



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
Facultad de Ciencias Exactas
Área Ciencias Biológicas

**Obtención de inoculantes bacterianos y
evaluación de su aplicación en procesos de
biorremediación de suelos contaminados
con PAH**

Bibiana Marina Coppotelli

Trabajo de Tesis
Año 2008

1184



Lugar de trabajo:

Centro de Investigación y Desarrollo de Fermentaciones
Industriales-CINDEFI

UNLP-CONICET

Directora de Tesis:

Prof.Dra. Irma Susana Morelli

Co-Directora de Tesis

Prof. Dra Luise Berthe-Corti

A mis padres

A Diego



AGRADECIMINETOS

Quisiera agradecer a todos los cuyos aportes y recursos hicieron posible este trabajo.

En primer lugar a mi directora, la Dra. Irma Morelli, por su confianza en mí, por sus consejos, su paciencia, su continuo aliento y optimismo y por guiarme y prepararme para una futura carrera como científica.

A la Dra. Luise Berthe-Corti por su guía y su generosidad al invitarme a realizar parte de mi tesis en su laboratorio en la Universidad de Oldenburg, Alemania y por sus valiosos comentarios y discusiones sobre mi trabajo.

A ambas quisiera agradecerles por su comprensión y sensibilidad en los aspectos no científicos..... Gracias por su enorme calidad humana!!!

A mis compañeros de Laboratorio 8, especialmente a Laurita, Anita, Manuel y Diego, por ayudarme en muchas pequeñas cosas, en especial en esta última etapa.

A Agustín, compañero desde los comienzos, por su ayuda y su aliento, y por compartir todos los momentos (buenos y difíciles) en el laboratorio.

A Tere, por sus consejos en el laboratorio y por la lectura crítica de este manuscrito.

Al CONICET por haberme otorgado una beca doctoral, que posibilitó la realización de gran parte de este trabajo.

A la DAAD por haberme otorgado una beca para realizar una estadía de investigación en Alemania, que posibilitó la realización de todas las microscopías y el estudio con los biorreactores presentados en este trabajo.

Al CINDEFI por haberme permitido desarrollar la tesis en sus instalaciones.

Al Dr. Mario Arguilar, por facilitarnos la utilización de su equipo para realizar las DGGE.

Al Dr. Angel Nardillo por el tiempo dedicado a las determinaciones por Cromatografía Gaseosa de este trabajo.

A Reiner Hulsh por su generosa ayuda para resolver todas las cuestiones técnicas durante el trabajo desarrollado en la Universidad de Oldenburg.

A Ricardo por su colaboración en la construcción de los árboles de filogenia.

Al Dr. Thomas Neu por su ayuda en la realización de los análisis por microscopía láser confocal.

A mis padres por su amor y su permanente confianza en mí.

A Diego, por su amor, su apoyo y su paciencia durante el desarrollo de esta tesis.....Gracias Di !

INDICE

Índice

I. Introducción

I.A. La contaminación con PAH: un problema global.....	4
I.A.1 La contaminación del suelo con PAH.....	6
I.A.2 Biodegradación microbiana de PAH.....	7
I.A.3 Biodisponibilidad.....	9
I.B. Estrategias de biorremediación de suelos contaminados con PAH.....	10
I.C. Bioaumentación de suelos contaminados con PAH: conceptos y realidades.....	12
I.C.1 Selección de inoculantes.....	16
I.C.2 Estrategias para favorecer la biodisponibilidad.....	17
I.C.3 Importancia del efecto del inoculante sobre la comunidad bacteriana.....	20

II. Hipótesis

Objetivo general.....	22
-----------------------	----

III. Materiales y Métodos

III.A. Materiales	
III.A.1 Microorganismos.....	23
III.A.2 Medios de cultivo.....	23
III.A.3 Tierra.....	25
III.B. Metodología	
III.B.1 Aislamiento, selección y caracterización de una cepa bacteriana degradadora de PAH	
III.B.1.i Aislamiento y caracterización de cultivos puros.....	26
III.B.1.ii Determinación del espectro degradador de hidrocarburos de los cultivos aislados.....	26
III.B.1.iii Caracterización e identificación de la cepa 20006FA.....	27
III.B.1.iv Análisis de la secuencia.....	29
III.B.1.v Determinación de las propiedades metabólicas de la cepa <i>Sphingomonas paucimobilis</i> 20006FA.....	29
III.B.1.vi Determinación de las propiedades ecológicas de la cepa <i>Sphingomonas paucimobilis</i> 20006FA.....	31
III.B.2 Dinámica del proceso de biorremediación de suelos contaminados con fenantreno y estudio de los mecanismos de adhesión celular en ensayos de bioaumentación en biorreactores	
III.B.2.i Preparación de biorreactores de suelo.....	35
III.B.2.ii Preparación del inóculo.....	36
III.B.2.iii Recuento de microorganismos viables.....	36
III.B.2.iv Determinación de la concentración de hidrocarburos en tierra.....	37
III.B.2.v Determinación del contenido de humedad.....	37
III.B.2.vi Determinación de la producción de CO ₂ on-line.....	38
III.B.2.vii Preparación de sistemas de suelo contaminado en suspensión.....	38
III.B.2.viii Análisis microscópico de los mecanismos de adhesión celular de <i>S. paucimobilis</i> 20006FA a cristales de fenantreno.....	38
III.B.3 Efectos del inoculante <i>Sphingomonas paucimobilis</i> 20006FA sobre la comunidad microbiana de suelo y sobre la biodegradación en suelos contaminados con PAH en microcosmos	
III.B.3.i Preparación de microcosmos de suelo.....	40
III.B.3.ii Preparación del inóculo.....	41
III.B.3.iii Recuento de microorganismos viables.....	41

III.B.3.iv Determinación de la concentración de hidrocarburos en tierra.....	42
III.B.3.v Determinación de la producción de CO ₂	42
III.B.3.vi Determinación del perfil de utilización de sustratos ECOplate.....	42
III.B.3.vii Actividad microbiana de deshidrogenasas.....	43
III.B.3.viii Determinación de los perfiles de 16SrDNA por DGGE.....	43
III.C.Análisis estadístico.....	45

IV. Aislamiento, selección y caracterización de una cepa bacteriana degradadora de PAH: *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA

IV.A Aislamiento, selección y caracterización de poblaciones bacterianas degradadoras de PAH	
IV.A.1 Aislamiento y selección de poblaciones bacterianas degradadoras de PAH.....	46
IV.A.2 Caracterización e identificación de la cepa 20006FA.....	49
IV.A.3 Análisis de la secuencia.....	53
IV.B. Caracterización metabólica de la cepa <i>S. paucimobilis</i> 20006FA	
IV.B.1 Capacidad de la cepa <i>S. paucimobilis</i> 20006FA de crecer utilizando fenantreno y pireno como única fuente de carbono y energía.....	57
IV.B.2 Determinación de la presencia de actividad dioxigenasa.....	60
IV.B.3 Determinación de la capacidad de la cepa <i>S. paucimobilis</i> 20006FA crecer utilizando salicilato como única fuente de carbono y energía.....	60
IV.B.4 Actividad mineralizante.....	62
IV.C. Caracterización ecológica de la cepa <i>S. paucimobilis</i> 20006FA	
IV.C.1 Investigación de la presencia de plásmidos en la cepa <i>S. paucimobilis</i> 20006FA.....	66
IV.C.2 Estudio de diferentes estrategias utilizadas por la cepa <i>S. paucimobilis</i> 20006FA para favorecer la degradación de los PAH.....	68
IV.C.2.i Análisis microscópico células de <i>Sphingomonas paucimobilis</i> 20006FA creciendo en MML suplementado con cristales de fenantreno.....	68
Tinción con colorantes fluorescentes.....	69
Microscopía de Epifluorescencia.....	69
Microscopía electrónica de Barrido (SEM).....	70
IV.C.2.ii Screening de la producción de agentes tensioactivos.....	80
IV.D Discusión.....	86

V. Dinámica del proceso de biorremediación de suelos contaminados con fenantreno y estudio de los mecanismos de adhesión celular en ensayos de bioaumentación en biorreactores

V.A. Determinación del efecto del bioaumentación sobre la dinámica del proceso de biorremediación en biorreactores	
V.A.1 Efecto del bioaumentación sobre la eliminación del contaminante en suelo.....	96
V.A.2 Efecto del bioaumentación sobre la actividad metabólica de las poblaciones bacterianas durante el proceso de biorremediación.....	97
V.A.3 Efecto del bioaumentación sobre la dinámica de las poblaciones microbianas cultivables.....	99
V.B. Estudio de los mecanismos/estrategias de adhesión de la cepa <i>S. paucimobilis</i> 20006FA a la superficie partículas de suelo contaminado con fenantreno en biorreactores	
V.B.1 Hibridación fluorescente in situ (FISH).....	101
V.C. Estudio de los mecanismos de adhesión de la cepa <i>S. paucimobilis</i> 20006FA a la superficie de las partículas de suelo contaminado con fenantreno en medio líquido	
V.C.1 Tinción con colorantes fluorescentes.....	103
V.C.2 Microscopía electrónica de Barrido (SEM).....	104

V.D. Discusión.....	122
VI. Efectos del inoculante <i>Sphingomonas paucimobilis</i> 20006FA sobre la comunidad microbiana de suelo y sobre la biodegradación en suelos contaminados con PAH	
VI.A Efecto del bioaumentación sobre la degradación de PAH y la comunidad microbiana de suelos contaminados con fenantreno	
VI.A.1 Efecto de la inoculación sobre la biodegradación del contaminante	128
VI.A.2 Efecto de la inoculación sobre la dinámica y la actividad biológica de las comunidades microbianas durante el proceso de biorremediación.....	129
VI.A.2.i Efecto de la inoculación sobre la dinámica de las poblaciones microbianas cultivables	129
VI.A.2.ii Efecto de la inoculación sobre la actividad biológica de las comunidades microbianas	131
VI.A.3 Efecto de la inoculación sobre la estructura de las comunidades microbianas durante el proceso de biorremediación	134
VI.A.3.i Diversidad funcional	134
VI.A.3.ii Diversidad genética.....	136
VI.A.4 Discusión	140
VI.B. Efecto del bioaumentación sobre la degradación de PAH y la comunidad microbiana de suelos contaminados con fenantreno y pireno	
VI.B.1 Efecto de la inoculación sobre la biodegradación del contaminante.....	144
VI.B.2 Efecto de la inoculación sobre la dinámica y función de las comunidades microbianas durante el proceso de biorremediación.....	146
VI.B.2.i Efecto de la inoculación sobre la dinámica de las poblaciones microbianas cultivables	146
VI.B.2.ii Efecto de la inoculación sobre la actividad biológica de las comunidades microbianas	149
VI.B.3 Efecto de la inoculación sobre la estructura de las comunidades microbianas durante el proceso de biorremediación	151
VI.B.3.i Diversidad funcional.....	151
VI.B.3.ii Diversidad genética	153
VI.B.4 Discusión.....	155
VII Conclusiones	159
VIII Bibliografía.....	163

The background of the page is a grayscale micrograph showing a dense field of biological cells. The cells are mostly oval or elongated in shape, with some showing internal structures like nuclei. The overall appearance is that of a tissue section or a cell culture under a microscope.

CAPITULO I

INTRODUCCION

I. Introducción

I.A. La contaminación con PAH: un problema global

Los hidrocarburos son compuestos que forman parte de los residuos fósiles, dentro de los cuales los compuestos de mayor riesgo para la salud humana son los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH), un grupo de compuestos conocidos por su elevada toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad (Bos y col., 1983; Upham y col., 1998; Brandt y col., 2002; Wattiau, 2002; Maliszewska-Kordybach y Smreczak, 2003).

Los PAH están formados por moléculas que contienen dos o más anillos aromáticos de 6 carbonos fusionados. Existen más de 100 moléculas de PAH diferentes, pero la Agencia de Protección Ambiental (EPA), la Organización mundial de la Salud (WHO) y la Comunidad Económica Europea (CEE) consideran 16 de ellos como contaminantes prioritarios por poseer efectos carcinogénicos. La figura I.A-1 muestra las estructura química de los 16 PAH prioritarios.

Los PAH son compuestos no polares con propiedades fisicoquímicas tales como baja solubilidad en agua, baja constante de Henry (coeficiente que representa la partición aire-agua), alta hidrofobicidad o lipofilicidad y alto factor de bioconcentración (Mackay y Callcott, 1998).

Generalmente, los PAH de bajo peso molecular (LMW-PAH), de hasta tres anillos fusionados, son más volátiles, más solubles en agua y menos lipofílicos que los PAH de alto peso molecular (HMW-PAH) con más de tres anillos fusionados. Un aumento en el tamaño y la angularidad de una molécula de PAH resulta en un incremento en la hidrofobicidad y la estabilidad electroquímica. La estabilidad de la molécula y la hidrofobicidad son dos factores primarios que contribuyen a su persistencia en el ambiente (Kanaly y Harayama 2000; Cerniglia, 1992).

Los PAH son generados continuamente en el ambiente y tienen diferentes orígenes:

1-Natural: relacionado con las reacciones geológicas termales, como la actividad de los volcanes, con los combustibles fósiles y los aceites minerales. Los PAH provienen de la combustión de la materia orgánica como la madera en los bosques en los incendios forestales, pero son también sintetizados por actividad biológica de algunas plantas y bacterias (Blumer 1976). Las fuentes naturales de PAH están distribuidas globalmente y los PAH son liberados al ambiente permanentemente produciendo una contaminación natural de relativamente baja concentración.

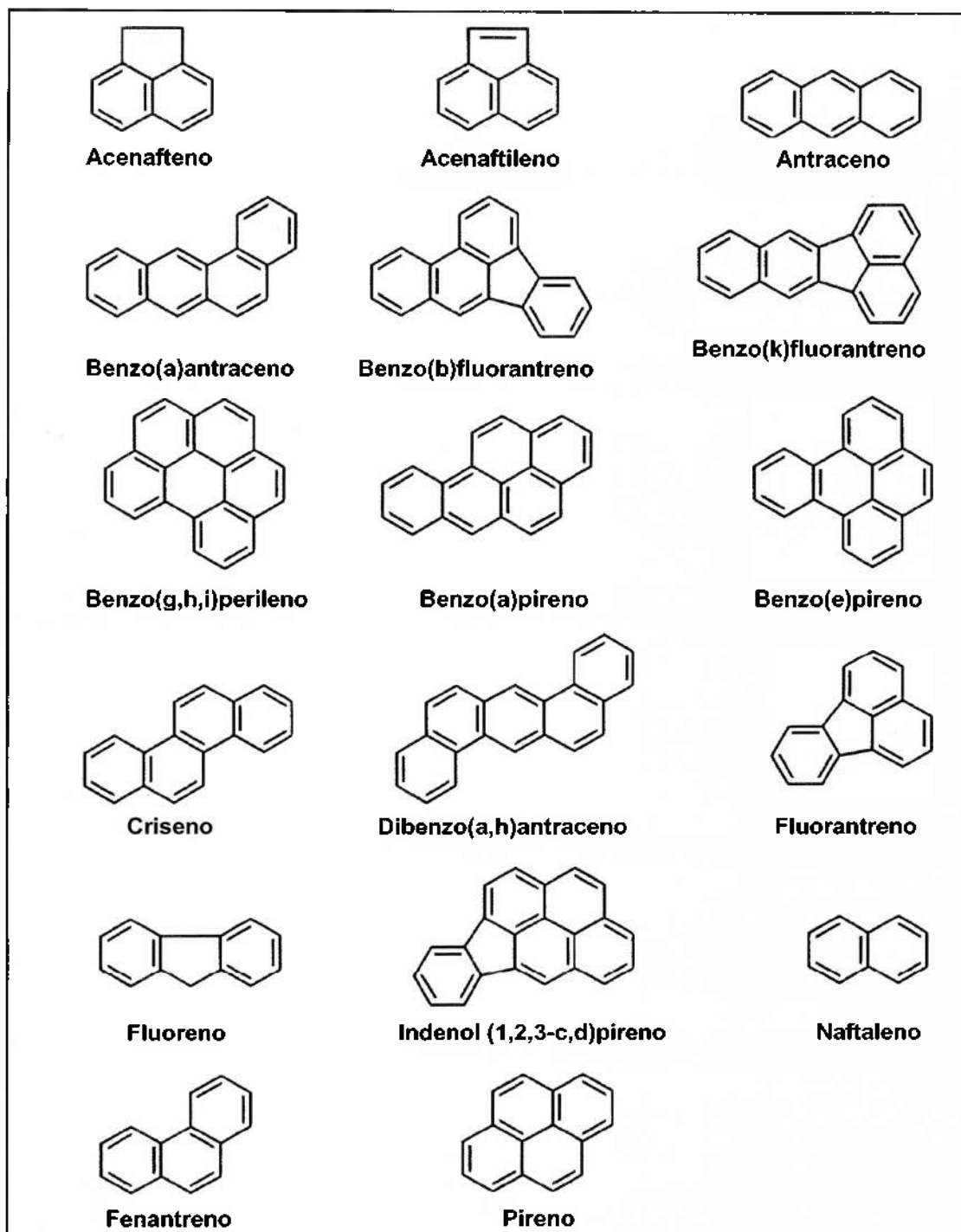


Figura I.A-1: Estructura química de los 16 PAH prioritarios listados por EPA (Lin, 2006)

2-Humano: relacionado con las actividades diarias como la combustión de energías renovables como madera (Freeman y Catell, 1990) o combustibles fósiles. Por ejemplo fumar es una fuente de permanente liberación de PAH a la atmósfera. Un mayor vertido de PAH a la atmósfera se produce por la aplicación de pesticidas en la agricultura o para la protección de

madera, por ej. en la forma de creosota que contiene 85% de PAH. Estas actividades liberan cantidades moderadas de PAH al ambiente.

3-Industrial: Las actividades industriales que vierten grandes concentraciones de PAH en el suelo son principalmente asociadas con la producción, procesamiento aplicación y disposición de PAH puros, en mezcla o material conteniendo PAH (Wilson y Jones 1993). El vertido de PAH es debido a derrames o escapes durante el transporte y almacenamiento (tanques, tuberías, etc.) o por el procesamiento de petróleo crudo o carbón y productos derivados (Nishioka y col., 1986).

Los sitios contaminados con PAH se encuentran principalmente cerca de las ciudades representando un riesgo para la salud pública (Johnsen y col., 2004).

I.A.1 La contaminación del suelo con PAH

Se estima que mas del 90% de la carga total de PAH del suelo se encuentra en la capa superficial (15cm), donde la mayoría de estos compuestos se acumula (Wild y Jones, 1995).

La concentración de PAH en suelos depende del nivel de desarrollo industrial de la zona (Jones y col., 1989; Wild y col., 1991). Por ejemplo la concentración de PAH en suelos de áreas no industriales es menor a 0,005 mg/g de suelo, en cambio se han detectado valores de 1,790 mg/g en suelos cercanos a una refinería de petróleo (Cerniglia, 1992).

Los PAH tienen gran afinidad para unirse al carbono orgánico del suelo (Chiou y col., 1998; Alexander, 2000) pero también a las células (Whitman y col., 1998), una característica que gobierna la distribución de los PAH entre las fases líquida y sólida del suelo y que por lo tanto determina la transferencia de sustancias desde el sitio originalmente contaminado a otros compartimentos ambientales.

