria palustris</i>		
	Fenantreno	Fluoranteno	Pireno
0 h	++++	++++	++++
15 min	++++	++++	++++
24 h	++++	++++	++++
72 h	+++	+++	+++
96 h	+++	+++	+++
120 h	++	++	++
192 h	+	+	+

Las tablas muestran que aun después de una semana de inoculadas en el medio MSM carente de fuente de carbono y energía, las cepas son capaces de proliferar. La capacidad proliferativa evidentemente va disminuyendo con el aumento del tiempo de inoculación en el medio (y con el tiempo de no consumir fuente de carbono). El no consumir carbono y aun estar “vivas” es una propiedad de las bacterias, ellas son capaces de disminuir al máximo la actividad metabólica hasta llegar a hibernar, es decir a no consumir nada de energía, pero aun así están vivas. Las tablas 10-12 muestran indirectamente la disminución del metabolismo, pues la actividad metabólica es proporcional a la capacidad proliferativa.

Generalidades

Los resultados de los cuatro experimentos realizados en este trabajo coinciden entre sí, se demostró tolerancia a los hidrocarburos por parte de las cepas, esta tolerancia fue reafirmada en el experimento de curvas de crecimiento, donde se demuestra que crecen pero no consumen al hidrocarburo. El mismo resultado se obtuvo en el experimento de determinación de la concentración residual por fluorescencia, donde no hay evidencia de que las bacterias transformen al hidrocarburo y finalmente coincide con el experimento de proliferación bacteriana, donde una vez más se demuestra que las cepas son capaces de tolerar y mantenerse vivas en presencia de los hidrocarburos.

Un detalle interesante es que en el caso de la señal de fluorescencia de la concentración residual de fluoranteno en el cultivo de *Kocuria rosea*, la intensidad de la misma tiene la misma tendencia en el tiempo que la capacidad proliferativa reportada en la tabla. En un trabajo futuro podría evaluarse si la capacidad proliferativa o actividad metabólica de esta cepa pudiera monitorearse por fluorescencia.

La especie *Kocuria rosea*, previamente clasificada como del género *Micrococcus* y reclasificada dentro del género *Kocuria* [79] ha sido aislada fundamentalmente de muestras de suelo y agua. Particularmente la cepa que se estudia en este trabajo fue aislada de suelos de Veracruz cercanos a actividad petrolera [9]. En más de un trabajo se reporta su capacidad para producir biosurfactantes [11, 80], por lo que se ha propuesto como potencialmente degradadora. Amehd y col. [59] reportaron la capacidad de la *Kocuria rosea* (aislada de sedimentos y aguas cercanas a una refinería en Túnez) de crecer en presencia de naftaleno, fenantreno y fluoranteno, pero solo fue capaz de degradar al primero. Sin embargo Skrikanth y col.[81] aislaron esta especie de lodos contaminados con petróleo y encontraron que si era capaz de degradar al fenantreno. Nuestros resultados concuerdan con los de Amehd, nuestra *Kocuria rosea* ya se demostró que transforma antraceno [9, 10], pero tolera al fenantreno, fluoranteno y pireno sin indicios que sea capaz de degradarlos al menos en una semana de monitoreo.

La especie *Kocuria palustris* fue originalmente aislada de la planta *Typha angustifolia*, típica de humedales [82]. Posteriormente se ha aislado de suelos de una estación de gas, de otra estación de petróleo, de muestras de agua de mar y arena de un puerto y lugares similares [83-86], demostrando su capacidad para degradar petróleo crudo. La cepa estudiada en este trabajo anteriormente había demostrado su capacidad para transformar antraceno, pero este comportamiento no se observó en el caso del fenantreno, fluoranteno y pireno en 7 días de monitoreo en este estudio. Los trabajos reportados acerca de la capacidad degradadora de esta especie han sido realizados con petróleo crudo o diesel. Excepto el trabajo con

antraceno y un esquema que aparece on-line reportando la degradación del tolueno (http://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?kpl00623), no hay trabajos reportados donde se estudie la capacidad biodegradadora de esta especie en otros HPA.