Una vez que llegan al medio ambiente los PAH pueden seguir distintas vías ligadas a procesos bióticos y abióticos incluyendo la volatilización, la fotooxidación, la bioacumulación, la oxidación química y la degradación microbiológica (Gilewicz y col. 1997).

El grado y la extensión del proceso de biodegradación de PAH dependen de muchos factores tales como: las características fisicoquímicas de los PAHs, las condiciones fisicoquímicas del suelo incluyendo la estructura y el contenido de materia orgánica, el tiempo de residencia de el PAH en el suelo, el tipo y concentración de los aceptores de electrones presentes, la composición y actividad de la comunidad microbiana; todo junto interacciona en forma compleja determinando la cantidad y el tipo de fracción biodisponible del contaminante (Berthe-Corti y col., 2007).

I.A.2 Biodegradación microbiana de PAH

Han sido aislados numerosos procariotes y eucariotes como eubacterias, levaduras, hongos filamentosos e inclusive cianobacterias y algas capaces de mineralizar o cometabolizar PAH.

Existen diferentes maneras de iniciar la degradación de un PAH, que dependerá del tipo de microorganismo degradador, y de la utilización o no del oxígeno.

Es bien sabido que el paso inicial en el metabolismo aeróbico de la molécula de PAH en bacterias tiene lugar vía oxidación de un anillo del sistema de anillos del PAH resultando un cis,dihidrodiol (Kanaly y Harayama, 2000; Gibson y Subramanian, 1984; Upham, 1998) este es luego oxidado para formar dihidróxidos (como por ejemplo el compuesto A en la figura I.B-1). El intermediario dihidroxilado es procesado por un sistema multienzimático de deshidrogenasas para formar compuestos dihidroxiaromáticos, que luego a través de rutas de orto y meta clivaje se oxidan a un intermediario central del metabolismo como el acetato o succinato, los cuales pueden entrar en el ciclo de Krebs transformándose finalmente en CO₂ (Krivobok y col., 2003). Este tipo de degradación es equivalente a una completa mineralización y detoxificación de los PAH.

Por ejemplo en la degradación de fenantreno se encontró que la dioxigenación sobre los carbonos 9 y 10 es usualmente la vía metabólica seguida por las bacterias Gram positivas (Rhemann y col., 1998; Moody y col., 2001; Vila y col., 2001) mientras que la dioxigenación 3,4 (o 1,2) es predominante en bacterias Gram-negativas (Grifoll y col., 1995; Prabhu y Phale, 2003). La degradación de ácido 1-hidroxi-2-naftoico puede producirse por dioxigenación con posterior apertura del anillo a trans-2-carboxibenzarpiruvato (en especies de *Norcardioides* y *Mycobacterium* (Iwabuchi y Harayama, 1998; Adachi y col., 1999; Kim y col., 2005) o por decarboxilación e hidroxilación de ácido 1-hidroxi-2-naftoico para producir naftalen-1,2-diol (Fig. I.B.1). Esta reacción es presumiblemente catalizada por salicilato hidroxilasa o enzimas equivalentes (Balashova y col., 2001). El mecanismo más común de la degradación de naftalen-1,2-diol en bacterias Gram negativas es meta clivaje para producir 2-hidroxibenzalpiruvato, el cual es luego transformado a salicilato (Fig. I.B.1) (Seo y col., 2006).

Figura I.B-1: Principales vías metabólicas de degradación bacteriana de fenantreno (Balashova y col., 2001)

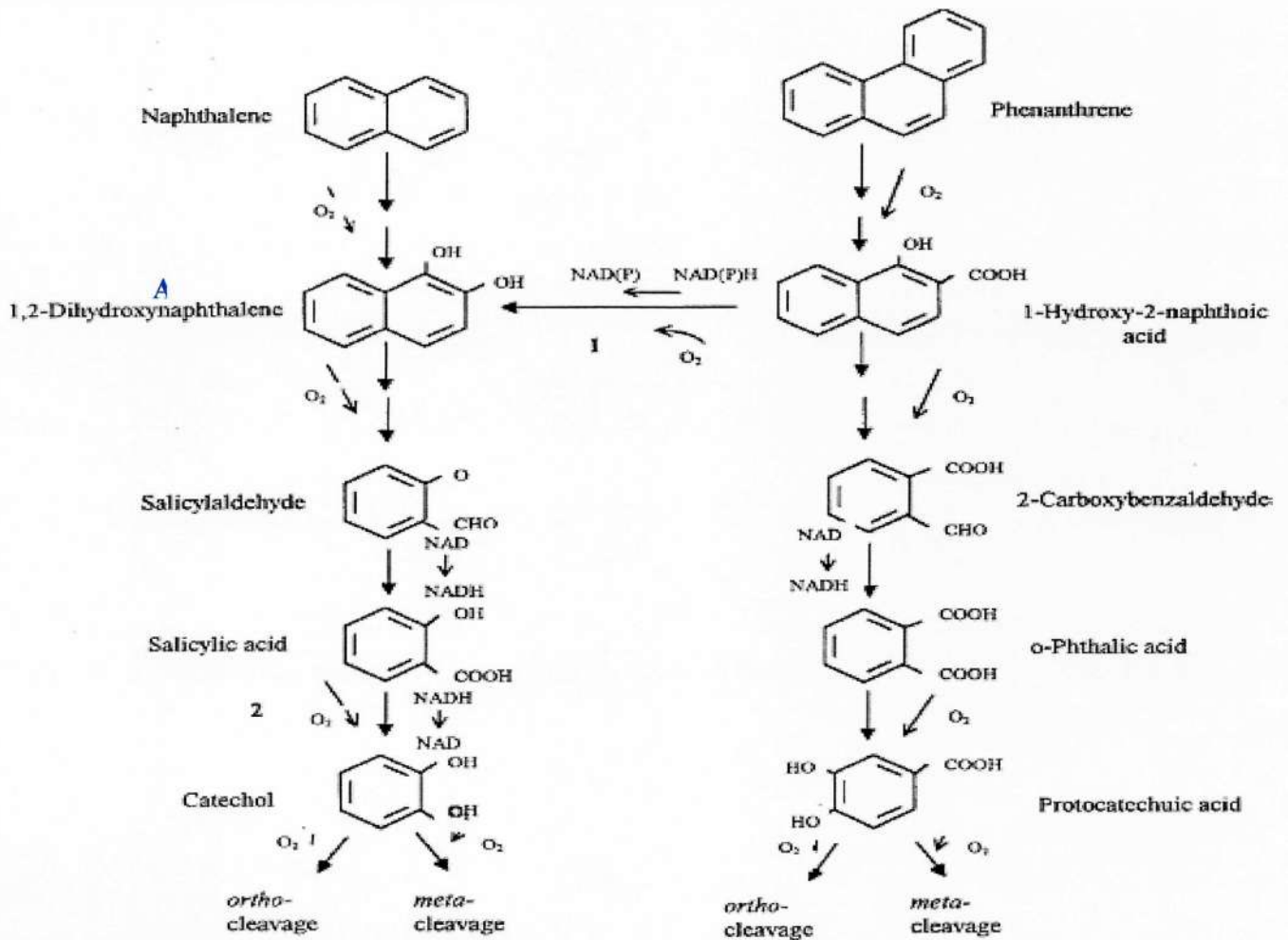


Figure 1. Phenanthrene and naphthalene degradation pathways (Kiyohara & Nagao, 1978). (1) 1-Hydroxy-2-naphthoate hydroxylase, (2) salicylate hydroxylase.

La mayoría de los estudios del metabolismo microbiano de los PAH han sido realizados con cepas que utilizan el sustrato en estudio como sustrato de crecimiento (Cerniglia, 1992; Churchill y col., 1999). Sin embargo un número de bacterias degradadoras actúa sobre una variedad de compuestos que no soportan su crecimiento y producen productos parcialmente oxidados (Grifoll y col., 1995). Esta versatilidad es debida parcialmente a la amplia especificidad de sustratos de las enzimas degradadoras, como ha sido demostrado ampliamente para naftaleno y tolueno dioxigenasas (Gibson y col., 1995; Wackett y col., 1988).

Para un eficiente proceso de remediación es importante que la bacteria involucrada tenga la vía completa e degradación de modo que no se acumulen productos tóxicos de degradación en suelo (Kanzuga, 2001). Los dihidrodioles intermediarios en la degradación de PAH son altamente reactivos y forman aductos con el ADN, el ARN y las proteínas. Los

aductos inhibirían la reparación celular por secuestrar enzimas reparadoras, conduciendo a la mutación y la carcinogenicidad (Perlow y Broyde, 2003).

PAH de alto PM son pobremente degradados (Juhasz y Naiu, 2000) y raramente sirven como única fuente de carbono y energía para las bacterias. Por lo que se ha observado la degradación cometabólica junto con la degradación de PAH de bajo PM (van Herwijnen y col., 2003).

Ciertos grupos de bacterias son capaces de cometabolizar PAH en mayor extensión que otras. La predicción de si esta capacidad cometabólica sera efectiva en la biorremediación depende en parte del conocimiento de cuales son los grupos microbianos presentes y activos en el suelo contaminado (Mueller y col., 1997).

Los genes para la degradación de PAH están a menudo localizados en plásmidos.

La presencia de genes degradadores de PAH en elementos genéticos móviles puede indicar la fácil dispersión de habilidades catabólicas de PAH entre bacterias en suelos contaminados. Existe evidencia de que ha ocurrido la trasferencia de genes codificados en plásmidos entre miembros de una comunidad bacteriana filogenéticamente diferente (Eric y col., 1997; Stuart-Keil y col., 1998).

1.A.3 Biodisponibilidad

La tendencia actual hacia el desarrollo de las estrategias de biorremediación in situ para la limpieza económica de contaminantes requiere una comprensión de los factores que limitan o favorecen la degradación microbiana (Rentz y col., 2007).

Debido a la alta hidrofobicidad y radio de distribución sólido-agua, los PAH interactúan con la fase líquida no acuosa (NAPL) y la materia orgánica del suelo y, como consecuencia, no están disponibles para la degradación microbiana ya que las bacterias degradan únicamente sustancias que están disueltas en agua, de modo que se favorece su acumulación en las fases sólidas del ambiente terrestre. Estas características determinan que los PAH sean considerados compuestos de gran interés ambiental.

En el suelo no hay mezclado y la difusión de las moléculas es muy baja, retardándose por las múltiples fases existentes, los poros sin salida y la alta tortuosidad del sistema. Las bacterias están excluidas de los poros de 0.2-0.8 μm . Si la contaminación es masiva los PAH se adsorben y quedan atrapados en los pequeños poros del suelo lo cual limita mas el acceso de las bacterias (Johnsen y col., 2004).

En la microescala, los microorganismos y los PAH no están uniformemente distribuidos, y en consecuencia en un agregado de suelo los microorganismos solo tendrán limitado acceso a los PAH del resto de la muestra. Las bacterias degradadoras de PAH también tendrán

probablemente limitada habilidad de dispersarse de un agregado de suelo a otro (Johnsen y Karlson, 2005).

El potencial de biodegradación de hidrocarburos no se define únicamente por su composición química sino también por las características biológicas, físicas y químicas del suelo (Betancur-Galvis y col., 2006). Como los PAH pueden estar fuertemente adsorbidos a las partículas de suelo, la desorción puede ser el factor que controla la biodegradación (Hansen y col., 2004).

La biodisponibilidad es para los microorganismos un importante factor de selección de especies, de este modo bacterias del mismo suelo pueden ser seleccionadas por sus diferentes modos de manejar la biodisponibilidad de PAH.

I.B. Estrategias de biorremediación de suelos contaminados con PAH

La biorremediación se fundamenta en el aprovechamiento y promoción de los procesos de biodegradación natural del suelo para transformar y degradar contaminantes orgánicos (Vecchioli, 1998).

La biorremediación es una tecnología que actualmente se aplica para la limpieza de ambientes contaminados (Margesin y Schinner, 2001). Una de los principales atractivos de la biorremediación es su compatibilidad con los ciclos biogeoquímicos, lo que hace de ella una aproximación sustentable y ambientalmente amigable (El Fantroussi y Agathos, 2005).

En esta tecnología se utilizan organismos vivos (plantas, animales o microorganismos), componentes celulares o enzimas libres, con el fin de realizar una mineralización (Compuesto blanco \rightarrow $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$) o una transformación parcial del contaminante en sustancias menos tóxicas o inocuas para el medio ambiente y la salud humana (Röling y col., 2002).

Los microorganismos pueden degradar numerosos contaminantes orgánicos debido a su maquinaria metabólica y a su capacidad de adaptarse a ambientes inhóspitos. Por eso juegan un rol principal en los procesos de biorremediación (El Fantroussi y Agathos, 2005).

La biorremediación podría definirse como una biodegradación asistida y controlada que provee una solución definitiva. Así se diferencia de otras tecnologías que solo proveen una solución temporal mediante el aislamiento y la contención del contaminante (Crawford, 2002).

Una de las ventajas, más atractivas de esta tecnología es la posibilidad de tratar el contaminante *in situ*, es decir en su lugar original. De esta forma la biorremediación *in situ* permite remediar un sitio contaminado sin transportar el contaminante y produciendo una mínima alteración del lugar.

Debido a que la biorremediación es una tecnología de reciente aplicación y que su eficiencia depende de numerosos factores de cuya interacción se conoce muy poco, debe

reconocerse que a diferencia de otras tecnologías todavía no cuenta con procedimientos estandarizados para su aplicación, seguimiento y cierre (Del Panno, 2003).

En términos generales, el enfoque de la biorremediación consiste en una modificación ambiental que incentiva la capacidad degradadora intrínseca de los microorganismos del suelo.

Existen diferentes estrategias de biorremediación:

Bioestimulación: Consiste en modificar el ambiente por la adición de un nutriente de forma tal que se estimule a las poblaciones naturales a degradar el contaminante. Para poder aplicar esta técnica es necesario conocer las propiedades fisicoquímicas del contaminante y del proceso de degradación llevado a cabo por las comunidades del suelo.

Bioaumentación: Aumento de las capacidades metabólicas de una comunidad microbiológica indígena por la introducción de microorganismos para incrementar la velocidad y/o la extensión de la degradación de un contaminante

Fitorremediación: Es un proceso que tiene por objeto descontaminar suelos valiéndose de especies vegetales capaces de extraer, metabolizar y acumular las sustancias tóxicas presentes en dichos suelos. Para ello, suelen emplearse diferentes especies, con probada capacidad para realizar esa labor (<http://www.planets-voice.org/news.shtml?X=356>). Es un método sencillo y permite la eliminación selectiva de contaminantes y su recuperación para futuros usos (http://www.ucm.es/info/otri/complutecno/fichas/Tec_ccamara1.html).

Generalmente, la biorremediación se aplica con la intención de reducir la concentración de hidrocarburos a niveles aceptables por la legislación vigente o a valores estándar de limpieza de suelo. De esta forma, el impacto provocado por el contaminante a corto o largo plazo y el producido por la estrategia de biorremediación aplicada, son de especial interés tanto para las industrias generadoras de la contaminación como para los organismos legislativos (Saterbak y col., 2000).

Considerando que toda contaminación con hidrocarburos se caracteriza por la presencia de mezclas complejas de diferentes compuestos (algunos fácilmente degradables, mientras que otros son recalcitrantes), la biorremediación presenta el desafío de tener que diseñar estrategias que permitan no solo hacer que la biodegradación sea el proceso de eliminación predominante, sino también acelerar la biodegradación de los compuestos más recalcitrantes (Vecchioli y col., 2000)

La biorremediación de suelos contaminados con PAH se considera un fenómeno complejo debido a la naturaleza tóxica e hidrofóbica de los contaminantes, la composición del suelo, la heterogeneidad microbiana, la naturaleza multifásica del proceso de biorremediación y los factores ambientales que gobiernan el proceso (Mohan y col., 2006)

I.C. Bioaumentación de suelos contaminados con PAH: conceptos y realidades

El bioaumentación puede ser definido como una técnica que permite el incremento de las capacidades de una matriz contaminada (suelo u otro biotopo) para remover la contaminación por la introducción de cepas microbianas competentes o consorcios de microorganismos. La premisa básica para esta intervención es que las capacidades metabólicas de la comunidad microbiana indígena ya presente en el biotopo a limpiar será incrementada por una diversidad genética aumentada en forma exógena, conduciendo esto a un mas amplio repertorio de reacciones biodegradadoras productivas (El Fantroussi y Agathos, 2005).

Los PAH son típicos contaminantes para los cuales la incorporación de cepas microbianas competentes (bioaumentación) podría facilitar la limpieza de los sitios contaminados. Es decir, son moléculas complejas que sólo pueden ser degradadas por una específica combinación de microorganismos y rutas metabólicas (El Fantroussi y Agathos, 2005).

En los últimos años se han publicado muchos experimentos relacionados con el bioaumentación, algunos con resultados favorables y otros con resultados desalentadores, por lo que ésta estrategia permanece discutible tanto desde el punto de vista científico como tecnológico.

Se realizaron experimentos que intentaron demostrar el potencial del bioaumentación en suelos y sedimentos contaminados con PAH, de ellos algunos han sido relativamente exitosos (Kastner and Mahro, 1996; Juhasz et al., 2000; Hwang and Cutright, 2002; Dean-Ross, 2003; Piskonen et al., 2005; Jouanneau et al., 2005; Abbondanzi et al., 2006; Atagana, 2006) y otros han fallado (Venosa et al., 1996; Allard et al., 2000; Cavalca et al., 2002; Launen et al., 2002; Gomes et al., 2005; Yu et al., 2005).

Muchos factores atentan contra el bioaumentación como por ej. la predación, la competencia o la sorción. Sin embargo, varias estrategias están siendo exploradas actualmente para hacer del bioaumentación una tecnología exitosa en lugares que carecen de una población de microorganismos biodegradadores significativa.

Bajo las condiciones optimas locales, la velocidad de degradación de los contaminantes podría incrementarse por la adición de un inoculante para remediar un derrame químico; sin embargo, los casos mas exitosos de bioaumentación se dan en sistemas confinados, tales como biorreactores en los cuales las condiciones pueden ser controladas para favorecer la sobrevivencia y la actividad prolongada de la población microbiana introducida (El Fantroussi y Agathos, 2005).

A pesar del hecho de que los microorganismos capaces de degradar el contaminante ya están presentes en los acuíferos y suelos contaminados, las condiciones ambientales locales podrían ser desfavorables en esas áreas. En algunas ocasiones la comunidad microbiana que esta presente naturalmente en un sitio contaminado puede no poseer el potencial metabólico

apropiado para la degradación y la completa mineralización del compuesto blanco en pequeñas y estables moléculas como CO_2 o CH_4 y H_2O . Esto podría ser debido al bajo número del microorganismos que posea el juego de enzimas completo capaz de transformar el contaminante productivamente (en una ruta metabólica eso conduce a su eventual ruptura en productos finales menos nocivos).

La relación entre el microorganismo inoculado con el nuevo ambiente biótico y abiótico, en términos de sobrevivencia, actividad y migración, puede ser decisiva en el desarrollo de cualquier estrategia de bioaumentación. Esto es especialmente cierto en biotopos tan complejos y dinámicos como el suelo (van Veen y col., 1997).