La especie *Microbacterium testaceum* fue aislada por primera vez de arrozales chinos y clasificada como *Aureobacterium genus*, pero posteriormente fue reclasificada como del género *Microbacterium* [87]. Vasconcellos y col. [88] aislaron al género *Microbacterium* de pozos de petroleros costeros reportando su capacidad de degradar dihidrofenantreno. La cepa estudiada en este trabajo demostró anteriormente su capacidad para transformar al antraceno sin embargo, hasta donde se revisó, no apareció en la literatura algún estudio similar con otro HPA. En este trabajo se estudió la capacidad de transformar fenantreno, fluoranteno y pireno pero no se encontró evidencia de alguna transformación.

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES

El objetivo principal de este trabajo se centró en la búsqueda de la capacidad transformadora de los hidrocarburos policíclicos aromáticos naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno por las cepas de actinomicetos haloalcalotolerantes *Kocuria rosea*, *Microbacterium testaceum* y *Kocuria palustris* previamente aisladas de suelos de Veracruz cercanos a áreas con alta actividad petrolera.

Los experimentos llevados a cabo demostraron que estas cepas toleran concentraciones de los hidrocarburos de hasta 1000 mg/L (0.01%). No fue posible evaluar concentraciones superiores pues el hidrocarburo precipitaba en el medio MH. Posteriormente se demostró mediante curvas de crecimiento que las cepas no consumían a los hidrocarburos cuando estos eran la única fuente de carbono y energía. Este resultado fue corroborado más tarde con la determinación de la concentración residual de los hidrocarburos en los medios de cultivo (en MSM) mediante fluorescencia de excitación, emisión y sincronos.

Los resultados de los experimentos de fluorescencia demostraron que: (i) ninguna de las tres cepas transformó al fenantreno. La concentración residual se mantuvo siempre dentro del 15% (%RSD máximo) de la variación del control, por lo que no hubo indicios de transformación del hidrocarburo en el tiempo de monitoreo (192 h). (ii) Las cepas *Kocuria palustris* y *Microbacterium testaceum* no mostraron capacidad para transformar fluoranteno, la concentración residual de este hidrocarburo en los cultivos de estas cepas se mantuvo siempre dentro del 15% (%RSD máximo) de la variación del control. En el caso de la cepa *Kocuria rosea* la concentración residual aumentó en el tiempo, este aumento se le atribuye directamente a un efecto matriz que podría estar relacionado con la actividad metabólica bacteriana; pero este efecto imposibilitó concluir si la concentración del fluoranteno aumenta o disminuye en el tiempo. (iii) Tampoco hay evidencia de que las cepas transformen al pireno. Por último, las cepas mostraron proliferación bacteriana, lo que indica que estos hidrocarburos no son tóxicos para las mismas.

Finalmente se concluye que no es posible rechazar la hipótesis nula de esta investigación, por lo que no fue posible demostrar que las cepas tuvieran capacidad para transformar los hidrocarburos. Sin embargo, si mostraron gran tolerancia a los mismos. Los resultados obtenidos de los experimentos de fluorescencia de excitación, emisión y sincronos están en concordancia con los experimentos de tolerancia a los hidrocarburos y con el de utilización de los hidrocarburos como única fuente de energía (curvas de crecimiento). A pesar que la fluorescencia no es una técnica muy utilizada en estudios de tolerancia o biodegradación de HPA, la misma parece ser muy útil para ellos, basados en estos y resultados anteriores. Una opción para establecerla como tal podrá ser validarla con técnicas más establecidas como G C-MS o HPLC.

CAPÍTULO 7: REFERENCIAS

1. Redman, A. D., McGrath, J. A., Stubblefield, W. A., Maki, A. W., Di Toro, D. M. (2012). Quantifying the concentration of crude oil microdroplets in oil–water preparations. *Environmental toxicology and chemistry*, 31(8), 1814-1822.
2. Mastral, A. M., Callen, M. S. (2000). A review on polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) emissions from energy generation. *Environmental Science & Technology*, 34(15), 3051-3057.
3. Cerniglia, C.E. (1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. En: E. Rosenberg (Ed), *Microorganisms to combat pollution* (pp. 227-244). Springer Netherlands.
4. Nam, J. J., Song, B. H., Eom, K. C., Lee, S. H., & Smith, A. (2003). Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in agricultural soils in South Korea. *Chemosphere*, 50(10), 1281-1289.
5. Parales, R. E., Haddock, J. D. (2004). Biocatalytic degradation of pollutants. *Current opinion in biotechnology*, 15(4), 374-379.
6. Das, K., Mukherjee, A. K. (2007). Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource technology*, 98(7), 1339-1345.
7. Plotnikova, E. G., Yastrebova, O. V., Anan'ina, L. N., Dorofeeva, L. V., Lysanskaya, V. Y., Demakov, V. A. (2011). Halotolerant bacteria of the genus *Arthrobacter* degrading polycyclic aromatic hydrocarbons. *Russian Journal of Ecology*, 42(6), 502-509.

8. Gerbeth, A., Krausse, S., Gemende, B., Müller, R. H. (2004). Search of microorganisms that degrade PAHs under alkaline conditions. *Engineering in life sciences*, 4(4), 311-318.
9. Lara-Severino, R. D. C., Camacho-López, M. A., Casanova-González, E., Gómez-Oliván, L. M., Sandoval-Trujillo, Á. H., Isaac-Olivé, K., & Ramírez-Durán, N. (2016). Haloalkalitolerant Actinobacteria with capacity for anthracene degradation isolated from soils close to areas with oil activity in the State of Veracruz, Mexico. *International Microbiology*, 19(1), 15-26.
10. Lara-Severino, R. D. C., Camacho-López, M. Á., García-Macedo, J. M., Gómez-Oliván, L. M., Sandoval-Trujillo, Á. H., Isaac-Olive, K., & Ramírez-Durán, N. (2016). Determination of the Residual Anthracene Concentration in Cultures of Haloalkalitolerant Actinomycetes by Excitation Fluorescence, Emission Fluorescence, and Synchronous Fluorescence: Comparative Study. *Journal of analytical methods in chemistry*, 2016.
11. Lara-Severino, R. del C., Oliván, L. M. G., Trujillo, Á. H. S., Isaac-Olive, K., Ramírez-Durán, N. (2017). Búsqueda de capacidad productora de biosurfactantes en actinobacterias haloalcalófilas y haloalcalotolerantes. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33(3), 529-539.
12. Seo, J. S., Keum, Y. S., Hu, Y., Lee, S. E., Li, Q. X. (2007). Degradation of phenanthrene by Burkholderia sp. C3: initial 1, 2-and 3, 4-dioxygenation and meta- and ortho-cleavage of naphthalene-1, 2-diol. *Biodegradation*, 18(1), 123-131.
13. Al-Awadhi, H., Al-Mailem, D., Dashti, N., Khanafer, M., Radwan, S. (2012). Indigenous hydrocarbon-utilizing bacterioflora in oil-polluted habitats in Kuwait, two decades after the greatest man-made oil spill. *Archives of microbiology*, 194(8), 689-705.

14. Bučková, M., Puškarová, A., Chovanová, K., Kraková, L., Ferianc, P., Pangallo, D. (2013). A simple strategy for investigating the diversity and hydrocarbon degradation abilities of cultivable bacteria from contaminated soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(6), 1085-1098.
15. Oren, A. (2004). Halophilic Microorganisms: Physiology and Phylogeny. In Seckbach J (ed). *Cellular Origin and Life in Extreme Habitats and Astrobiology*, In:., Kluwer Academy Publishers, pp 413-426.
16. Kushner DJ, Kamekura M (1988) Physiology of halophilic eubacteria. In: Rodríguez Valera F (ed) Halophilic bacteria, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 109-138
17. Horikoshi, K. (1999). Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*, 63(4), 735-750.
18. Nett, M., Ikeda, H., Moore, B. S. (2009). Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Natural product reports*, 26(11), 1362-1384.
19. Balachandran, C., Duraipandiyar, V., Balakrishna, K., Ignacimuthu, S. (2012). Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in *Streptomyces* sp.(ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil. *Bioresource technology*, 112, 83-90.
20. Ferradji, F. Z., Mnif, S., Badis, A., Rebbani, S., Fodil, D., Eddouaouda, K., Sayadi, S. (2014). Naphthalene and crude oil degradation by biosurfactant producing *Streptomyces* spp. isolated from Mitidja plain soil (North of Algeria). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 86, 300-308.