La rápida disminución en el tamaño de la población de las células activas inoculadas exógenamente en suelo (microbiostasis) se atribuye a distintos factores. Pero los factores bióticos como la predación por protistas, la competencia con microorganismos autóctonos por nutrientes o aceptores de electrones, y la presencia de raíces que pueden liberar compuestos orgánicos, son los que impactan en forma más adversa sobre el bioaumentación (van Veen y col., 1997).

El background ecológico constituye una de las mayores barreras en el éxito de un experimento de biorremediación con un determinado inóculo.

En la literatura existe abundante evidencia de que el mejor modo de superar las barreras ecológicas arriba mencionadas es buscar microorganismos del mismo nicho ecológico del área contaminada. En el trabajo de van der Gast y col. (2003) los autores demostraron, sobre la base de la comprensión de la diversidad de las poblaciones indígenas en el residuo blanco, que el bioaumentación con cepas seleccionadas puede conducir a un tratamiento más efectivo que la aplicación de comunidades no caracterizadas.

La validación de una estrategia de bioaumentación exitosa debería basarse no solo en datos cuantitativos del sitio, (como la cinética y extensión de la biodegradación del contaminante blanco) sino también en la detección y monitoreo de los microorganismos introducidos (Jansson y col., 2003). Técnicas como las basadas en PCR de 16SrRNA y DGGE (Streger y col., 2002; Dabert y col., 2005), la detección de genes reporteros (Dandie y col., 2006), la PCR cuantitativa (Schwartz y col., 2000) y la Hibridización fluorescente in situ (Lanthier y col., 2002) están siendo utilizadas para monitorear y detectar las cepas introducidas en el bioaumentación.

Se pueden utilizar en el bioaumentación microorganismos salvajes o microorganismos genéticamente modificados. Con las nuevas técnicas de la ingeniería genética se pueden emplear microorganismos genéticamente modificados haciéndolos más eficientes en la biorremediación, pero probablemente esto no sea necesario en la mayoría de los casos debido a la gran diversidad de microorganismos silvestres con amplia variedad de rutas metabólicas. La desventaja además es que la utilización de microorganismos genéticamente modificados

debe afrontar importantes restricciones legales (Gentry y col., 2004; Pretige-Biorremediación.pdf).

En la tabla 1 se muestran las diferentes técnicas que han sido desarrolladas para bioaumentar ambientes, ellas son el bioaumentación celular, el bioaumentación genética y el bioaumentación rizosférico.

Técnicas de Bioaumentación	Procedimiento	Estado tecnológico
Bioaumentación celular	Introducción de un cultivo microbiano, microorganismos inmovilizados o suelo activado	En uso/En desarrollo
Bioaumentación genética	Introducción de microorganismos con genes móviles (transferencia horizontal de genes)	Emergente
Bioaumentación rizosférico	Introducción de un inoculante junto con una planta	Emergente
Fitoaumentación	Planta transgénica con genes remediadores	Emergente

Tabla I.D-1: Diferentes estrategias de bioaumentación

El bioaumentación celular es la técnica más estudiada y desarrollada como estrategia para acelerar la biorremediación de suelos contaminados con PAH, aunque en la mayoría de los casos se ha desarrollado a escala de laboratorio. Se utilizan inoculantes microbianos (especies aisladas o consorcios), los cuales se aplican como suspensiones a microcosmos de suelo o reactores con fase barro (Kästner y Mahro, 1996; Boonchan y col., 2000; Juhasz y col., 2000).

Los suelos naturales representan un ambiente hostil para las células inoculadas, por lo tanto una opción atractiva para incrementar la probabilidad de permanencia de las mismas es el agregado de nutrientes, que generan un ambiente favorable para el crecimiento y establecimiento del inóculo (van Veen y col., 1997).

La mayoría de los reportes de la literatura que tratan de determinar el efecto de las estrategias de bioaumentación en procesos de biorremediación de PAH han sido realizados a escala de laboratorio en microcosmos (Bogan et al., 1999; Schwartz y col., 2000; Schwartz and Scow, 2001; Cavalca y col., 2002; in der Wiesche y col., 2003; Johnson y col., 2004; Gomes y col., 2005; Cunliffe and Kertesz; 2006), columnas de suelo (Hwang and Cutright, 2002; Leys y col., 2005; Piskonen y col., 2005) o columnas de sedimentos (Launen y col., 2002; Dean-Ross, 2003; Yu y col., 2005), y hay solo unos pocas aplicaciones a campo que están bien documentadas (Venosa y col., 1996).

Es por todo esto, que en el caso de suelos o sedimentos contaminados con PAH en, el bioaumentación permanece como una metodología experimental.

A pesar de la variabilidad de los ensayos diseñados, las características de los suelos y sedimentos, las concentraciones de PAH y la historia de la contaminación (contaminación

reciente o envejecida, contaminación en campo o a escala de laboratorio) y los diferentes protocolos de bioaumentación utilizados, es posible hacer algunas consideraciones generales.

La contaminación con PAH de bajo peso molecular (menos de 4 anillos) provoca el establecimiento de una población microbiana degradadora de PAH (Cavalca y col., 2002; in der Wiesche y col., 2003; Yu y col., 2005; Gomez y col., 2005; Cunliffe and Kertesz, 2006), que está presente aún en suelos envejecidos y muestra actividad degradadora en condiciones ambientales favorables en el laboratorio (Allard y col., 2000; Abbondanzi y col., 2006; Cunliffe and Kertesz, 2006). En consecuencia el bioaumentación puede, solo en algunos casos, incrementar la velocidad de biodegradación de PAH de bajo peso molecular y reducir el tiempo de biorremediación (Piskonen y col., 2005; Abbondanzi y col., 2006; Cunliffe and Kertesz, 2006). Particularmente el bioaumentación ha mostrado causar un efecto favorable significativo en suelos contaminados con bajas concentraciones de PAH de bajo peso molecular (ej.: 0.05 mg.kg^{-1}) donde la baja concentración de PAH biodisponible puede estar por debajo del mínimo nivel de sustrato necesario para sostener una población degradadora (Schwartz and Scow, 2001).

Por otro lado, los PAH de alto peso molecular (4 o más anillos) son solo parcialmente degradados por la microflora indígena del suelo (Ringelberg et al., 2001; Abbondanzi et al., 2006). Diversos grupos bacterianos y hongos ligninolíticos pueden degradar parcialmente, oxidar cometabólicamente o mineralizar algunos PAH de alto peso molecular (Boonchan et al., 2000; Juhasz and Naidu, 2000), pero en suelo o sedimento la biodegradación podría estar limitada por su baja solubilidad en agua y biodisponibilidad.

Varios estudios mostraron que el bioaumentación de los suelos contaminados con cepas seleccionadas, cultivos mixtos definidos o cultivos enriquecidos a partir de suelo, favorecen la biodegradación de PAH de alto PM en comparación con la microflora indígena (Boonchan y col., 2000; in der Wiesche y col., 2003; Potin y col., 2004; Abbondanzi y col., 2006), sin afectar la capacidad de degradar los PAH de bajo PM (in der Wiesche y col., 2003; Abbondanzi y col., 2006).

A pesar de todas estas pruebas en favor del bioaumentación, otros numerosos estudios demostraron que el bioaumentación a menudo no resulta en un incremento en la velocidad de degradación del PAH. Existen razones que podrían explicar las fallas del bioaumentación, y están relacionadas con las condiciones abióticas ambientales (Venosa y col., 1996; Launen y col., 2002; Yu y col., 2005), con una relativamente baja biodisponibilidad de los sustratos (Gomez y col., 2005) o con la acumulación de los metabolitos de los PAH que pueden resultar tóxicos para las bacterias.

Aunque aún no han sido claramente dilucidados todos los factores que determinan la eficiencia de las estrategias de bioaumentación, continúa siendo una metodología promisoría para la remediación de sitios contaminados con PAH.

I.C.1 Selección de inoculantes

Hasta ahora se han buscado cepas catabólicamente competentes, con poca consideración sobre otras características esenciales que se requieren para que sea funcionalmente activa y persistente en los ambientes blanco (Thompson y col., 2005).

A pesar de que la ecología microbiana es un factor importante en el bioaumentación, raramente es tomada en cuenta (Vogel y Walter, 2001).

Las consideraciones ecológicas deberían ser una prioridad, aún antes de la aplicación del inóculo, es decir en el paso de selección de la cepa. Resulta vital para esas consideraciones la abundancia temporal y espacial de las poblaciones de la fuente potencial y su habilidad para tolerar las condiciones prevaletentes en el ambiente blanco. Hasta ahora, la selección inicial de la cepa ha estado basada en un simple criterio clave, la capacidad de degradación, sin consideración de la habilidad potencial de las cepas de proliferar y estar activas en los sitios donde son aplicadas (Thompson y col., 2005).

La exitosa aplicación de las técnicas de bioaumentación depende de la identificación y aislamiento de cepas microbianas apropiadas y su sobrevivencia y actividad una vez incorporadas al ambiente blanco.

Tradicionalmente la selección de cepas para bioaumentación se ha realizado por enriquecimiento selectivo. Esto involucra cepas del sitio contaminado que se enriquecen con respecto a la comunidad background, en cultivo, utilizando el contaminante blanco como única fuente de C o N. El proceso resulta en la selección de cepas que expresan la habilidad degradadora requerida (al menos en las condiciones del cultivo de enriquecimiento). El problema es que el procedimiento de enriquecimiento no tiene influencia sobre otros aspectos que son requeridos también para que las cepas sean competitivas y efectivas en el ambiente blanco. Estos aspectos son las condiciones ambientales fluctuantes (humedad, nutrientes, redox, PH y factores osmóticos) y por supuesto la competencia con las poblaciones indígenas, entre otros (Recorbet y col., 1992; England y col., 1993).

Belotte y colaboradores (2003) aislaron bacterias de una serie de lugares en el suelo de un bosque. Cuando los microorganismos que crecían vigorosamente fueron cultivados y reintroducidos en el ambiente, colonizaron los sitios de los cuales eran originarios, proveyendo suficiente evidencia de adaptación local. Los autores estimaron que esos aislados se adaptaban 50% mejor cuando se reintroducían en sus lugares de origen y que esa adaptación disminuía exponencialmente con la distancia de su origen (Belotte y col., 2003).

Proveer microorganismos nativos degradadores de PAH previamente seleccionados por la presencia de contaminantes incrementa la densidad relativa de una población y esto permite tener una alta expresión de enzimas catabólicas por célula (Rentz y col., 2007).

Se sugiere que la selección de la cepa debería realizarse sobre el conocimiento del tipo de comunidad microbiana y preferentemente con algún conocimiento del tipo de organismos que están presentes en el ambiente blanco (Thompson y col., 2005).

Inevitablemente, como en la mayoría de los sistemas biológicos, siempre habrá un elemento de in-predicción. Los factores abióticos como la densidad del inóculo, la preparación y los modos de introducción tienen gran influencia en el desarrollo del experimento (Vogel y Walter, 2001).

Las cepas a elegir para ser utilizadas para el bioaumentación deberían ser fácilmente manipulables, tener habilidades catabólicas excepcionales, tolerancia a estrés ambiental, ser técnicamente fáciles de usar y no ser riesgosas para la salud pública (no ligadas a patógenos humanos) (Singer y col., 2005).

I.C.2 Estrategias para favorecer la biodisponibilidad

La biodisponibilidad está gobernada por la transferencia de masa del contaminante desde las partículas de suelo hacia la fase en solución (Cuypers y col., 2002; Reid y col., 2000).

El fenómeno de transferencia de masa depende de la difusión, la cual está relacionada con el espesor de la capa estanca relacionado con el tamaño y forma de la molécula y la velocidad de agitación (Mulder y col., 1998).

Algunas especies bacterianas pueden ser capaces de superar la dificultad que resulta del secuestro del contaminante por la matriz de suelo, otorgándoles una ventaja sobre los organismos que no tienen esa habilidad (Alexander 2000).

Los mecanismos promotores de la biodisponibilidad que han sido descritos en bacterias maximizan la adquisición de PAH adsorbidos mediante la producción de biosurfactantes y emulsificantes, sistemas de captura de alta afinidad, mecanismos de adhesión de células a PAHs o quimiotaxis para PAHs.

Es de amplio conocimiento que la degradación microbiana de PAH está limitada por su solubilidad en agua (Volkering y col., 1993; Harms y Bosma, 1997). Esto se considera en el contexto de la Ley de difusión de Fick, que puede aplicarse a bacterias cultivadas en PAH en cultivos batch agitados. Aquí los cristales de PAH están rodeados por una capa estacionaria de medio a través del cual se efectúa la transferencia de masa por difusión.

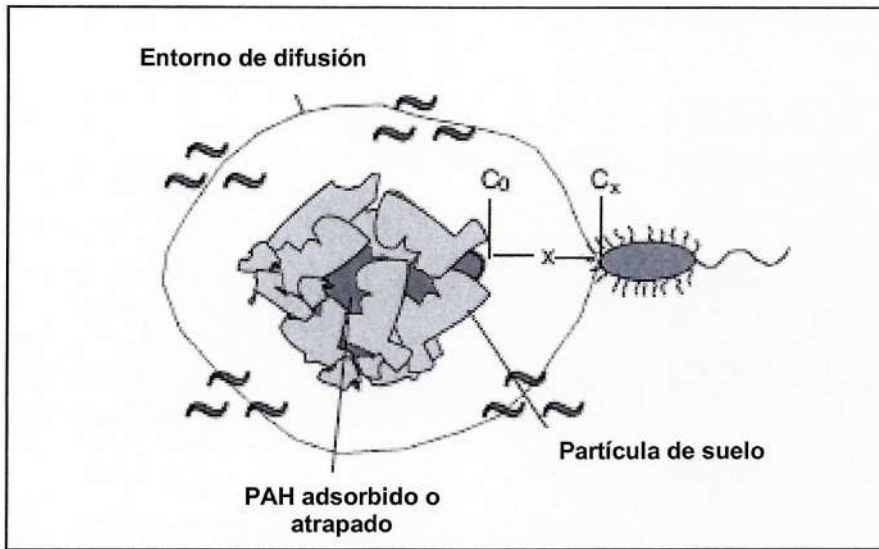


Figura I.C-1: Dibujo esquemático de una bacteria degradadora de PAH creciendo en la vecindad de PAH adsorbido o atrapado en una partícula de suelo. C_0 es la concentración de PAH en la superficie de la partícula, C_x es la concentración en las células y x es la distancia de difusión (Johnsen y col., 2004).

$$Q/t = -D A (C_0 - C_x) / x$$

Q = cantidad de sustrato que difunde por el área A por unidad de tiempo

D =coeficiente de difusión

A =área interfacial

C_0 = concentración de PAH en la fuente (solubilidad)

C_x = concentración de PAH en la superficie celular

x =distancia de difusión

Las bacterias pueden optimizar el flujo de PAH a través de esa capa estanca incrementando el coeficiente de difusión (D), lo que pueden realizar mediante la excreción de biosurfactantes que actúan como transportadores (García y col., 2001), o aumentando el área interfacial (A) de PAH mediante la producción de bioemulsificantes logrando así mayor flujo del sustrato (Reddy y col., 1982).

Los biosurfactantes son moléculas pequeñas con una cabeza hidrofílica y una cola hidrofóbica. Ellos forman micelas lamelares o esféricas que solubilizan compuestos hidrofóbicos, esto conduce a la transferencia de PAH desde la fase sólida o adsorbida hacia la fase acuosa. En términos de la ley de Fick, las micelas de biosurfactantes influyen la solubilidad aparente (C_0), el coeficiente de difusión efectivo (D), la distancia de difusión (x) y el área interfacial (A) (Johnsen y col., 2004).

Aún más las moléculas de surfactante pueden influenciar los procesos de disolución o desorción uniéndose a la interfase PAH-agua. Aquí ellas forman hemimicelas que pueden acelerar la remoción del PAH (Volkering y col., 1998)

En algunos casos los biosurfactantes pueden dividirse en moléculas de bajo peso molecular y polímeros de alto peso molecular (Ron y Rosenberg, 2001). Los de bajo peso molecular son generalmente glicolípidos o lipopéptidos. Los de alto peso molecular son polisacáridos anfipáticos, proteínas, lipolisacáridos, lipoproteínas o mezclas complejas de esos polímeros (Rosenberg y Ron 1999).

Se puede también optimizar el gradiente de concentración a través de la capa estanca, de modo que el flujo de PAH sea maximizado por las células manteniendo la concentración de PAH en la superficie celular (C_x) cercana a cero (van-Loosdrecht y col., 1990; Rijnaarts y col., 1990; Harms y Bosma, 1997; Wick y col., 2001). La velocidad a la cual las bacterias degradan un sustrato que esta disponible a baja concentración, depende de su especial afinidad hacia ese sustrato. Altas afinidades específicas conducen a disminuciones eficientes de un contaminante que se encuentra bajas concentraciones en la superficie celular y mayores velocidades de transferencia del sustrato (Johnsen y col., 2004).

También puede optimizarse la distancia entre el PAH y la superficie celular. Para esto la formación de biofilm sobre la fase que contiene el PAH es un modo eficiente de incrementar el flujo de este hacia las células. Una corta distancia entre el PAH y el biofilm favorece marcadamente la transferencia de masa del PAH a las células por saltar el gradiente de concentración acuoso (van-Loosdrecht y col., 1990; Rijnaarts y col., 1990).

Los microorganismos típicamente colonizan superficies para promover sus sobrevivida y crecimiento. Es sobre las superficies donde se encontró que las comunidades bacterianas forman biofilms compuestos de células microbianas y sustancias poliméricas extracelulares (EPS) tales como proteínas y polisacáridos. En los biofilms, las células viables aumentan su habilidad de crecer y sobrevivir en condiciones ambientales cambiantes y se favorece su acceso a sustratos adsorbidos (Ebihara y Bishop, 1999).

Se cree que la adherencia y la formación de biofilms sobre los PAH es un mecanismo distribuido entre las bacterias para resolver las limitaciones en la transferencia de masa cuando crecen el PAH muy poco solubles y adsorbidos.

La naturaleza del crecimiento en biofilm en un medio poroso tiene un efecto significativo sobre la actividad biodegradativa por unidad de masa de suelo (Ebihara y Bishop, 2002).

El acceso de bacterias a los PAH en el ambiente es altamente variable. Esta dificultad puede ser mitigada por acumulación de PAH para luego ser fácilmente suministrado. Se cree que EPS puede estar involucrado en el almacenamiento de PAH en biofilms. Esto podría ser ventajoso en suelo donde la lluvia y los disturbios biológicos proveen a los microorganismos de pulsos de PAH disueltos, ya que se podría acumular sustrato para los períodos de hambruna (Johnsen y col., 2004).

Actualmente existen distintas técnicas que permiten estudiar la producción de biosurfactantes y EPS y la formación de biofilms.

La microscopía de epifluorescencia y la hibridación fluorescente in situ (FISH) son técnicas que permiten la visualización de microorganismos y el estudio de su disposición sobre superficies junto a la identificación filogenética de bacterias en ensamblajes mixtos sin cultivo previo (Giovannoni et al. 1988, De Long et al, 1989, Amann et al.1990).

Recientemente, la microscopía electrónica de (SEM), y la microscopía láser confocal (CLSM) han sido empleadas para estudiar biofilms.

El análisis por microscopía electrónica es utilizado como instrumento analítico para monitorear la adhesión celular a superficies, y la microscopía electrónica de barrido (SEM) permite obtener imágenes estereoscópicas y revelar características superficiales de las bacterias como por ejemplo la presencia de pili, EPS y flagelos en distintas bacterias (Ishii et al., 2004).

CLSM permite el examen de biofilms hidratados y da una imagen tridimensional limpia de los biofilms vivientes en tiempo real. Provee además información sobre la morfología de las células microbianas y colonias, su distribución en la superficie y la presencia de EPS (Beech y col 1999).

I.C.3 Importancia del efecto del inoculante sobre la comunidad bacteriana

La relación entre el microorganismo inoculado y la comunidad microbiana nativa puede ser decisiva en el resultado de cualquier estrategia de bioaumentación (El Fantroussi et al., 2005).

Para aumentar el potencial degradativo de la comunidad microbiana, el genoma introducido debe participar del proceso de flujo de la energía central (Dejonghe et al., 2001) y la sobrevivencia del organismo inoculado está íntimamente relacionada con la competencia por los recursos con las poblaciones autóctonas en los suelos contaminados (Cunliffe and Kertesz, 2006).

De modo que sería crítico realizar estudios que permitan comprender no solo como el inóculo afecta la estructura de la comunidad microbiana, sino también como el bioaumentación acomoda el grupo de microorganismos que participan en el flujo de energía total. Las técnicas basadas en m-RNA y la proteómica son particularmente prometedoras para cuantificar variaciones temporales en esos genomas (Dejonghe et al., 2001).

La diversidad microbiana puede ser investigada mediante diferentes aproximaciones. Partiendo de la biorremediación, la caracterización metabólica y filogenética de las bacterias que crecen a partir de determinados PAH es útil porque la información puede establecer la base para estimar que grupos bacterianos en un ambiente podrían ser más efectivos en la degradación de PAH.

Sin embargo la comunidad bacteriana en el proceso de biorremediación es todavía tratada como una caja negra (Iwamoto y Nasu 2001).

Nuestro conocimiento sobre el desarrollo de la comunidad bacteriana en ecosistemas de suelo contaminado expuesto a diferentes contaminantes orgánicos se ha limitado a los microorganismos cultivables (Kozdroj y van Elsas 2001; Bodour y col., 2003; Lors y col., 2004). Pero estos estudios solo dan cuenta de solo una pequeña fracción (1-10%) de todas las bacterias presentes (Amman y col., 1995). El desarrollo de métodos moleculares cultivo independiente hace posible estudiar la composición y dinámica de la comunidad bacteriana durante la biorremediación (Watanabe y Hamamura 2003).

La aplicación de técnicas moleculares para detectar e identificar microorganismos por ciertos marcadores celulares como el gen 16sRNA son cada vez mas utilizadas para estudiar la estructura de comunidades microbianas (Muyzer y Ramsing, 1995).

Los métodos basados en DNA y RNA permiten seguir el destino y actividad de un inoculante y evaluar los cambios en la composición de las bacterias indígenas durante el proceso de biorremediación. Estos cambios pueden resultar de la incorporación de una cepa o consorcio inoculado o de los cambios en la concentración de los contaminantes, sus metabolitos y su biodisponibilidad (Gomes y col., 2005).

Una mejor comprensión de la diversidad de las comunidades microbianas que habitan suelos contaminados con PAH y su respuesta a diferentes estrategias de bioaumentación o bioestimulación podría darnos pistas sobre el tipo de bacterias que son capaces de adaptarse y explotar esos habitats (Viñas y col., 2005).

The background of the page is a grayscale micrograph showing a dense field of biological cells. The cells are mostly oval or elongated in shape, with some showing internal structures like nuclei. The overall appearance is that of a tissue section or a cell culture under a microscope.

CAPITULO II

HIPOTESIS Y OBJETIVO

II. Hipótesis

- ◇ El bioaumentación es una estrategia que mejora la biodegradación de PAH en suelos recientemente contaminados.
- ◇ El éxito del bioaumentación depende de la selección de los microorganismos adecuados teniendo en cuenta sus propiedades metabólicas y ecológicas.
- ◇ Las cepas inoculadas deben no sólo establecerse en los suelos contaminados sino producir un cambio en la comunidad microbiana del suelo de acuerdo a las relaciones sintróficas establecidas.

Objetivo General

Determinar los efectos ecológicos de la inoculación sobre la diversidad microbiana del sitio blanco

En forma particular se plantearon los siguientes objetivos:

- Aislar y caracterizar bacterias degradadoras de PAH.
- Estudiar las propiedades metabólicas y ecológicas de las bacterias seleccionadas.
- Evaluar la efectividad de las estrategias de bioaumentación de suelos contaminados con PAH puros y mezclas con las cepas seleccionadas en distintos sistemas: biorreactores y microcosmos.



CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS

III. Materiales y Métodos

III.A. Materiales

III.A.1 Microorganismos

Como cepa de referencia para la determinación de agentes tensioactivos se utilizó *Alcanivorax borkumensis*. Este microorganismo se destaca por producir biosurfactantes y pertenece a la colección DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen) bajo el código: 11573T (Yakimov y col. 1998). La cepa fue cultivada en Marine broth (Difco) con el agregado de 0.1% de hexadecano en agitación (100 rpm) a 26 °C.

Como cepa de referencia para el screening de la presencia de plásmidos se utilizó *Rhizobium meliloti* (cedida gentilmente por Dr. Pistorio M.). Este microorganismo posee tres plásmidos (Pistorio M., comunicación personal). Esta fue cultivada en Luria Bertani broth en agitación (100 rpm) a 26 °C

III.A.2 Medios de cultivo

Caldo R2 (Reasoner y Geldreich, 1985)

Composición en g/l de agua bidestilada

0.5 g Extracto de levadura

0.5 g Proteosa peptona

0.5 g Acido casamino

0.5 g Glucosa

0.5 g Almidón

0.3 g Acido Pirúvico

0.3 g K_2HPO_4

0.05 g $MgSO_4$

El pH se ajusta a 7,2 con una solución de NaOH o HCl 10% y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

R2-Agar

Se agregan 15 g/l de agar (Difco) al medio de cultivo caldo R2.

Caldo R3

Composición en g/l de agua bidestilada

1 g Extracto de levadura
1 g Proteosa peptona
1 g Acido casamino
1 g Glucosa
1 g Almidón
0.5 g Acido Pirúvico
0.6 g K_2HPO_4
0.1 g $MgSO_4$

El pH se ajusta a 7,2 con una solución de NaOH o HCl 10% y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

R3-Agar

Se agregan 15 g/l de agar (Difco) al medio de cultivo caldo R3.

Medio Mineral Líquido (MML) (Vecchioli y col., 1990)

Composición en g/l de agua bidestilada

5 g NaCl
1 g K_2HPO_4
1 g $(NH_4)H_2PO_4$
1 g $(NH_4)_2SO_4$
0.2 g $MgSO_4$
3 g KNO_3

El pH se ajusta a 7,2 con una solución de NaOH o HCl 10% y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

MML con fenantreno (2000 mg/L). El medio fue preparado con la adición de 2000 mg/L de fenantreno luego de la esterilización.

MML con suelo estéril (5% m/v) y fenantreno 2000 mg/L; el medio fue preparado como se describe arriba con la adición de 5% (m/v) de suelo estéril contaminado con fenantreno luego de la esterilización, la cantidad de fenantreno agregada al suelo se realizó de modo que la concentración final en el medio de cultivo fuera de 2000 mg/L.

MML con suelo estéril (5% m/v), el medio fue preparado como se describe arriba sin la adición de fenantreno pero con la adición de suelo.

MMS

Se agregan 15 g/l de agar (Difco) al medio de cultivo caldo MML.

MMS + agarosa + PAH (Bogart y Hemmingsen, 1992)

Se agregan 200µl de una solución etanólica del hidrocarburo (8,5 mg/ml) a un tubo conteniendo 3,5 ml de agarosa al 1% previamente fundida y mantenida a 40° C y se mezcla en vortex. Inmediatamente se vuelca el contenido del tubo en una placa de Petri conteniendo una base de MMS..

RB-Agar (Agar Cooke Rose Bengal) (Martin, 1950)

Composición en g/l de agua bidestilada

5 g Bacto Soytone Difco

10 g de Bacto Dextrosa Mean

1 g K₂HPO₄

0.5 g MgSO₄

15 g Bacto Agar Merck

0.035 g Rojo de Bengala

El pH se ajusta a 6 con una solución de NaOH o HCl 10% y se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 minutos.

El medio es adicionado con 250 µg/l de sulfato de estreptomicina, como agente inhibidor del desarrollo bacteriano.

Mezcla de PAH en pentano

La mezcla contiene 0.005 g de fenantreno, 0.005 g de fluoreno, 0.005 g de antraceno y 0.005 g de dibenzotiofeno cada 13 ml de solvente (pentano).

III.A.3 Tierra

El suelo seleccionado para la preparación de los biorreactores fue un suelo libre de contaminación previa de un área cercana a la ciudad de Oldenburg, Alemania. Fue analizado en la Universidad de Oldenburg y mostró las siguientes propiedades fisicoquímicas: textura arenosa, pH: 4,9 , carbono orgánico: 3,5 %, materia orgánica: 4,9%, nitrógeno total: 0,2%, fósforo soluble: 0,00079 % .

El suelo seleccionado para la preparación de los microcosmos fue un suelo libre de contaminación previa de un área cercana a la ciudad de La Plata, Argentina. Fue analizado en el Laboratorio de Ciencias del Suelo de la Universidad de La Plata y mostró las siguientes propiedades fisicoquímicas: textura franco limosa, pH: 5,8 a 5,9, carbono orgánico: 3,6%,

materia orgánica: 6,21%, nitrógeno total: 0,296%, fósforo disponible: 0,00042 % y un contenido de hidrocarburos totales cromatografiables de 0,05 g kg⁻¹ de tierra seca.

III.B. Metodología

III.B.1 Aislamiento, selección y caracterización de una cepa bacteriana degradadora de PAH

III.B.1.i Aislamiento y caracterización de cultivos puros

Las cepas se obtuvieron de un experimento de biorremediación en suelo contaminado con 2000 mg/Kg de fenantreno incubado a T amb (20°C).

Fueron aislados los cultivos degradadores de hidrocarburos policíclicos aromáticos a partir de los pocillos positivos de las placas de microtitulación en la determinación de bacterias degradadoras de PAH realizados por el NMP usando el método descrito por Wrenn y Venosa, que se obtuvieron a diferentes tiempos del tratamiento de biorremediación. Como medio de subcultivo se utilizó R3-Agar.

Luego de sucesivos aislamientos la homogeneidad de los cultivos fue controlada microscópicamente y macroscópicamente.

III.B.1.ii Determinación del espectro degradador de hidrocarburos de los cultivos aislados

III.B.1.ii.a Determinación del espectro degradador de PAH

Se sembraron los cultivos en estría sobre una placa conteniendo MMS con el PAH según Bogart y Hemmingsen (1992). Los PAH utilizados fueron antaceno, dibenzotiofeno, fenantreno, fluoreno, y pireno.

Las placas se incubaron a 22±2°C durante 21 días.

Se consideró un cultivo aislado capaz de degradar PAH aquel que generó un halo translúcido (a causa del consumo del PAH) y/o color (proveniente de los productos de degradación), alrededor de la estría de siembra.

III.B.1.ii.b Confirmación del espectro degradador de PAH

Los cultivos puros fueron sembrados en MML suplementados con el hidrocarburo seleccionado como única fuente de carbono y energía.

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos ensayados en MML suplementado con 0,1% de cada PAH fueron: antaceno, dibenzotiofeno, fenantreno, fluoreno, y pireno. La capacidad

degradadora se determina por la aparición de turbidez y/o color desarrollado por los productos de degradación (Bogart y col., 1992).

III.B.1.iii **Caracterización e identificación de la cepa 20006FA**

III.B.1.iii.a *Caracterización morfológica*

Coloración de Gram

Colorantes

Cristal violeta (solución Britania) y Safranina (Solución Britania)

Soluciones diluidas

Las soluciones de colorantes se diluyeron 1/10 en agua destilada

Lugol: 10 g de Yodo y 20 g de IK en 1 litro de agua destilada

Decolorante: etanol 70%, acetona 30%

Protocolo:

	Tiempo de exposición
Cristal violeta	120
Lugol	30
Lugol	30
Lavado con agua	
Alcohol.acetona	10
Lavado con agua	
Safranina	120
Lavado con agua	

III.B.1.iii.b *Caracterización Bioquímica*

El cultivo seleccionado se caracterizó mediante las siguientes pruebas clásicas: crecimiento en cetrimide, crecimiento en medio citrato Simmons, Movilidad (observación de una gota de un cultivo de 24 hs entre porta y cubre).

Caracterización mediante el sistema de identificación *API-20ne bioMerieux (Francia)*

Esta batería incluye las siguientes pruebas: reducción de nitratos, utilización del Triptofano, fermentación de glucosa, arginina dihidrolasa, ureasa, hidrólisis de esculina, hidrólisis de gelatina, citocromo oxidasa, β -galactosidasa, crecimiento a partir de: glucosa, arabinosa, manosa, manitol, N-acetil-glucosamina, maltosa, gluconato, caprato, adipato, malato, citrato y fenil acetato.

Determinación del perfil de utilización de sustratos ECOplate

El perfil fisiológico de la cepa se analizó utilizando BIOLOG® ECOplate (BIOLOG, Inc., Hayward, CA). Tres replicas de diferentes diluciones de un cultivo puro de la cepa en R3A previamente lavados con solución fisiológica (SF) fueron sembradas. Las placas ECOplate se sembraron con alícuotas 125 µl conteniendo 1×10^4 UFC (según DO). Las placas se incubaron en la oscuridad a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 120hs. La utilización de sustratos fue monitoreada indirectamente midiendo la absorbancia a 590nm. Las lecturas para los sustratos individuales se procesaron sustrayendo el valor del blanco (posillo control). Los sustratos contenidos en la placa ECOplate son: Agua (pocillo control), β -methyl-D-glucoside, D-Galctonic Acid γ -Lactona, L-arginine, Pyruvic Acid Methyl Ester, D-Xylose, D-galacturonic acid, L-asparagine, Tween 40, L-erythritol, 2-Hydroxy Benzoic Acid, L-phenylalanine, Tween 82, D-Manitol, 4-Hydroxy Benzoic Acid, L-serine, α -Ciclodextrin, N-acetyl-D-glucosamine, γ -hydroxybutyric acid, L-threonine, Glycogen, D-Glucosaminic Acid, Itanoic Acid, Glycyl-L-glutamic acid, D-Cellobiose, Glucose-1-phosphate, α -Ketobutiric Acid, Phenylethylamine, α -D-Lactose, D, L- α -glycerol phosphate, D-Malic Acid, Putrescine.

III.B.1.iii.c Caracterización molecular

La extracción del DNA de la cepa se realizó utilizando el kit de Genomic-tips (20/G) de Qiagen (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA) para extracción y purificación de DNA bacteriano (Cat. 19060).

Se realizó la amplificación del DNA de la cepa seleccionada con primers específicos del genero *Sphingomonas*, Sphingo108F (5'_GCGTAACGCGTGGAATCTG-3') y GC-Sphingo420R (5'-CGCGGGCGGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCGCGGGGGGTTACAACCCTAAGGCCTTC-3') (Leys y col., 2005).

La reacción PCR contenía 1 µl del DNA de la cepa, 1 U de AmpliTaq, el buffer provisto por el fabricante de la enzima, 200 mM de BSA, 0.4 mM dNTPs y 20 pM de cada primer en un volumen de reacción total de 50 µl.

La amplificación se realizó en un termociclador Progene FPROGO5Y (Techne, Burlington, NY, USA). El programa incluyó un paso inicial de desnaturalización por 4 min. a 95°C , el primer paso del ciclo a 94°C por 30 seg.; 62°C por 45 seg.; y 1 min. a 72°C (10 ciclos), seguidos por un paso de 30 seg. a 94°C , 40 seg. a 57°C ; y 72°C por 1 min. (25 ciclos). La extensión final se llevó a cabo a 72°C por 10 min. El producto PCR fue analizado en una electroforesis en gel de agarosa. Como control negativo se utilizó una cepa de *Escherichia coli*.

III.B.1.iii.d **Secuenciación**

La amplificación del gen 16S rRNA completo de la cepa 20006FA se realizó utilizando los primers 27 f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492 r (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') (Edwards y col., 1989).

La reacción PCR contenía 1 µl del DNA de la cepa, 1 U de AmpliTaq, el buffer provisto por el fabricante de la enzima, 200 mM de BSA, 0.4 mM dNTPs y 20 pM de cada primer en un volumen de reacción total de 50 µl.

La amplificación se realizó en un termociclador Progene FPROGO5Y. El programa incluyó un paso inicial de desnaturalización por 4 min. a 95° C, el primer paso del ciclo a 94° C por 30 seg.; 62° C por 45 seg.; y 1 min. a 72° C (10 ciclos), seguidos por un paso de 30 seg. a 94° C, 40 seg. a 57° C; y 72° C por 1 min. (25 ciclos). La extensión final se llevó a cabo a 72° C por 10 min. El producto PCR fue analizado en una electroforesis en gel de agarosa.

El producto PCR se purificó utilizando el kit de purificación de productos PCR de Qiagen (Cat. 28104) y fue secuenciado por MWGAG Biotech sequence services (MWGAG Biotech, Ebersberg, Germany).

III.B.1.iv Análisis de la secuencia

III.B.1.iv.a Análisis por alineamiento

La secuencia se analizó por método de comparación utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tools), se obtuvieron los valores de similitud para el gen 16S rRNA de la cepa 20006FA con las secuencias de otras cepas disponibles en el Gen Bank. Las secuencias que mostraron una similitud mayor o igual al 95% se muestran en una tabla.

III.B.1.iv.b Análisis filogenético de la secuencia del gen 16S rRNA

De las secuencias alineadas en la sección anterior fueron seleccionadas aquellas pertenecientes a cepas degradadoras de PAH y se analizó la relación filogenética y evolutiva entre ellas utilizando el programa MEGA version 4 (Tamura y col., 2007).

III.B.1.v Determinación de las propiedades metabólicas de la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA

*III.B.1.v.a Capacidad de la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA de crecer utilizando distintos sustratos como única fuente de carbono y energía.*

Los cultivos se realizaron en:

-Medio Mineral Líquido (MML) + 2000 mg/L fenantreno

-Medio Mineral Líquido (MML) + 1000 mg/L pireno

-Medio Mineral Líquido (MML) + Salicilato de Sodio 1000 mg/L

Los cultivos se incubaron a 32° C en agitación (200 rpm).

La cinética de crecimiento se realizó determinando el número de ufc en R2-Agar, a distintos tiempos.

III.B.1.v.b Actividad mineralizante de PAH

Fueron preparados biorreactores conteniendo 150 ml de MML en frascos de vidrio de 300 ml de capacidad. Los PAH fueron agregados al medio en forma de cristales. Todos los sistemas se incubaron a 26±2°C (condiciones climáticas regionales) en agitación a 200rpm.

Se prepararon tres biorreactores por duplicado:

1-Biorreactores RF1 y RF2: con el agregado de 2000 mg/L de fenantreno (Carlo Erba, Milano, Italy, >99.5% pureza).