21. Pizzul, L., del Pilar Castillo, M., Stenström, J. (2007). Effect of rapeseed oil on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by *Rhodococcus wratislaviensis*. *International biodeterioration & biodegradation*, 59(2), 111-118.
22. International Agency for Research on Cancer (1983). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Vol. 32: Polynuclear aromatic hydrocarbons. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. World Health Organization.
23. Yang, S. Y., Connell, D. W., Hawker, D. W., Kayal, S. I. (1991). Polycyclic aromatic hydrocarbons in air, soil and vegetation in the vicinity of an urban roadway. *Science of the Total Environment*, 102, 229-240.
24. Zhou, J. L., Maskaoui, K. (2003). Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and surface sediments from Daya Bay, China. *Environmental Pollution*, 121(2), 269-281.
25. Soclo, H. H., Garrigues, P. H., Ewald, M. (2000). Origin of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coastal marine sediments: case studies in Cotonou (Benin) and Aquitaine (France) areas. *Marine pollution bulletin*, 40(5), 387-396.
26. Jones, K. C., Stratford, J. A., Waterhouse, K. S., Furlong, E. T., Giger, W., Hites, R. A., Johnston, A. E. (1989). Increases in the polynuclear aromatic hydrocarbon content of an agricultural soil over the last century. *Environmental Science & Technology*, 23(1), 95-101.
27. Saraswathy, A., Hallberg, R. (2002). Degradation of pyrene by indigenous fungi from a former gasworks site. *FEMS Microbiology Letters*, 210(2), 227-232.

28. Brandt, H. C., Watson, W. P. (2003). Monitoring human occupational and environmental exposures to polycyclic aromatic compounds. *Annals of Occupational Hygiene*, 47(5), 349-378.
29. Banat, I. M., Makkar, R. S., Cameotra, S. S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied microbiology and biotechnology*, 53(5), 495-508.
30. Albaigés, J., Morales-Nin, B., Vilas, F. (2006). The Prestige oil spill: a scientific response. *Marine Pollution Bulletin*, 53, 205-207.
31. Soto, L. A., Vázquez-Botello, A. (2013). Legal issues and scientific constraints in the environmental assessment of the Deepwater Horizon oil spill in Mexico exclusive economic zone (EEZ) in the Gulf of Mexico. *International Journal of Geosciences*, 4(05), 39.
32. Wilson, S. C., Jones, K. C. (1993). Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environmental pollution*, 81(3), 229-249.
33. Morehead, N. R., Eadie, B. J., Lake, B., Landrum, P. F., Berner, D. (1986). The sorption of PAH onto dissolved organic matter in Lake Michigan waters. *Chemosphere*, 15(4), 403-412.
34. Howard, P.H., Boethling, R.S., Jarvis, W.F., Meylan, W.M. y Michalenko, E.M. (1991). Handbook of Environmental Degradation Rates. Boca Raton Florida. E.U.A. CRC Press.
35. Chuang, J. C., Callahan, P. J., Lyu, C. W., Wilson, N. K. (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbon exposures of children in low-income families. *Journal of Exposure Analysis & Environmental Epidemiology*, 9(2), 85-98.

36. Logan, D. T. (2007). Perspective on ecotoxicology of PAHs to fish. *Human and Ecological Risk Assessment*, 13(2), 302-316.
37. Eom, I. C., Rast, C., Veber, A. M., Vasseur, P. (2007). Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. *Ecotoxicology and environmental safety*, 67(2), 190-205.
38. Johnsen, A. R., Wick, L. Y., Harms, H. (2005). Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental pollution*, 133(1), 71-84.
39. Boström, C. E., Gerde, P., Hanberg, A., Jernström, B., Johansson, C., Kyrklund, T., Westerholm, R. (2002). Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environmental health perspectives*, 110(Suppl 3), 451.
40. Kamangar, F., Strickland P.T., Pourshams, A., Malekzadeh, R., Boffetta, P., Roth, M. J., Abnet, C.C., Saadatian-Elahi, M., Rakhshani, N., Brennan, P., Etemadi, A. y Dawsey, S.M. (2005). High exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons may contribute to high risk of esophageal cancer in northeastern Iran. *Anticancer research*, 25, 425-428.
41. Germida, J.J. de Freitas, J.R. (2007). Cultural methods for soil and root-associated microorganisms. En: Carter M.R. y Gregorich E.G. (Ed), *Soil Sampling and Methods of Analysis* (pp.341-353). Boca Raton, Florida. E.U.A. CRC Press.
42. Giller, K. E., Beare, M. H., Lavelle, P., Izac, A. M., Swift, M. J. (1997). Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. *Applied soil ecology*, 6(1), 3-16.