2- Biorreactores RP1 y RP2: con el agregado de 1000 mg/L de pireno (Carlo Erba, Milano, Italy, >99.5% pureza).

3- Biorreactores RFP: con el agregado de 2000 mg/L de fenantreno y 1000 mg/L de pireno.

Los biorreactores fueron inoculados con 1 x10⁶ ufc de la cepa 20006FA por ml.

En ellos se determinó la concentración de hidrocarburos residual y la producción de CO₂ on line.

III.B.1.v.c Determinación de la concentración de hidrocarburos en medio líquido

La concentración de PAH de los sistemas inoculados en MML suplementado con PAH se realizó por Cromatografía Gaseosa-FID (Vecchioli y col., 1997) previa extracción de los hidrocarburos presentes con el solvente n-hexano.

Las extracciones de los PAH remanentes se realizaron utilizando 10 ml de Hexano como solvente de extracción y 2 ml de hexadecano como Standard interno. Una vez agregado el Standard interno y el hexadecano, se dejó el cultivo en agitación por 30 minutos. Luego se separó la fase orgánica mediante ampolla de decantación; la fase acuosa se recuperó y se la sometió a una nueva extracción con el agregado de 10 ml de hexano; este procedimiento de extracción se repitió tres veces.

Las Cromatografías Gaseosas fueron realizadas en el grupo del Dr. Nardillo, en el laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de La Plata

III.B.1.v.d Determinación de la producción de CO₂ on-line

Se analizó la concentración de CO₂ en el gas (the exhaust gas) de cada columna (reactor) utilizando un analizador de gases (Fa. Sonos). La concentración de CO₂ en el

exhaust gas fue comparada con la que contiene el gas entrante y se calculó la tasa de producción de CO₂ (mg/lh) de acuerdo a Hulsch y Berthe-Corti (1994).

Hulsch R., Berthe-Corti L (1994) Methoden zur Prozesskontrolle bei geringer Sauerstoffzehrung im mikroaeroben Milieu. BioEngineering 1: 11-14).

III.B.1.v.e Determinación de la presencia de enzimas con actividad dioxigenasa

Se prepararon cultivos puros de la cepa en estudio en glucosa y en MML+ fenantreno. Se realizaron diluciones seriadas (1/10). Las diluciones se siembran en MMS previamente suplementado con Indol (500 mg/L) como única fuente de carbono y energía. Se siembra 0,1 ml de cada dilución en la superficie del medio de cultivo, por triplicado y se esparce con espátula de Drigalsky. Se deja incubar durante 10 días a 26 ± 2 °C. El resultado se expresa como a aparición de colonias de color azul en la placa, lo que indica que la colonia posee la enzima capaz de convertir el Indol en Índigo.

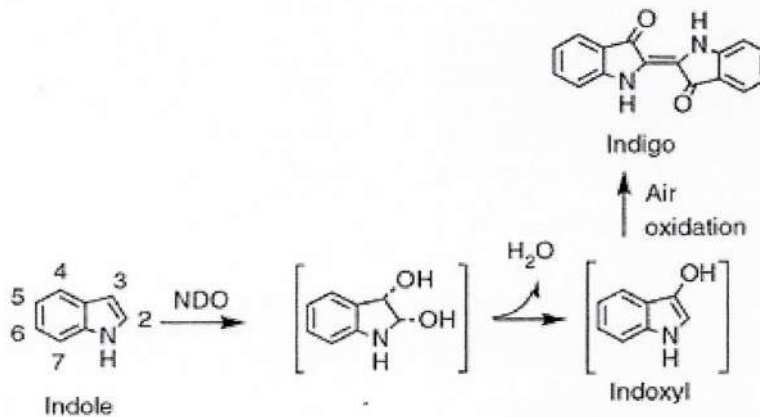


Figura III-1 : Conversión enzimática del Indol en Índigo

III.B.1.vi Determinación de las propiedades ecológicas de la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA

III.B.1.vi.a Determinación de la presencia de plásmidos

Minipreparación

Se lisaron 1,5 ml de un cultivo de 24 hs en R3A de *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA con Buffer I (Glucosa 50 mM, Tris/HCl 25 mM, EDTA 10 mM) y Buffer II (SDS 2 %, ...)

NaOH 0,4 N) recién preparado y mantenidos a temperatura ambiente por 5 minutos. Luego se agregó el buffer Buffer III (Acetato de sodio 3 M (pH: 4,8)) I y se incubó la muestra por 10 minutos a 4° C.

Se centrifugó el lisado (15 min.; 14000 rpm), se tomó el sobrenadante y se agregó isopropanol para precipitar el DNA plasmídico. Se realizó una incubación por 10min a 4 °C y se centrifugó 15 min a 14000 rpm. El pellet se lavó con EtOH.70 %, se secó al aire y se eluyó con 50 µl de H₂O bidestilada (Sambrook, Fritsch y Maniatis 1989).

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa 0,8 % por 60 min. a 100 V.

Método de Eckhardt

Este protocolo es adaptado en base a Meyers y col. (1976). Se preparó un gel de agarosa al 0,8% en buffer TBE (10,78 g/L Tris; 0,73/L g EDTA y 5,5 g/L de Acido Bórico) para realizar la electroforesis, sembrándose inicialmente 10 µl de Loading buffer (SDS 10% p/v y 0,01 g/L de Xyleno cyanole) en cada well y dejando correr el colorante con polaridad invertida a 100 volts durante 5 minutos.

A partir de cultivos de 24 hs en caldo R3, se tomaron 0.15, 0.25 y 0.5 ml y se centrifugaron durante 3 minutos a 13000 rpm, se desecharon los sobrenadantes y se resuspendieron los pellets en 0,5 ml de Sarcosinato de sodio (0,3%). Luego se centrifugaron y se descartaron los sobrenadantes y se resuspendieron los pellets en 15 µl de buffer Ficoll (2,92 g EDTA; 1,214 g de Tris; 200 g de Ficoll (Sigma)). Posteriormente se preparó el Buffer de Lisis (976 µl TE; 4 µl de RNAasa (100mg/ml); 10 µl de lisozima (100mg/ml) y 10 µl de Bromofenol (100mg/ml). Inmediatamente se agregaron 10 µl a la muestra y se sembraron 25 µl de la mezcla, de forma que la lisis ocurrió en la fosa del gel. La corrida se realizó durante 2 horas a 100 volts. El gel se coloreó con Bromuro de Etidio y se observó con luz UV

III.B.1.vi.b Determinación de la producción de agentes tensioactivos

Se utilizaron las cepas *S. paucimobilis* 20006FA y de *A. borkumensis*. Para este procedimiento *S. paucimobilis* 20006FA se cultivó en R3A y en MML con el agregado de fenantreno (2000 mg/L) y MML con el agregado de pireno 1000 kmg/L. *Alcanivorax borkumensis* se incubó en Medio marino (Difco) con el agregado del 0,1% de hexadecano. Los cultivos se incubaron a 32°C en agitación (100 rpm) . Se tomaron muestras de 10 ml de los cultivos a intervalos regulares durante 26 días, la alícuota tomada se centrifugó (8000 rpm, 10 min) para remover las células. Se determinó la tensión superficial del sobrenadante libre de células a cada intervalo de tiempo.

La tensión superficial de los sobrenadantes se determinó por dos métodos diferentes:

- El método del anillo: 10 ml del sobrenadante del cultivo se situaron en una caja de Petri y se midió la fuerza necesaria para despegar el anillo de la superficie del líquido, utilizando un tensiómetro de anillo modelo K10 (Willumsen y Karlson 1996). Cada determinación se repitió 5 veces. Las determinaciones se realizaron en condiciones standard.
- Método de la gota colapsada: 8 gotas (cada una de 5 μ l) del sobrenadante de los cultivos fueron colocadas en la tapa de una microplaca de 96 wells la cual había sido previamente cubierta con una delgada capa de hexadecano, y fue medido el diámetro de la gota (Jain y col., 1991).

Con ambos métodos se realizaron curvas de calibración con soluciones de SDS de concentración creciente, en los diferentes medios.

III.B.1.vi.c Análisis microscópico de la adhesión de S. paucimobilis 20006FA a cristales de fenantreno

(a) Preparación de muestras para microscopía de epifluorescencia

Se tomaron muestras de cultivos líquidos (MML + fenantreno) de 72 horas, las muestras se fijaron con 3 volúmenes de paraformaldehído PFA 4%, se almacenaron a 4° C por 4 horas y luego se lavaron tres veces con 1 volumen de buffer fosfato salino PBS (390 mM NaCl, 15%(v/v) buffer fosfato, pH 7.2-7.4) y se conservaron en una mezcla 1:1 de PBS:etanol a -20°C.

(b) Tinción con colorantes fluorescentes para DNA

Se depositaron 5 μ l de las muestras fijadas en portaobjetos "Diagnostika-OT - 8KA. Epoxy" (suministrados por Omnilab, Germany), se secaron en banco de flujo laminar por 30 min.

Posteriormente 4 μ l del fluorocromo Sybr Green (preparada en el medio de montaje Moviol) fueron agregados a cada muestra para la observación del DNA (Invitrogen Sybr®Green I nucleic acid gel stain Ex:498 nm Em:522 nm (verde).

Las muestras preparadas se analizaron con un microscopio de Zeiss Axioscop (Germany) equipado para la detección de fluorescencia con una lámpara de alta presión de Hg de 50W y filtros N° 01 (excitación 365nm, emisión 397 nm), N° 15 (excitación 546nm, emisión 590) y N° 38 (excitación 470 nm, emisión 525 nm).

(c) Preparación de muestras para Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se tomaron muestras de cultivos de *S. paucimobilis* 20006FA creciendo en R3A y MML suplementado con fenantreno 2000 mg/L a diferentes tiempos de incubación.

Las muestras se suspendieron en 0.85% de NaCl hasta una concentración final de 5%(m/v) de suelo, se fijaron con glutardialdehído, se lavaron dos veces con solución de buffer fosfato durante 15 minutos, se deshidrataron con etanol 30, 50, 70, 80, 90% y etanol absoluto durante 30 minutos con cada concentración de etanol y luego se secaron con CO₂ líquido y se cubrieron con platino para la determinación microscópica.

Las muestras fijadas se analizaron con un microscopio de barrido electrónico HITACHI S-3200N (Japan) en el grupo del Dr. Erhard Rhiel, Geomicrobiology, ICBM, Universidad de Oldenburg, Alemania.

(d) *Preparación de muestras para CLSM*

Se tomaron muestras de cultivos de 5 días de *S. paucimobilis* 20006FA creciendo en MML suplementado con fenantreno 2000 mg/L.

100 µl de las muestras frescas se depositaron en slides especiales conteniendo una cámara de incubación. Las muestras fueron teñidas con el fluorocromo Sybr Green, observadas con lentes de inmersión con 63×0.9 NA y 63×1,2 NA con un Microscopio laser confocal (Leica, Heidelberg, Germany) equipado con una fuente láser de Ar-Kr (488, 567 y 647nm) y una fuente láser UV (351 a 364 nm) y un set de filtros fijos en el sitio de detección. El microscopio fue manipulado mediante el software ScanWare version 5.10.

Las observaciones se realizaron en el grupo del Dr. Thomas Neu, en el Centro Helmholtz de investigaciones ambientales UFZ, Magdeburg, Alemania.

(e) *Análisis por unión de lectinas*

Se tomaron muestras de los cultivos de la cepa en estudio en MML con 2000 mg/L de fenantreno a los 5 días de incubación.

Se depositaron 100 µl de las muestras frescas en slides especiales conteniendo una cámara de incubación, estas fueron teñidas con Sybr Green para la localización celular e incubadas con soluciones de trabajo de las 5 lectinas marcadas por fluorescencia ConA, Pha-E, PNA, UEA 1 y WGA, para observación de residuos glucídicos (Neu, 2001).

La afinidad, el peso molecular y el fluorocromo contenido en las lectinas se muestra en la Tabla III.B-1.

Tabla III.B -1: Especificidad de lectinas

Lectina	Fluorocromo	Especificidad	Peso molecular(10^3)
UEA1	TRITC	α -L-Fucosa	68
Pha-E	TRITC	Galactosa	128
ConA	Cy5	α -D-Glucosa terminal	102
PNA	TRITC	β -Galactosa (1 \rightarrow 3)N-aceilgalactosamina	120
WGA	Texas red	N-Acetil- β -D-glucosamina, acetilacidoneuraminico y N-acetil muraminico	N-acido 36

III.B.2 Dinámica del proceso de biorremediación de suelos contaminados con fenantreno y estudio de los mecanismos de adhesión celular en ensayos de bioaumentación en biorreactores

III.B.2.i Preparación de biorreactores de suelo

El suelo seleccionado para la preparación de los biorreactores fue el suelo previamente descrito de un área cercana a la ciudad de Oldenburg, Alemania. Los microcosmos se prepararon conteniendo 500 gr. de suelo húmedo tamizado (2-mm poro) (correspondientes a 375 gr. de suelo seco) en biorreactores de acero inoxidable de 380 ml de capacidad. Los PAH fueron agregados al suelo en una solución de acetona (300 mg/ml) y mezclados manualmente con espátula. Todos los sistemas se incubaron a $20\pm 2^\circ\text{C}$ (condiciones climáticas regionales), en oscuridad y fueron aireados en forma previa a la determinación de consumo de O_2 y producción de CO_2 . La humedad fue corregida a $20\pm 2\%$ por adición de agua.

El suelo de las columnas conteniendo suelo estéril se autoclavó tres veces, con intervalos de 24 hs para permitir la germinación de esporas.

Se prepararon ocho biorreactores o columnas:

- Columna I: una fracción de 500 g de suelo húmedo fue contaminada con fenantreno (2000mg por Kg. de suelo seco).
- Columnas II y III: dos fracciones de 500 g de suelo húmedo fueron contaminadas con fenantreno (2000mg por Kg. de suelo seco) e inoculadas con una alícuota de un cultivo líquido

de 24 hs de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA en caldo nutritivo. La concentración del inóculo fue de 1.40×10^8 ufc por g de suelo seco.

-Columna IV: una fracción de 500 g de suelo húmedo fue inoculada con 1.40×10^8 ufc de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA por g de suelo seco.

-Columna V: una fracción de 500 g de suelo húmedo (no contaminada y no inoculada) se utilizó como control.

- Columna VI: una fracción de 500 g de suelo húmedo estéril fue inoculada con 1.40×10^8 ufc de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA por g de suelo seco.

- Columnas VII y VIII: dos fracciones de 500 g de suelo húmedo estéril fueron contaminadas con fenantreno (2000mg por kg de suelo seco) e inoculadas con una alícuota de un cultivo líquido de 24 hs de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA en caldo nutritivo. La concentración del inóculo fue de 1.40×10^8 ufc por g de suelo seco.

III.B.2.ii Preparación del inóculo

El inóculo fue cultivado en caldo nutritivo (Oxoid Ltd., England) diluido 1:2 a 30°C durante 24 h. El cultivo fue cosechado por centrifugación y el pellet fue lavado 2 veces con SF. El pellet fue resuspendido en SF y la densidad óptica a 580nm (OD_{580}) fue ajustada a 5 (7×10^9 cfu ml⁻¹ determinada por recuento en placa de diluciones seriadas).

III.B.2.iii Recuento de microorganismos viables

III.B.2.iii.a Preparación de las suspensiones microbianas

Se pesó una cantidad determinada de tierra, equivalente a 10 g de tierra seca y se homogenizó en 100 ml de solución fisiológica de NaCl (0.85%) estéril. Se llevó a un agitador rotatorio de 150 rpm durante 30 min.

Luego de sedimentar las partículas groseras de la suspensión, aproximadamente 5-10 min., el sobrenadante obtenido se considera representante del total de la comunidad microbiana incluyendo las células absorbidas sobre las pequeñas partículas de la suspensión de tierra.

Se realizaron diluciones seriadas (1/10) de la suspensión de tierra en solución fisiológica y a partir de ellas se determinó el número de microorganismos viables de las diferentes poblaciones:

Número de bacterias heterótrofas cultivables (BH) en R2 agar

Número mas probable (NMP) de bacterias degradadoras de hidrocarburos policíclicos aromáticos, en MML suplementado con una mezcla de PAH.

III.B.2.iii.b Número de unidades formadoras de colonias en superficie de medios sólidos (ufc/g tierra seca)

Se sembraron 0.1 ml de cada dilución en la superficie del medio de cultivo, por triplicado y se esparció con espátula de Drigalsky. Se dejó incubar durante 10 días a $22\pm 2^\circ$ C. El resultado se expresó como número de ufc/g de tierra seca (Reasoner y Geldreich, 1985)

III.B.2.iii.c Número mas probable de bacterias degradadoras de hidrocarburos policíclicos aromáticos en MML suplementado con una mezcla de PAH (MIX)

El NMP de bacterias degradadoras de PAH se determinó en placas de microtitulación de 96 pocillos (Wrenn y Venosa, 1996).

Se utilizó como sustrato la mezcla de PAH en pentano que se incorporó a razón de 20 μ l por pocillo. El pentano se evapora rápidamente, dejando una fina capa de los PAH en el fondo de cada pocillo. Posteriormente se cargaron los pocillos con 180 μ l de MML y con 20 μ l de las diluciones de la suspensión del sistema de tierra. Se sembraron diluciones seriadas (1/10) por octuplicado.

Las placas se incubaron a $22\pm 2^\circ$ C durante 21 días.

Luego del período de incubación se registraron los pocillos positivos, donde se observó una coloración del amarillo-naranja al marrón debido a la acumulación de los productos parciales de la oxidación de los sustratos aromáticos.

El valor de NMP/g se calculó mediante un programa de computadora que acepta mas combinaciones de replicados y diluciones que los publicados en tablas (Dr. Pablo Perez comunicación personal). El resultado se expresó como NMP de bacterias degradadoras de PAH/g de tierra seca.

III.B.2.iv Determinación de la concentración de hidrocarburos en tierra

La concentración de PAH en las muestras de suelo fue cuantificada por Cromatografía Gaseosa-FID (Vecchioli y col., 1997). Una muestra de suelo (25 g) fue mezclada con sulfato de sodio anhidro (25g) y los hidrocarburos fueron extraídos durante 6 hs con n-hexano en un Soxhlet, n-hexadecano (Merck, Schuchardt, Germany) fue agregado como standard interno.

III.B.2.v Determinación del contenido de humedad

Se determinó el peso constante luego del calentamiento de muestra de tierra a 105° C durante 24 h, y la diferencia se expresó como porcentaje de humedad.

III.B.2.vi Determinación de la producción de CO₂ on-line

Ver sección *III.B.1.d.ii*

III.B.2.vii Preparación de sistemas de suelo contaminado en suspensión

El suelo utilizado en la sección III.B.2.a fue esterilizado según se describe en esa misma sección. Luego fue contaminado con fenantreno y se prepararon sistemas en MML con suelo estéril contaminado al 5% (m/v). El fenantreno fue agregado la suelo de modo que la concentración final en el cultivo en suspensión fuera de 2000 mg/L. Estos sistemas fueron inoculados con 1.10^6 ufc/ml de la cepa en estudio.

III.B.2.viii Análisis microscópico de los mecanismos de adhesión celular de *S. paucimobilis* 20006FA a cristales de fenantreno

III.B.2.viii.a Preparación de muestras para microscopía de epifluorescencia

Se tomaron muestras de cultivos en MML+ Suelo estéril +fenantreno a distintos tiempos de incubación y muestras de suelo de las columnas los días 0, 7, 15, 20, 40 y 60 de tratamiento, las muestras se fijaron como se describió en la sección *III. B.1.e.i*.

Las muestras fueron tratadas para la visualización del DNA (teñidas con DAPI o Sybr Green) y para la visualización de rRNA y DNA (hibridizadas y teñidas con DAPI o Sybr Green).

III.B.2.viii.b Procedimiento de hibridización in situ

La hibridización fluorescente in situ se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Bruns y Berthe-Corti, 1998.

Un volumen de 5 μ l de las muestras fijadas se depositó en pocillos de portaobjetos previamente preparados.

Los portaobjetos "Diagnostika-OT - 8KA. Epoxy" se recubrieron con gelatina 0,1% y KCr (SO₄)₂ 0,01%, de manera de formar una fina capa de gelatina en la superficie donde se recortan pequeños discos formándose los pocillos.

Luego de depositadas las muestras, los portaobjetos se secaron en banco de flujo laminar por 30 min. y se deshidrataron en tres pasos con etanol 50, 80 y 96% (cada paso por 3 minutos). Luego se secaron en banco de flujo laminar. Cuando las muestras estuvieron secas se depositaron sobre ellas 7 µl de buffer de hibridización (3,5 % de formaldehído, 0,9 % de NaCl, 10mM de Tris/HCl, 0,01 % p/v de SDS (dodecil sulfato de sodio), pH: 7,4) mas 0,75 µl de una solución (100µg/ml) de la sonda oligonucleotídica dirigida al rRNA. El slide se colocó en una cámara de hibridización a 48° C por 1 hora (la cámara de hibridización es una cámara húmeda utilizada con el fin de evitar pérdidas de la solución por evaporación). Luego se frenó la reacción de hibridización con agua bidestilada previamente enfriada a 4° C y el slide se colocó en un buffer de lavado (20 mM deTris-HCl, 0,01 % p/v de SDS y 40mM deNaCl) durante 20 minutos a 48° C. Luego el slide se secó en la oscuridad.

Las muestras preparadas se analizaron con un microscopio de Epifluorescencia Zeiss, equipado para la detección de fluorescencia con una lámpara de alta presión de Hg de 50W y filtros 01 (excitación 365nm, emisión 397 nm) y 15 (excitación 546nm, emisión 590).

Se utilizaron las siguientes sondas para la hibridización del rRNA:

- sonda SPH-120 (con especificidad para el género *Sphingomonas*), marcada con el fluorocromo Texas Red (Thermo Electron Corporation) Ex: 589nm Em: 615 nm (red), posición de hibridización del 16S rRNA 120 - 137, secuencia 5'- GGG CAG ATT CCC ACG CGT -3' (Neef y col., 1999)
- sonda EUB 338 (con especificidad para el dominio Eubacteria), marcada con el fluorocromo Cy3 (Thermo Electron Corporation) Ex: 550 nm, Em: 570, posición de hibridización del 16S rRNA: 338 - 355, secuencia 5'- GCT GCC TCC CGT AGG AGT -3' (van Herwijnen y col., 2003).

III.B.2.viii.c Tinción con colorantes fluorescentes para DNA

Se depositaron 5 µl de las muestras fijadas en portaobjetos "Diagnostika-OT - 8KA. Epoxy" (suministrados por Omnilab, Germany), se secaron en banco de flujo laminar por 30 min.

Las muestras para la observación del DNA únicamente se tiñeron posteriormente al secado en flujo laminar. Las muestras para la observación del rRNA y del DNA, fueron hibridizadas según el protocolo anterior y posteriormente teñidas con los fluorocromos para DNA.

Para la tinción del DNA con DAPI (4',6-diamino-2-fenil-indol) (azul) se agregaron 4µl de un medio que evita la pérdida gradual de la señal sobre cada muestra. Este medio esta formado por una mezcla 1:1de DAPI:DABCO (1,4 dialzalbicio[2.2.2] octano en 1 ml de buffer fosfato y 9 ml de glicerina. (DAPI Ex: 358 nm Em:461 nm (blue)).

Para la tinción del DNA con Sybr Green se agregaron a cada muestra 4µl de la coloración Sybr Green (preparada en el medio de montaje Moviol).

Las muestras preparadas se analizaron con un microscopio de Epifluorescencia Zeiss.

III.B.2.viii.d Preparación de muestras para SEM

Se tomaron muestras de cultivos en MML+ Suelo estéril +fenantreno a distintos tiempos de incubación. Las muestras fueron tratadas como se describió en la sección y analizadas con un microscopio de barrido electrónico HITACHI S-3200N (Japan) en el grupo del Dr. Erhard Rhiel, en el Instituto de Química y Biología del Mar, ICBM, Universidad de Oldenburg, Alemania.

III.B.2.viii.e Preparación de muestras para CLSM

Se tomaron muestras de las columnas a los 7, 20 y 40 días de incubación. Las muestras fueron teñidas con el fluorocromo Sybr Green y observadas en un Microscopio laser confocal LEICA, en el grupo del Dr. Thomas Neu en el Centro de investigaciones ambientales de UFZ, Magdeburg, Alemania.

III.B.2.viii.f Análisis por unión de lectinas

Se tomaron muestras de cultivos de 5 días de *S. paucimobilis* 20006FA en MML +suelo estéril (5%) adicionado con 2000 mg/L de fenanteno. Se depositaron 100 µl de las muestras frescas en slides especiales conteniendo una cámara de incubación, estas fueron teñidas con Syber Green para la localización celular o incubadas con soluciones de trabajo de las 5 lectinas para observación de residuos glucídicos (Neu, 2006).

III.B.3 Efectos del inoculante *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA sobre la comunidad microbiana de suelo y sobre la biodegradación en suelos contaminados con PAH en microcosmos

III.B.3.i Preparación de microcosmos de suelo

El suelo seleccionado para la preparación de los microcosmos fue un suelo de un área cercana a la ciudad de La Plata, Argentina. Los microcosmos se prepararon por duplicado, conteniendo 1,5 kg de suelo tamizado (2-mm poro) en recipientes plásticos de 5 kg de capacidad. Los PAH fueron agregados al suelo en una solución de acetona (2000µl) y mezclados manualmente con espátula. Todos los sistemas se incubaron a 20±2°C

(condiciones climáticas regionales), en oscuridad y fueron aireados por mezclado semanal y la humedad fue corregida a $20\pm 2\%$ por adición de agua.

Se prepararon seis microcosmos:

1-Microcosmo "F2000": El suelo se contaminó con 2000mg de fenantreno (Carlo Erba, Milano, Italy, >99.5% pureza) por kg de tierra seca.

2-Microcosmo "P1000": El suelo se contaminó con 1000mg de pireno (Carlo Erba, Milano, Italy, >99.5% pureza) por kg de tierra seca

3-Microcosmo "F2000+P1000": El suelo se contaminó con 2000mg de fenantreno y 1000mg de pireno por kg de tierra seca.

4- Microcosmo "F2000+I": El suelo se contaminó con 2000mg de fenantreno por kg de tierra seca y el sistema fue inoculado con 1.40×10^8 ufc de la cepa 20006FA por g de suelo, a los 3, 10, y 17 días después de que el fenantreno fue agregado al suelo.

5- Microcosmo "F2000+P1000+I": El suelo se contaminó con 2000mg de fenantreno y 1000mg de pireno por kg de tierra seca y el sistema fue inoculado con 1.40×10^8 ufc de la cepa 20006FA por g de suelo, a los 3, 10, y 17 días después de que los hidrocarburos fueron agregados al suelo.

Como microcosmo control se utilizó suelo sin agregado de fenantreno. Además un sistema contaminado con fenantreno fue adicionado con HgCl_2 (1.5 % p/p) (Song y col., 1990) como control de pérdida abiótica del contaminante.

Los sistemas se monitorearon durante 140 días.

III.B.3.ii Preparación del inóculo

Ver sección III.B.2.b

III.B.3.iii Recuento de microorganismos viables

III.B.3.iii.a Preparación de las suspensiones microbianas

ver sección III.B.2.c.i

III.B.3.iii.b Numero de unidades formadoras de colonias en superficie de medios sólidos (UFC/g tierra seca)

ver sección III.B.2.c.ii

III.B.3.iii.c Número mas probable de bacterias degradadoras de hidrocarburos policíclicos aromáticos en MML suplementado con una mezcla de PAH (MIX)

ver sección III.B.2.c.iii

III.B.3.iii.d Número de hongos en RB-Agar suplementado con estreptomicina

Se sembraron 0.1 ml de cada dilución en la superficie del medio RB-Agar esparciendo con la espátula de Drigalsky. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Las placas se incubaron a $22 \pm 2^\circ$ C durante 5 días. El resultado se expresó como el número de UFC/g de tierra seca.

III.B.3.iv Determinación de la concentración de hidrocarburos en tierra

Ver sección III.B.2.d

III.B.3.v Determinación de la producción de CO₂**Biometers**

La producción de CO₂ se determinó por el método de frascos biometer (Bartha y Pramer, 1965). Se colocaron tres replicas de cada sistema en un biometer (50 gramos de tierra seca); el CO₂ producido se atrapó en 10 ml de 0.6 M KOH. Los frascos se incubaron a $20 \pm 2^\circ$ C. Después de 48 el KOH se reemplazó por una solución fresca KOH. El KOH removido fue titulado hasta el punto final utilizando fenolftaleína como indicador, con una solución estándar de HCl. La producción de CO₂ se determinó durante los primeros 46 días de tratamiento.

III.B.3.vi Determinación del perfil de utilización de sustratos ECOplate

El perfil fisiológico de las comunidades microbianas en los microcosmos de suelo se analizó utilizando BIOLOG® ECOplate (BIOLOG, Inc., Hayward, CA) a diferentes tiempos de incubación diferentes. Tres replicas de suspensiones de suelo en SF fueron sembradas. Las placas ECOplate se sembraron con alícuotas 125 µl conteniendo 1×10^4 UFC (DO). Las placas se incubaron en la oscuridad a $20 \pm 2^\circ$ C durante 120hs. La utilización de sustratos fue monitoreada indirectamente midiendo la absorbancia a 590nm. Las lecturas para los sustratos individuales se procesaron sustrayendo el valor del blanco (posillo control). Las variaciones en los patrones de las comunidades de suelo entre diferentes tratamientos se calcularon aplicando el análisis de los componentes principales (PCA). Se utilizó el software 5.0 Systat bajo Windows (Evanston, IL, U.S.A) .

III.B.3.vii **Actividad microbiana de deshidrogenasas**

El método mide la actividad deshidrogenasa de las células intactas. El Tricloruro de 2,3,5-trifenil-2H-tetrazolium, TTC (sustrato) es reducido a a Trifenilformazan (TPF) que es detectado colorimétricamente a 546nm (Thalman, 1968, Andreoni y col., 2004; Baran y col., 2004). En el procedimiento se pesan 5g de tierra húmeda en frascos de 50ml de capacidad y se agregan 5 ml de una solución de TTC preparada al 1% en buffer Tris (100mM). El pH del buffer utilizado varía según el pH de la muestra. Para suelos ácidos se utiliza buffer pH 7,7; para suelos neutros pH 7,6 y para suelos alcalinos pH 7,4. La determinación se realiza por triplicado. Como blanco de la reacción se incubó la muestra con buffer sin el agregado de la solución de TTC. Los frascos cerrados son incubados a 30° C durante 24 hs. Luego de transcurrido el tiempo de incubación se frena la reacción con 40ml de acetona. Se dejan en la oscuridad durante 2 hs agitándose cada 30 minutos. Posteriormente una porción del extracto de la muestra de tierra es filtrado y leída su absorbancia a 546 nm contra el extracto correspondiente al blanco. Debido a la sensibilidad frente a la luz de las soluciones de TTC el procedimiento se realiza bajo luz difusa.

Los resultados son expresados como μg . De TPF producido por gramo seco de tierra utilizando una curva de calibración.

Realización de la curva de calibración

Se prepara una solución estándar de 50 mg de TPF disuelto en 100ml de acetona. A partir de esta solución se transfieren 0,5-1,0- 2,0- 3,0 y 4,0 ml a los respectivos matraces de 50ml de capacidad. Se le agrega a todos 8,3 ml de buffer pH 7,6 y se enrasan a volumen con acetona.

A continuación se mide la absorbancia (OD) de las soluciones de 546nm, correspondiendo a 5,10, 20, 30 y 40 μg de TPF/ml respectivamente.

III.B.3.viii **Determinación de los perfiles de 16SrDNA por DGGE**

III.B.3.viii.a *Extracción de DNA total de suelo*

La extracción del DNA total se realizó según la técnica de lisis directa en el suelo, sobre 1 g de suelo de cada microcosmo a distintos tiempos de tratamiento como describe Kuske y col. (1997).

Se mezclaron vigorosamente 1g de muestra con 2,25 ml de buffer TE (10mM Tris (pH.8), 1mM EDTA disódico) y 0,5 ml de SDS (10% (p/v)), luego se incubó la mezcla durante 1 hora en baño de agua a 70C°. Durante la incubación la muestra fue agitada a intervalos de 15 minutos en vortex. Luego de la incubación, se agregaron 3 g de perlas de vidrio (\varnothing 710-1,180

µm) y se agitó en vortex 4 veces durante 1 minuto, en los intervalos las muestras se colocaron en baño de hielo.

Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante. Se agregaron 3 alícuotas de la mezcla cloroformo:isoamil alcohol (24:1) para la separación de proteínas que pudieran interferir en el protocolo de PCR posterior, luego de lo cual se centrifugaron las muestras a 5000rpm durante 5 minutos y se retiró la fase orgánica con pipeta, descartándose.

Luego se precipitó en DNA con acetato de amonio al 10% (pH:5-6) y etanol absoluto.

Se guardaron las muestras en freezer a -20°C durante 2 hs y luego se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con etanol 70%, se secó y se resuspendió en 100 µl de buffer TE.

El DNA obtenido fue purificado de ácidos húmicos utilizando Genomic-tips (20/G) de Qiagen (Cat. 19060). Después de la purificación 1µl de cada muestra y varios estándares fueron colocados en un gel de agarosa conteniendo bromuro de etidio y observadas en un transiluminador UV. La cantidad de DNA mostró ser mayor a 500 ng.µl en todas las muestras en comparación con los estándares.

III.B.3.viii.b Amplificación por PCR

La reacción PCR se llevó cabo utilizando dos sets de primers:

1-Primers para Eubacterias: GC41F (5'CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGC
CGCCCCCGCCCCCTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') y 907R (5'-CCGTC AA TT CC
TTTGAGTTT-3') (Muyzer y col., 1998)

2- Primers específicos para Sphingomonas: Sphingo108F (5'_GCGTAACGCGT
GGGAATCTG-3') and GC-Sphingo420R (5'-CGCGGGCGGGCGCGGGCGGGC
GGGGCGGGGGCGCGGGGGG TTACAACCCTAAGGCCTTC-3') (Leys y col., 2005)

La reacción PCR contenía 1 µl del DNA total de la comunidad, 1 U de la enzima AmpliTaq, el buffer provisto por el fabricante de la enzima, 200 mM de BSA, 0.4 mM dNTPs y 20 pM de cada primer en un volumen de reacción total de 50 µl.

La amplificación se realizó en un termociclador Progene FPROGO5Y (Techne, Burlington, NY, USA). El programa incluyó un paso inicial de desnaturalización por 4 min. a 95° C, el primer paso del ciclo a 94° C por 30 seg.; 62° C por 45 seg.; y 1 min. a 72° C (10 ciclos), seguidos por un paso de 30 seg. a 94° C, 40 seg. a 57° C; y 72° C por 1 min. (25 ciclos). La extensión final se llevó a cabo a 72° C por 10 min. El producto PCR fue analizado en una electroforesis en gel de agarosa.

III.B.3.viii.c DGGE

La DGGE (Electroforesis en gel con gradiente desnaturante) fue realizada en un sistema BioRad D GENE (BioRad, Munich, Germany). Los productos PCR purificados fueron directamente aplicados en un gel de poliacrilamida 6% (p vol⁻¹)(acrilamida-N,N'-metilénbisacrilamida, 37.5:1). El gel contenía un gradiente lineal 35 a 65% desnaturante (100% desnaturante corresponde a urea 7 M y 40% (vol vol⁻¹) de formamida.

La electroforesis fue realizada en buffer TAE 1 × (20 mM Tris acetato (pH 7.4), 10 mM acetato de sodio, 0.5 mM Na₂EDTA), a una temperatura de 60° C. Una precorrida a 50V por 30 min. fue seguida de la corrida principal a un voltaje constante de 100V por 16 h. Luego de la electroforesis el gel fue teñido por 1h con bromuro de etidio y analizada en el software Gelcompare II (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Se determinó la densidad óptica de las bandas y se transformó en un densitograma. Esos perfiles de densidad fueron la base para calcular una matriz de similitud utilizando la correlación de Pearson's (Pearson K., 1926). Se calcula el dendograma por el método de un Unweighted Pair Group Method con Arithmetic mean (UPGMA) (Song y col., 1990).

III.C. Análisis estadístico

Se calcularon los valores promedios y las desviaciones estándar de tres o mas réplicas en los valores de la degradación de PAH, el tamaño de la poblaciones de bacterias heterótrofas y degradadoras, el análisis de la actividad biológica y la producción de agentes tensioactivos.

Los valores promedio fueron comparados por el test de análisis de varianza (ANOVA) P<0,05.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software 5.0 Systat[®] bajo Windows.

A grayscale micrograph showing numerous rod-shaped bacteria, likely Sphingomonas paucimobilis, scattered across the field of view. The bacteria are oriented in various directions, some appearing as single rods and others in small clusters. The background is a mottled, light gray color.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

Aislamiento, selección y caracterización de una cepa bacteriana degradadora de PAH:

Sphingomonas paucimobilis 20006FA

IV. Aislamiento, selección y caracterización de una cepa bacteriana degradadora de PAH: *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA

El éxito del bioaumentación depende de la selección de cepas microbianas apropiadas. Sin embargo hasta ahora la selección de inoculantes ha sido basada en un simple criterio clave, máxima degradación o capacidad de mineralización, sin consideración de la habilidad potencial de la cepa de sobrevivir y estar activa después de la inoculación en el suelo (Thompson y col., 2005).

En el caso de suelos contaminados con PAH, la persistencia y actividad del microorganismo introducido no solo dependerá de las condiciones bióticas y abióticas del sitio contaminado. Importantes características de las cepas degradadoras de PAH incluyen movilidad, capacidad de adhesión a superficies sólidas y producción de biosurfactantes, ya que constituyen estrategias bacterianas para aumentar la biodisponibilidad de los PAH (Johnsen y col., 2005).

IV.A. Aislamiento, selección y caracterización de poblaciones bacterianas degradadoras de PAH

Para la selección de microorganismos degradadores fueron utilizados microcosmos de suelo contaminado con fenantreno (PAH de 3 ciclos bencenos), por ser el PAH que se encontraba en mayor concentración en un residuo petroquímico de composición mayoritariamente aromática, cuyas características químicas, toxicológicas y su biodegradación en suelo habían sido estudiadas previamente (Vecchioli, 1998; Morelli, 1999; Del Panno 2003).