43. Duxbury, J.M., Smith, M.S., Doran, J.W. (1989). Soil organic matter as a source and sink of plant nutrients. En: Coleman D.C., Oades J.M. y Uehara G. (Eds). *Dynamics of soil organic matter in tropical ecosystems* (pp. 33-67). Hawaii, USA. University of Hawaii.
44. Zhang, X. X., Cheng, S. P., Cheng-Jun, Z. H. U., Shi-Lei, S. U. N. (2006). Microbial PAH-Degradation in Soil: Degradation Pathways and Contributing. *Pedosphere*, 16(5), 555-565.
45. Kanaly, R. A., Harayama, S. (2000). Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of bacteriology*, 182(8), 2059-2067.
46. Ventosa, A., Nieto, J. J., Oren, A. (1998). Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(2), 504-544.
47. Rainey, F. A., Zhilina, T. N., Boulygina, E. S., Stackebrandt, E., Tourova, T. P., Zavarzin, G. A. (1995). The taxonomic status of the fermentative halophilic anaerobic bacteria: description of Haloanaerobiales ord. nov., Halobacteroidaceae fam. nov., Orenia gen. nov. and further taxonomic rearrangements at the genus and species level. *Anaerobe*, 1(4), 185-199.
48. Castillo, L., Barragán, B. (2011). Aplicaciones biotecnológicas de microorganismos halófilos. *Revista Sistemas Ambientales*, 4(2), 45-54.
49. Kumar, M., León, V., Materano, A. D. S., Ilzins, O. A. (2007). A halotolerant and thermotolerant *Bacillus* sp. degrades hydrocarbons and produces tensio-active emulsifying agent. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(2), 211-220.
50. Kumar, M., León, V., Materano, A. D. S., Ilzins, O. A., Luis, L. (2008). Biosurfactant production and hydrocarbon-degradation by halotolerant and

thermotolerant *Pseudomonas* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(7), 1047-1057.

51. Bryantseva, I. A., Gorlenko, V. M., Kompantseva, E. I., Imhoff, J. F. (2000). *Thioalkalicoccus limnaeus* gen. nov., sp. nov., a new alkaliphilic purple sulfur bacterium with bacteriochlorophyll b. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50(6), 2157-2163.

52. Sorokin, D. Y., Lysenko, A. M., Mityushina, L. L., Tourova, T. P., Jones, B. E., Rainey, F. A. Kuenen, G. J. (2001). *Thioalkalimicrobium aerophilum* gen. nov., sp. nov. and *Thioalkalimicrobium sibericum* sp. nov., and *Thioalkalivibrio versutus* gen. nov., sp. nov., *Thioalkalivibrio nitratis* sp. nov., novel and *Thioalkalivibrio denitrificans* sp. nov., novel obligately alkaliphilic and obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria from soda lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(2), 565-580.

53. Sorokin, D. Y., Tat'yana, P. T., Tat'yana, V. K., Sjollema, K. A., Kuenen, J. G. (2002). *Thioalkalispira microaerophila* gen. nov., sp. nov., a novel lithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium from a soda lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(6), 2175-2182.

54. Habe, H., Kanemitsu, M., Nomura, M., Takemura, T., Iwata, K., Nojiri, H., Yamane H. Omori, T. (2004). Isolation and characterization of an alkaliphilic bacterium utilizing pyrene as a carbon source. *Journal of bioscience and bioengineering*, 98(4), 306-308.

55. Rothschild, L. J., Mancinelli, R. L. (2001). Life in extreme environments. *nature*, 409(6823), 1092.

56. Oie, C. S., Albaugh, C. E., Peyton, B. M. (2007). Benzoate and salicylate degradation by *Halomonas campisalis*, an alkaliphilic and moderately halophilic microorganism. *Water research*, 41(6), 1235-1242.
57. Usami, R., Echigo, A., Fukushima, T., Mizuki, T., Yoshida, Y., Kamekura, M. (2007). *Alkalibacillus silvisoli* sp. nov., an alkaliphilic moderate halophile isolated from non-saline forest soil in Japan. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(4), 770-774.
58. Echigo, A., Minegishi, H., Shimane, Y., Kamekura, M., Usami, R. (2012). *Natribacillus halophilus* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic and alkalitolerant bacterium isolated from soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(2), 289-294.
59. Ahmed, R. Z., Ahmed, N., Gadd, G. M. (2010). Isolation of two *Kocuria* species capable of growing on various polycyclic aromatic hydrocarbons. *African Journal of Biotechnology*, 9(24), 3611-3617.
60. Madigan M. T., Martinko J. M, Parker J. (2003) Brock Biología de los Microorganismos. 10ª edición, Pearson Education, pp 143-145.
61. Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., Crouch, S. R. (2010). Fundamentos de Química Analítica. 8a edición. Cernage Learning Editores, S. A. de C. V. México, D. F.
62. Budzinski, H., Jones, I., Bellocq, J., Piérard, C. Garrigues, P. (1997). Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. *Marine chemistry*, 58(1-2), 85-97.
63. Luan, T., Fang, S., Zhong, Y., Lin, L., Chan, S. M., Lan, C., Tam, N. F. (2007). Determination of hydroxy metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons by fully