IV.A.1 Aislamiento y selección de poblaciones bacterianas degradadoras de PAH

El aislamiento de bacterias degradadoras de PAH se realizó a partir de microcosmos de suelos contaminados con distintas concentraciones de fenantreno: 1000 mg (F-1000) y 2000 mg (F-2000) de fenantreno por Kg de tierra seca. Sobre estos microcosmos periódicamente se realizaron recuentos en placa de bacterias degradadoras de fenantreno (Bogart y Hemmingsen, 1992) y recuento de bacterias degradadoras de una mezcla PAH por la técnica del NMP (Wrenn y Venosa, 1996). A partir de las colonias que mostraron halo claro en las placas de MMS suplementadas con fenantreno y/o de los pocillos del NMP que mostraron la aparición de productos de degradación coloreados, se realizaron aislamientos en placas de R3A

Los cultivos aislados se caracterizaron macroscópicamente y se determinó su espectro de degradación de PAH (antraceno, dibenzotiofeno, fenantreno, fluoreno y pireno) (Tabla IV-1) en placas de MMS suplementadas con PAH, la capacidad degradadora se determinó por la aparición de un halo claro alrededor de las colonias y/o la aparición de productos de degradación coloreados. La confirmación del espectro de degradación se realizó en MML suplementado con cada PAH como única fuente de carbono y energía, se observó turbidez y/o la formación de productos coloreados derivados del metabolismo (Foto IV-1).



Foto IV-1: Imagen de la variedad de colores que se pueden obtener de los productos de degradación de PAH en medio líquido

Fueron aislados 40 cultivos de los cuales 19 evidenciaron la capacidad de degradar al menos un PAH (Tabla IV-1). La mayoría de los cultivos degradadores fueron aislados luego de 21 días de haberse incorporado el fenantreno a la tierra y hasta 6 meses después (cuando la concentración de fenantreno no era detectable en los sistemas). Finalmente 10 cultivos fueron considerados con características interesantes por degradar 3 o más PAH (remarcados en amarillo en la Tabla IV-1). De estos 10 cultivos, 3 eran bacilos Gram (+) pleomórficos, con capacidad de degradar pireno y los restantes eran bacilos Gram (-). Estos cultivos se mantienen a -80°C .



Foto IV-2: Imagen del halo de degradación producido por una estría de la cepa 20006FA en una placa de MMS suplementada con fenantreno

El cultivo Gram (-) 20006FA, aislado luego de 59 días de tratamiento del microcosmo F-2000, mostró un amplio espectro degradador de PAH (antraceno, dibenzotiofeno y fenantreno) (Tabla IV-1), produciendo halos de degradación significativamente mayores a los visualizados con las otras cepas (Foto IV-2) cuando se analizó la degradación de fenantreno en placa, y evidenció una mayor velocidad en la aparición de productos de degradación coloreados en medio líquido. Este cultivo además demostró crecer rápidamente en medios de cultivo de laboratorio, a 32° C y a temperatura ambiente, y mantener su propiedad degradadora luego de repiques sucesivos. Por lo tanto el cultivo 20006FA fue seleccionado para la realización de una caracterización exhaustiva metabólica y ecológica.

Tabla IV-1: Caracterización macroscópica y espectro de degradación de PAH de los cultivos aislados de suelos contaminados con fenantreno (1000 y 2000 mg/Kg de suelo seco) a distintos días de tratamiento. En amarillo se resaltan los cultivos considerados con características interesantes por degradar 3 o más PAH. (-) = ausencia de degradación, (+) = degradación positiva

Cultivos aislados	Días de tratamiento	Caracterización Macroscópica	Degradación de				
			Antraceno	Dibenzotiofeno	Fenantreno	Fluoreno	Pireno
5BT	21	Transparente celeste, pequeña	-	+	-	+	-
5BCr	21	Blanca irregular	-	-	-	-	-
5FT	21	Transparente, pequeña	-	-	-	-	-
5FCr	21	Cremosa, blanca	-	-	-	-	-
5HT	21	Transparente, pequeña	-	-	-	+	+
5HCr	21	Cremosa blanca	-	-	-	-	-
6E	21	Cremosa blanca	-	+	+	-	+
4EGr	28	Amarillo	-	-	-	-	-
4E Ch	28	Blanca, irregular	-	-	-	+	-
4GCr	28	Cremosa blanca, irregular	+	-	+	-	-
4GT Ch	28	Transparente, pequeña	-	-	-	-	-
4GT	28	Transparente	-	-	-	-	-
4GF	28	Fluorescente	-	-	+	-	-
5F Cr	28	Cremosa, blanca	-	-	-	-	-
5FT	28	Transparente	-	+	+	-	-
3DA	35	Cremosa, blanco-amarillenta	-	-	-	-	-
3DT	35	Transparente	-	-	-	-	-
4AT	35	Transparente	-	-	-	-	-

4AB	35	Cremosa, blanca	-	-	-	-	-
4F	35	Cremosa salmón	-	+	+	+	-
5F	35	Cremosa salmón	+	+	+	-	-
6F	35	Cremosa salmón	+	-	-	+	+
7G Ch	35	Cremosa, blanca	-	-	-	-	-
7GGr	35	Cremosa, blanca	+	-	-	-	-
3A	59	Cremosa, centro denso	-	-	-	-	-
3B Ch	59	Blanca, chiquita	-	-	-	-	-
3BGr	59	Blanca-transparente	-	-	-	-	-
3DCh	59	Amarilla, chiquita	-	-	-	-	-
3DGr	59	Blanca-transparente, irregular	-	-	-	-	-
3HT	59	Blanca-transparente	-	-	-	-	-
4EA	59	Brillante, amarillo-naranja	+	+	+	-	-
4EB	59	Cremosa, blanca	-	-	-	-	-
4FR	59	Cremosa, rosada	-	-	-	-	-
2000 6FA	59	Brillante, amarillo-naranja	+	+	+	-	-
2000 6FB	59	Cremosa blanca	+	+	+	-	-
4FB	59	Cremosa, blanca	-	-	-	-	-
5EA	94	Transparente amarilla	-	+	+	+	-
5HB	94	Cremosa blanca	-	+	-	+	-
5EB	94	Cremosa blanca	-	+	+	+	+
C 6EB	139	Verde, irregular	-	+	+	-	+
A 5DT	139	Transparente, irregular	-	+	+	-	+

IV.A.2 Caracterización e identificación de la cepa 20006FA

La Foto IV-3 muestra las características macroscópicas de las colonias de la cepa 20006FA en placas con medio R3A. Se observan colonias pequeñas, brillantes, lisas y de color amarillo/naranja. Mediante observaciones microscópicas se determinó que las células eran bacilos Gram-negativas de 0,4-0,6 x 1,5 μm (determinado por SEM) (Foto IV-4) y móviles (observación en fresco entre porta y cubre).



Foto IV-3: Características macroscópicas de las colonias de la cepa 20006FA en placas con medio R3A

La Tabla IV-2 muestra la caracterización morfológica y bioquímica de la cepa en estudio, las mismas fueron realizadas por duplicado.

La cepa 20006FA mostró características morfológicas y bioquímicas que permitieron relacionarla con el género *Sphingomonas* (Balkwill y col., 1997; Yabuuchi y col., 1990 y 2002) (Tabla IV-2). Se trata de microorganismos de crecimiento estrictamente aeróbico y quimio-organotrófico, catalasa y oxidasa positivo, que utilizan la glucosa por vía oxidativa y no son capaces de reducir el nitrato.

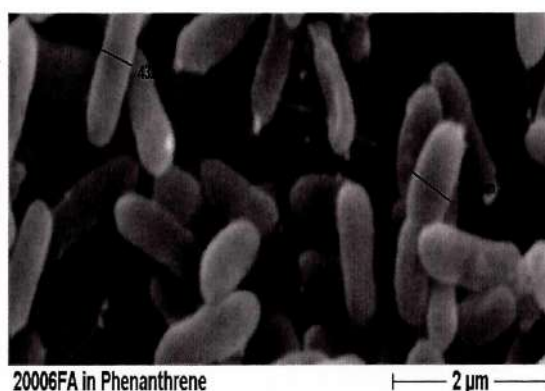


Foto IV-4: Medidas de las células de la cepa 20006FA tomadas con un microscopio electrónico de barrido

La habilidad de la cepa 20006FA aislada para degradar distintas fuentes de carbono fue testada utilizando el sistema Biolog ECOplate, el cual provee 31 fuentes de carbono diferentes y ambientalmente relevantes para el consumo bacteriano. Luego de la incubación no se observaron pocillos coloreados (indicador de actividades oxidativas).

Tabla IV-2: Características morfológicas y bioquímicas de la cepa 20006FA en comparación con el género *Sphingomonas* según Balkwill (1997) y Yabuuchi (1990) (+) = prueba positiva, (-) = prueba negativa

Característica	20006FA	Género <i>Sphingomonas</i>
Forma de la célula / Gram	Bacilo Gram-negativo	Bacilo Gram-negativo
Movilidad	+	+
Color de la colonia	amarillo/naranja	amarillo/naranja
Crecimiento en Agar Cetrimide	+	+
Crecimiento en medio de Simons	+	+
Reducción de NO ₃ ⁻	-	-
Utilización de Triptofano	-	-
Fermentación de Glucosa	-	-
Actividad Arginina dihidrolasa	-	-
Actividad Ureasa	-	-
Hidrólisis de Esculina	-	+
Hidrólisis de Gelatina	-	-
Actividad Oxidasa	+	+
P-Nitrofenil-b-D-galactopiranosido	-	+
Crecimiento a partir de:		
Glucosa	+	+
Arabinosa	+	+
Manosa	-	+
Manitol	-	-
N-Acetilglucosamina	-	-
Maltosa	+	+
Gluconato	dudoso	-
Caprato	-	-
Adipato	-	-
Malato	-	-
Citrato	-	-
Fenil-acetato	-	-

La confirmación del género se realizó utilizando primers específicos dirigidos al gen 16S rRNA de *Sphingomonas* diseñados por Leys y col. (2004). La obtención de productos de amplificación de entre 300 y 400 pb (Fig. IV-5) a partir de DNA de la cepa permitió la identificación de la cepa como *Sphingomonas* sp.

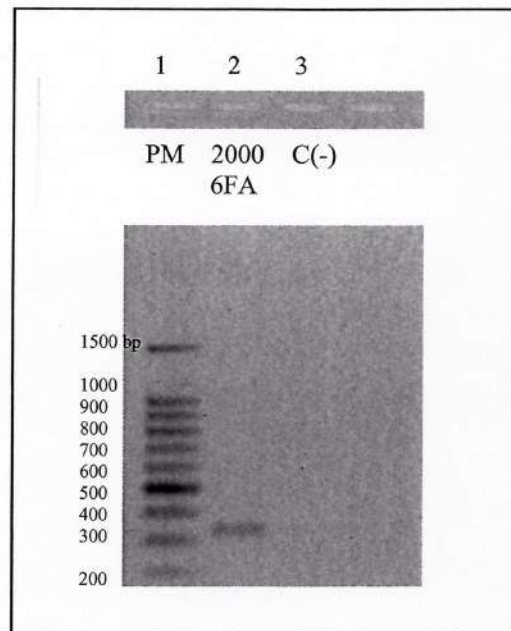


Figura IV-1: Electroforesis en gel de azarosa de los productos de amplificación obtenidos utilizando los primers específicos dirigidos al gen 16S rRNA de *Sphingomonas* (Leys y col., 2005), línea 1: marcador de peso molecular, línea 2: Cepa 20006FA, línea 3: *Escherichia coli* (control negativo)

Posteriormente se amplificó, purificó y secuenció el gen 16S rRNA completo de la cepa 20006FA (Edwards y col., 1989). Se muestra la secuencia del gen 16S rRNA de la cepa 20006FA obtenida a partir del fragmento amplificado:

```

5'TACATGCAAGTCGAACGAGCCTTTCGGGGCTAGTGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTGGGAATCTGCCCTTGGGTTCCGAAT
AACGTCTGGAAACGGACGCTAATACCGGATGATGACGAAAGTCCAAAGATTTATCGCCCAGGGATGAGCCCCGCTAGGATTAG
CTAGTTGGTGAAGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCCTTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACAC
GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGAGTGAT
GAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCTCTTTTACCCGGGATGATAATGACAGTACCGGGAGAATAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGGAATTAAGCGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGCGGATTTAAGTCAGA
GGTGAAAGCCCCGGGGCTCAACCCCGGAATAGCCTTTGAGACTGGATTGCTTGAACATCGGAGAGGTGAGTGGAATCCGAGT
GTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGACGATTGTTGACGCTGAGGTGCGAA
AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGATAACTAGCTGCTGGGGCTCATGGAGTTT
CGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTATCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCTG
CACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAACGTTTGACATCCTCATCGCGATTCCAGAG
ATGGATTTCTTCAGTTCGGCTGGATGAGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTC
CCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCTTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGTAAGTCTAAAGGAACCGCCGGTGATAAGCCGGAGGAA
GGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTACGCGTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGACTACAGTGGGCAGCGAC
CATGCGAGTGGAAGCTAATCTCCAAAAGTCGTCTCAGTTCGGATTGTTCTCTGCAACTCGAGAGCATGAAGGCGGAATCGCTAG
TAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCAGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTGGTTTCACC
CGAAGGCAGTGCGCTAACCGCAAGGAGGCAGCTGACCACGGTGAT3'
    
```

IV.A.3 Análisis de la secuencia

Luego de analizar la secuencia por método de comparación utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tools), se obtuvieron los valores de similitud para el gen 16S rRNA de la cepa 20006FA, los cuales se muestran en la Tabla IV-3.

La inscripción de la secuencia en el GenBank (DQ400860) reveló que la cepa esta relacionada en un 99% con *Sphingomonas paucimobilis*. Por lo que la cepa fue identificada como *Sphingomonas paucimobilis*.

De las cepas con mayor similitud (95% o más), solo 24 resultaron degradadoras de PAH (remarcadas en celeste en la Tabla IV-3).

Análisis filogenético de las secuencia del gen 16sRNA de *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA

La relación filogenética de las veinticuatro cepas degradadoras de PAH relacionadas con *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA según el Gen Bank fue inferida a partir de la comparación de las secuencias del gen 16S rRNA utilizando el programa Mega version 4 (Tamura y col., 2007). La construcción de un árbol filogenético (Fig. IV-2), a partir de las matrices de distancia y de parsimonia, muestra la relación filogenética de la cepa 20006FA con cepas degradadoras de PAH pertenecientes a los géneros *Sphingobium* y *Sphingomonas*. La cepa 20006FA integra un distintivo cluster junto con otras seis cepas, de las cuales tres aislados han sido clasificados como *S. paucimobilis*. El cluster descrito no comprende a la cepa *Sphingomonas paucimobilis* EPA505, que dentro del género *Sphingomonas* ha sido hasta el momento la cepa degradadora de PAH mejor caracterizada, la cual forma un rama separada dentro del cluster remarcado con color en la figura IV-2.

La Tabla IV-4 muestra algunas características de las cepas de *Sphingomonas* degradadoras de PAH filogenéticamente mas cercanas a la cepa 20006FA agrupadas en el cluster remarcado en la figura IV-2.

Tabla IV-3 : Secuencias de cepas que producen alineamientos significativos con la secuencia de la cepa 20006FA

Código de acceso al GenBank	Descripción	Cobertura de búsqueda	Max identidad con 20006FA
AY367017.1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> isolate 12H6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	100%
AY367016.1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> isolate Sg6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	100%
AY367015.1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> isolate Sg5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	100%
DQ092757.1	<i>Sphingobium</i> sp. RL-2005 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	100%
DQ238831.1	<i>Sphingobium</i> sp. VM2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	99%
AF494538.1	<i>Sphingomonas</i> sp. BPC4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	99%
X94100.1	<i>S. paucimobilis</i> 16S ribosomal RNA	99%	97%
U37341.1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> isolate EPA 505 16S ribosomal RNA (rrn) gene, partial sequence	99%	97%
AF025350.1	<i>Sphingomonas</i> sp. BRW2 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	97%
AJ698833.1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> partial 16S rRNA gene, isolate 21C	91%	99%
EF065102.1	<i>Sphingobium herbicidovorans</i> strain FL 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AY646154.1	<i>Sphingomonas</i> sp. 3Y 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AY512602.1	<i>Sphingomonas</i> sp. A1-13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AY460123.1	<i>Sphingomonas</i> sp. ZL5 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	96%
AB187215.1	<i>Sphingomonas</i> sp. SS86 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	99%	96%
AB022428.1	<i>Sphingomonas herbicidovorans</i> gene for 16S rRNA, partial sequence	99%	96%
EF465534.1	<i>Sphingobium rhizovicinus</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
DQ659593.1	<i>Sphingomonas</i> sp. Zp1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
EU004850.1	<i>Sphingomonas</i> sp. PWE1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
DQ336998.1	Uncultured bacterium clone EV818CFSSAHH56 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AF039168.1	<i>Sphingobium japonicum</i> strain UT26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AY349412.1	<i>Sphingomonas</i> sp. oral clone FZ016 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AF395036.1	<i>Sphingomonas</i> sp. G296-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AB042233.1	<i>Sphingomonas herbicidovorans</i> gene for 16S rRNA, partial sequence	99%	96%
DQ132883.1	<i>Sphingomonas</i> sp. JQ1-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AY206698.1	<i>Sphingomonas</i> sp. AS 6330 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
D16148.1	<i>Sphingomonas</i> sp. DNA for 16S ribosomal RNA	99%	96%
AB040739.1	<i>Sphingomonas</i> sp. S-3 gene for 16S rRNA, partial sequence	99%	96%
DQ469213.1	Uncultured bacterium clone SX2-50 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
DQ118955.1	<i>Sphingomonas</i> sp. JQ2-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AY496444.1	<i>Sphingomonas</i> sp. N1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AJ717392.1	<i>Sphingomonas</i> sp. AC83 16S rRNA gene, isolate AC83	99%	96%
AF184222.1	<i>Sphingomonas</i> sp. Ant17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AB025530.1	<i>Sphingomonas</i> sp. MBIC3990 gene for 16S rRNA, partial sequence	99%	96%
EF207155.1	<i>Sphingobium</i> sp. RL-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AB276370.1	<i>Sphingomonas</i> sp. BP-7 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	99%	96%
AB196246.1	<i>Sphingomonas</i> sp. IC033 gene for 16S ribosomal RNA, complete sequence, strain: IC033	99%	96%
AY994060.1	<i>Sphingomonas</i> sp. dsp-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AB025279.1	<i>Sphingomonas</i> sp. MBIC3020 gene for 16S rRNA, partial sequence	99%	96%
AY973169.1	<i>Sphingomonas</i> sp. BHC-A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
EF540441.1	Uncultured soil bacterium clone PK_XI 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AB255386.1	<i>Sphingomonas</i> sp. PW-1 gene for 16S rRNA, partial sequence	99%	96%
AB255385.1	<i>Sphingomonas</i> sp. P3 gene for 16S rRNA, partial sequence	99%	96%
AB255381.1	<i>Sphingomonas</i> sp. EK-1 gene for 16S rRNA, partial sequence	99%	96%
AY328623.1	Uncultured bacterium HOCICI74 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AY328617.1	Uncultured bacterium HOCICI68 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AY328571.1	Uncultured bacterium HOCICI22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AY328554.1	Uncultured bacterium HOCICI5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AY611716.1	<i>Sphingomonas xenophaga</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AF177917.1	<i>Sphingomonas</i> sp. DhA-95 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AF191022.1	<i>Sphingomonas</i> sp. CD 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AY519130.1	<i>Sphingobium francense</i> strain Sp+ 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AM182272.1	Alpha proteobacterium QLW-XinA3 partial 16S rRNA gene, isolate QLW-XinA3	99%	96%
AJ011505.1	<i>Sphingomonas</i> sp. (strain DhA-33) 16S rRNA gene, partial	99%	96%