automated solid-phase microextraction derivatization and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1173(1), 37-43.

64. Sigvardson, K. W., Kennish, J. M., Birks, J. W. (1984). Peroxyoxalate chemiluminescence detection of polycyclic aromatic amines in liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 56(7), 1096-1102.

65. Robinson, A. y Robinson, J. F. Analisis instrumental. (2002). 1a edición en español. Pearson Prentice Hall, Madrid.

66. Ji Ji, R. D., Cooper, G. A., Booksh, K. S. (1999). Excitation-emission matrix fluorescence based determination of carbamate pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Analytica Chimica Acta*, 397(1), 61-72.

67. Miller, J. S. (1999). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by spectrofluorimetry. *Analytica chimica acta*, 388(1), 27-34.

68. Falcón, M. G., Amigo, S. G., Yusty, M. L., Lage, B. L., Lozano, J. S. (1999). Application of the effects of solvent and dissolved oxygen on the determination of benzo [a] pyrene by constant-wavelength synchronous spectrofluorimetry in smoke-flavouring. *Talanta*, 48(2), 377-384.

69. Downare, T. D., & Mullins, O. C. (1995). Visible and near-infrared fluorescence of crude oils. *Applied spectroscopy*, 49(6), 754-764.

70. Dissanayake, A., Galloway, T. S. (2004). Evaluation of fixed wavelength fluorescence and synchronous fluorescence spectrophotometry as a biomonitoring tool of environmental contamination. *Marine environmental research*, 58(2), 281-285.

71. Andrade-Eiroa A., de-Armas G., Estela J.M., Cerdà V. (2010) Critical approach to synchronous spectrofluorimetry I. *Trends in Analytical Chemistry*, 29(8), 885-901.
72. Hua, G., Killham, K., Singleton, I. (2006) Potential application of synchronous fluorescence spectroscopy to determine benzo[a]pyrene in soil extracts. *Environmental pollution*, 139, 272-278.
73. Vo-Dinh, T. (1982). Synchronous luminescence spectroscopy: methodology and applicability. *Applied Spectroscopy*, 36(5), 576-581.
74. Vo-Dinh, T., Martinez, P. R. (1981). Direct determination of selected polynuclear aromatic hydrocarbons in a coal liquefaction product by synchronous luminescence techniques. *Analytica Chimica Acta*, 125, 13-19.
75. He, L. F., Lin, D. L., & Li, Y. Q. (2004). Application and development of synchronous fluorescence spectrometry. *Progress in Chemistry*, 16(6), 879-885.
76. Lage-Yusty, M. A., Lopez-Gonzalez, J., Simal-Lozano, J. (2005). Resolution of 13 polycyclic aromatic hydrocarbons by constant-wavelength synchronous spectrofluorometry. *Analytical sciences*, 21(10), 1203-1206.
77. Sang, L. Z., Wei, X. Y., Chen, J. N., Zhu, Y. X., Zhang, Y. (2009). Simultaneous fluorimetric determination of the biodegradation processes of dissolved multi-component PAHs. *Talanta*, 78(4), 1339-1344.
78. Harshvardhan, K., Jha, B. (2013). Biodegradation of low-density polyethylene by marine bacteria from pelagic waters, Arabian Sea, India. *Marine Pollution Bulletin*, 77(1), 100-106.
79. Stackebrandt, E., Koch, C., Gvozdiak, O., Schumann, P. (1995). Taxonomic Dissection of the Genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov.,

Kytococcus gen. nov., Dermacoccus gen. nov., and Micrococcus Cohn 1872 gen. emend. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(4), 682-692.

80. Mahjoubi M., Jaouani A., Guesmi A., Amor SB., Jouini A., Cherif H., Najjari A., Boudabous A., Koubaa N., Cherif A. (2013) Hydrocarbonoclastic bacteria isolated from petroleum contaminated sites in Tunisia: isolation, identification and characterization of the biotechnological potential. *New biotechnology*, 30(6), 723-733.

81. Srikanth Reddy, M., Yusoff, Fatimah Md., Naresh, B., Devi, Prathibha. (2013) Isolation and Characterization of Marine Beneficial Bacteria from Petroleum Contaminated Sites for Better Environment of Animal Life. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8, 841-851.

82. Kovács, G., Burghardt, J., Pradella, S., Schumann, P., Stackebrandt, E., Mária Ligeti, K. (1999). *Kocuria palustris* sp. nov. and *Kocuria rhizophila* sp. nov., isolated from the rhizoplane of the narrow-leaved cattail (*Typha angustifolia*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(1), 167-173.

83. Mariano, A. P., Kataoka, A. P. D. A. G., Angelis, D. D. F. D., Bonotto, D. M. (2007). Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(2), 346-353.

84. Khalifa, A. Y. (2017). Degradation of diesel-oil by a newly isolated *Kocuria sediminis* DDK6. *African Journal of Microbiology Research*, 11(10), 400-407.

85. Megaw, J., Busetti, A., Gilmore, B. F. (2013). Isolation and characterisation of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquid-tolerant and biodegrading marine bacteria. *PloS one*, 8(4), e60806.

86. El Mahdi, A. M., Aziz, H. A., El-Gendy, N. S., Nassar, H. (2015). Performance of Isolated *Kocuria* sp. SAR1 in Light Crude Oil Biodegradation. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 6(4), 1.
87. Takeuchi, M., & Hatano, K. (1998). Union of the genera *Microbacterium* Orla-Jensen and *Aureobacterium* Collins et al. in a redefined genus *Microbacterium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(3), 739-747.
88. De Vasconcellos SP, Crespim E, Da Cruz GF, Senatore DB, Simioni KCM, Dos Santos Neto EV, Marsaioli AJ, De Oliveira VM (2009). Isolation, biodegradation ability and molecular detection of hydrocarbon degrading bacteria in petroleum samples from a Brazilian offshore basin. *Organic Geochemistry*, 40(5), 574-588.

ANEXOS

Presentaciones del trabajo en Congresos



CERTIFICATE OF ATTENDANCE

To: De la Luz Barrueta L.L., Nava Solís G., Can Ubando L.C., Camacho
López M.A., Sandoval Trujillo A.H., Isaac Olivé K., Ramírez Durán N.

For the Posterpresentation with title:

*Determination of the tolerance of haloalkaliphilic actinomycetes Kocuria rosea,
Microbacterium testaceum and Kocuria palustris to phenanthrene, fluoranthene and pyrene
aromatic polycyclic hydrocarbons by fluorescence of excitation and emission*

at the **International Symposium**
**“Extreme Ecosystems and Extremophile organisms: Biodiversity, Physiology,
Biochemistry & Biotechnology”**

September 18-20, 2017.

Prof. Ramón A. Batista García, PhD
Organizing Committee



La Asociación Mexicana de Química Analítica y la Universidad de Guanajuato otorgan la presente

CONSTANCIA

Gabriela Nava Solís, Laura Leticia de la Luz Barrueta, Ninfa Ramírez Durán, Miguel Ángel Camacho López, Ángel Horacio Sandoval Trujillo, Pablo Moreno Pérez, Miguel Ángel Káram Calderón, Eleni Mitsoura, Keila Isaac Olivé por la presentación del trabajo

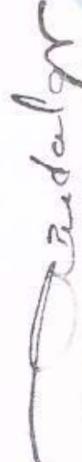
"Establecimiento de las condiciones experimentales para la determinación de fluoranteno y pireno por fluorescencia de emisión en cultivos de actinobacterias inoculadas en el medio de sales mínimo suplementado con NaCl"

durante las actividades del XXX Congreso Nacional de Química Analítica que tuvo lugar del 20 al 24 de junio de 2017 en la ciudad de León, Guanajuato

"La teoría guía, el experimento decide"
"I.M. Kolthoff"


Dra. Gabriela Vargas Martínez
Junta de Representantes AMQA


Dra. María Teresa Ramírez Silva
Presidente AMQA


Dr. Carlos Hidalgo Valadez
Rector del Campus León
de la Universidad de Guanajuato


Dr. José Antonio Reyes Aguilera
Comité Local, Campus León, UG