AY328619.1	Uncultured bacterium HOCICi70 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AY328587.1	Uncultured bacterium HOCICi38 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AY519129.1	<i>Sphingobium indicum</i> strain B90A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AY544996.1	<i>Sphingobium herbicidovorans</i> strain FA3g 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	95%
U37345.1	<i>Sphingomonas</i> sp. isolate UN1F1 16S ribosomal RNA (<i>rrn</i>) gene, partial sequence	99%	96%
AY151393.1	<i>Sphingomonas cloacae</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
DQ672266.1	<i>Sphingomonas</i> sp. XJ-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AY328610.1	Uncultured bacterium HOCICi61 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AY328597.1	Uncultured bacterium HOCICi48 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AY972869.1	Alpha proteobacterium BAL282 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
X94098.1	<i>Sphingomonas xenophaga</i> 16S ribosomal RNA (strain BN6)	99%	96%
AY689029.1	<i>Sphingobium</i> sp. 3A_16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AY277556.1	<i>Sphingomonas</i> sp. 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	96%
DQ396036.1	Uncultured organism clone ctg_NISA212 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
DQ395865.1	Uncultured organism clone ctg_CGOF367 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AF335468.1	<i>Sphingomonas</i> sp. VM506 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AY571828.1	<i>Sphingomonas</i> sp. 44/02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	96%
AF335501.1	<i>Sphingomonas</i> sp. LB126 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AB047364.1	<i>Sphingomonas</i> sp. YT gene for 16S rRNA	99%	96%
AY151392.1	<i>Sphingomonas chungbukensis</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AJ009709.2	<i>Sphingomonas</i> sp. 16S rRNA gene, isolate K74, partial	98%	96%
DQ532332.1	Uncultured bacterium clone KSC4-62 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
DQ177525.1	<i>Sphingomonas</i> sp. JQL4-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AB104886.1	<i>Sphingomonas</i> sp. A4 gene for 16S rRNA, partial sequence	99%	95%
AY328570.1	Uncultured bacterium HOCICi21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	95%
AY512600.1	<i>Sphingomonas</i> sp. A1-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AM234167.1	Alpha proteobacterium SW366-MH-3 partial 16S rRNA gene, isolate SW366-MH-3	98%	96%
U37346.1	<i>Sphingomonas</i> sp. isolate UN1F2 16S ribosomal RNA (<i>rrn</i>) gene, partial sequence	99%	95%
AF157490.1	<i>Sphingomonas</i> sp. JS5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AJ000918.2	<i>Rhizomonas</i> sp. K6 partial 16S rRNA gene, strain K6	99%	96%
AY047219.1	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	95%
EF190507.1	<i>Sphingobium chinhatense</i> strain IP26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	95%
DQ664249.1	Alpha proteobacterium IMCC1743 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	95%
EU095328.1	<i>Sphingobium</i> sp. x23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	95%
DQ139343.1	<i>Sphingomonas</i> sp. GY2B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	95%
AB214868.1	<i>Sphingomonas</i> sp. ED9 gene for 16S rRNA, partial sequence	96%	96%
AY689028.1	<i>Sphingobium</i> sp. 3A_13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	95%
AY212705.1	Uncultured bacterium clone 256ds10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	95%
AY212704.1	Uncultured bacterium clone 255ds10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	95%
AB214867.1	<i>Sphingomonas</i> sp. ED8 gene for 16S rRNA, partial sequence	97%	96%
AY635898.1	<i>Sphingomonas</i> sp. AMS7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	96%
AB025572.1	<i>Sphingomonas</i> sp. MBIC3992 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	99%	95%
EF128173.1	<i>Sphingomonas</i> sp. Mar-33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	95%
AY702969.1	<i>Sphingomonas</i> sp. CFDS-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	95%
AB021416.1	<i>Pseudomonas abikonensis</i> DNA for 16S rRNA, strain IAM 12404T	99%	95%

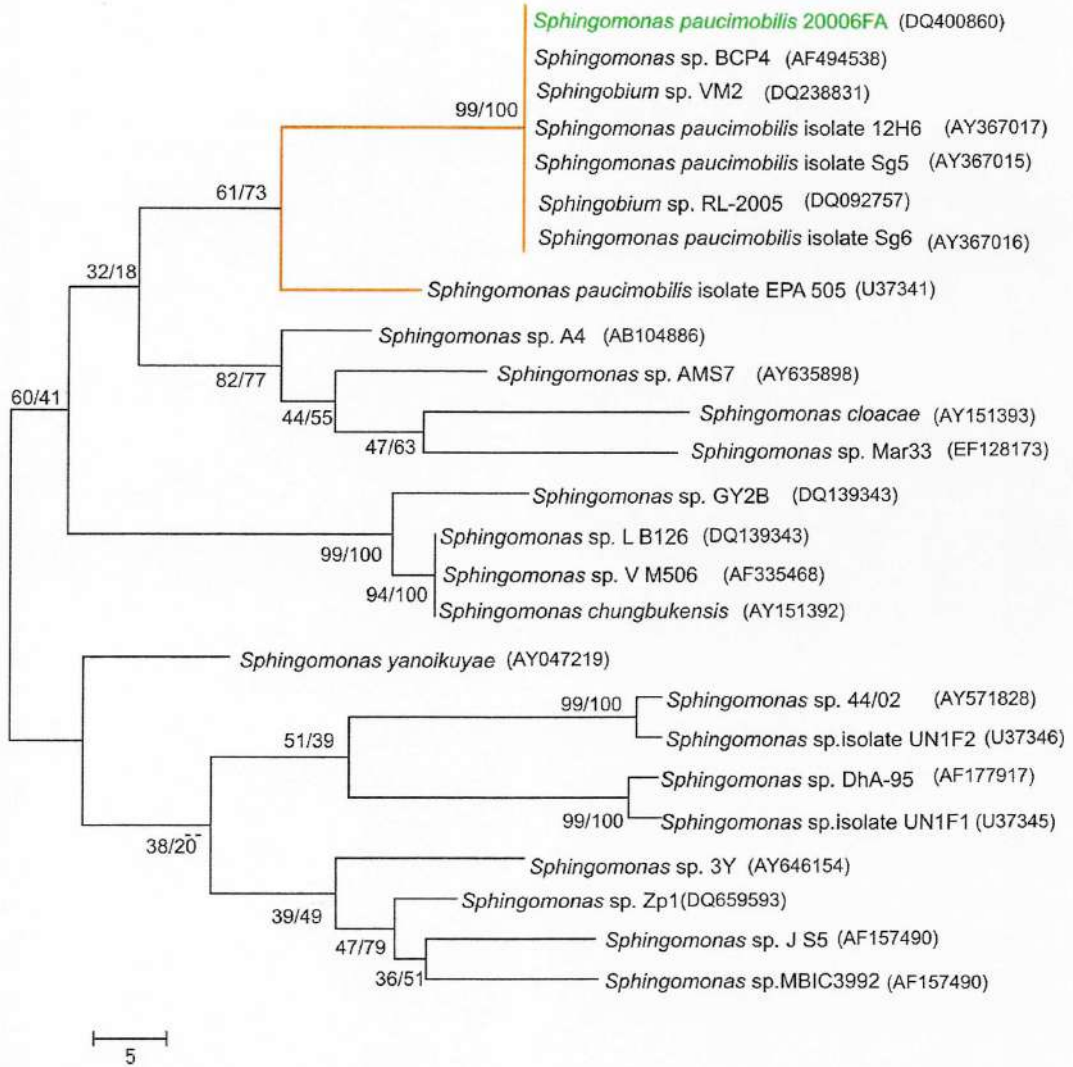


Figura IV-2: Árbol filogenético para el aislado 20006FA y cepas de *Sphingomonas* degradadoras de PAH relacionadas basado en una matriz de análisis evolutivo por distancia y por parsimonia de la secuencia del gen 16S rRNA . Para calcular las distancias se utilizó el programa Mega version 4 (Tamura y col., 2007). Los valores de bootstrap se indican en los nodos correspondientes (expresados como porcentajes). El primero indica el análisis por parsimonia y el segundo por distancia. Los números de acceso al GenBank para las secuencias del gen 16S rRNA se indican entre paréntesis.

Cepa	Sitio de aislamiento	Referencia
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> isolate 12H6	Plantas de carbón, Wisconsin, USA	Vacca y col., 2005
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> isolate Sg6	Plantas de carbón, Wisconsin, USA	Vacca y col., 2005
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> isolate Sg5	Plantas de carbón, Wisconsin, USA	Vacca y col., 2005
<i>Sphingobium</i> sp. RL-2005	Depósito de cenizas, Kanpur, India	Prakash y col., 2006
<i>Sphingobium</i> sp. VM2	Suelo contaminado con PAH	Massa, GenBank (*)
<i>Sphingomonas</i> sp. BPC4	Suelos contaminados con petróleo, Texas, USA	Kanaly y col., 2002
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> isolate EPA 505	Sitio contaminado con creosota, Pensacola, USA	Mueller y col., 1990

Tabla IV-4: *Sphingomonas* degradadoras de PAH filogenéticamente mas cercanas a la cepa 20006FA y sitio de aislamiento.

IV.B. Caracterización metabólica de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA

IV.B.1 Capacidad de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA de crecer utilizando fenantreno y pireno como única fuente de carbono y energía.

Teniendo en cuenta la evidencia encontrada de la capacidad de la cepa de degradar fenantreno, determinada a través de la aparición de productos de degradación coloreados cuando la cepa desarrolla en medios con fenantreno, se decidió estudiar la capacidad de la cepa de crecer con fenantreno como única fuente de carbono y energía. Para tal fin se determinó la curva de crecimiento de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA en MML adicionado con fenantreno 2000 mg/L, a 24 °C con agitación (150 rpm). Como medida del crecimiento se determinó el número de unidades formadoras de colonia (ufc) en R2A a distintos tiempos de incubación. La Figura IV-3 muestra la curva de crecimiento obtenida.

(*) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankSearch.html>

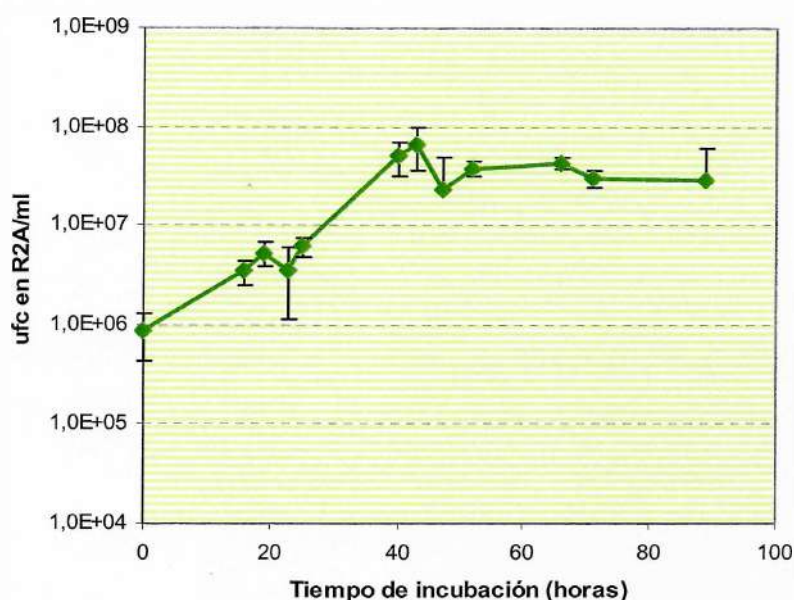


Figura IV-3: Curva de crecimiento de *S. paucimobilis* 20006FA en MML suplementado con fenantreno a 24°C y 150 rpm. Se grafica el valor promedio de 2 ensayos independientes cada uno con 2 replicas

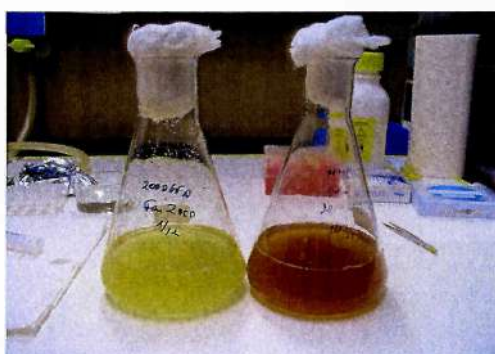


Foto IV-5: Cultivo de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA en MML suplementado con fenantreno mostrando la aparición de productos de degradación de coloreados. El erlenmeyer de la izquierda muestra un cultivo de 3 días y el de la derecha uno de 10 días.

A pesar de no haber encontrados evidencias de la capacidad de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA de degradar pireno, se estudió la capacidad de la misma de crecer en 1000 mg/L de este PAH de 4 ciclos bencenos como única fuente de carbono y energía.

La figura IV-4 muestra la curva de crecimiento obtenida en MML con pireno como única fuente de carbono y energía, a 24°C y con agitación (150 rpm). En esta figura se puede observar que, contrariamente a lo esperado, la cepa mostró una fase de crecimiento inicial, al menos 5 duplicaciones durante las primeras 10 a 15 h de incubación, luego del cual el número

de microorganismos disminuye en un orden de magnitud y se mantiene constante hasta el final del experimento. Sin embargo no se observó la aparición de productos de degradación coloreados.

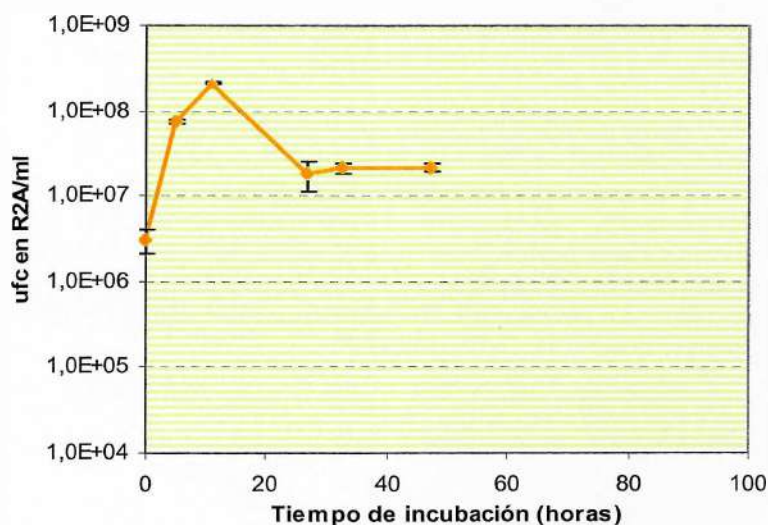


Figura IV-4: Curva de crecimiento de *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA en MML suplementado con pireno a 24°C y 150 rpm. Se grafica el valor promedio de 2 ensayos independientes cada uno con 2 replicas

Al terminar la incubación se tomaron cristales de pireno, los cuales fueron lavados varias veces con solución fisiológica, y con ellos se sembró la superficie de una placa de R3A, observándose luego de la incubación una estría de crecimiento, lo que estaría indicando que las bacterias estarían adheridas a la superficie del cristal (Foto IV-6).



Foto IV-6: Placa de R3A estriada con cristales de pireno de un cultivo de la cepa 20006FA

IV.B.2 Determinación de la presencia de actividad dioxigenasa

En la degradación bacteriana aeróbica de PAH, el primer paso depende de la presencia de la enzima PAH dioxigenasa, que cataliza la hidroxilación del sustrato y la subsiguiente degradación haciendo escala en la ruptura del anillo aromático y conduciendo finalmente a catecol, uno de los intermediarios centrales en la degradación de PAH (Xia y col. 2005).

A partir de dos cultivos de 24h de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA en MML, uno suplementado con glucosa y el otro con fenantreno, se sembraron placas conteniendo MMS con indol como única fuente de carbono y energía. La presencia de actividad dioxigenasa se comprobó por el típico color azul debido a la oxidación de indol a índigo de las colonias desarrolladas en este medio (Foto IV-7). La aparición de colonias azules tanto en las placas sembradas a partir de cultivos creciendo con glucosa como con fenantreno indicó que las enzimas dioxigenasas presentes en la cepa serían constitutivas.



Foto IV-7: Colonias azules en placas conteniendo indol como única fuente de carbono y energía sembradas con *S. paucimobilis* 20006FA. Izquierda: inóculo proveniente de MML+fenantreno Derecha: Inóculo proveniente de MML+glucosa

IV.B.3 Determinación de la capacidad de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA crecer utilizando salicilato como única fuente de carbono y energía

Se determinó la capacidad de la cepa de crecer MML suplementado con salicilato (500mg/L), intermediario metabólico de la vía de degradación de varios PAH (Balashova et al, 2001).

Se encontró que la cepa tiene la capacidad de utilizar el salicilato como única fuente de carbono y energía (Figura IV-5) y que durante su crecimiento se produce la aparición de productos de degradación coloreados (Foto IV-8). Sin embargo a diferencia de las curvas de

crecimiento de la cepa creciendo con fenantreno o pireno como única fuente de carbono, en el caso del salicilato se observó una clara fase de latencia de aproximadamente 10 horas.



Foto IV-8: Cultivo de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA en MML suplementado con salicilato mostrando la aparición de productos de degradación de coloreados (erlenmeyers derecha). El erlenmeyer de la izquierda corresponde al control de MML sin fuente de carbono.

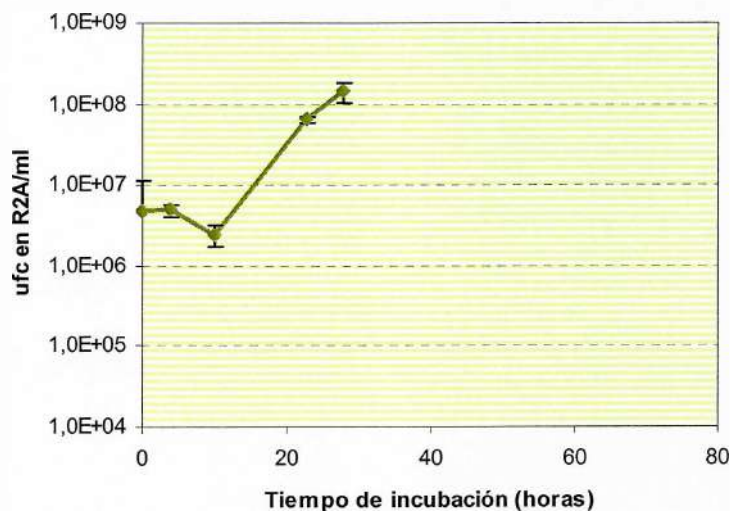


Figura IV-5: Curva de crecimiento de *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA en MML suplementado con salicilato de sodio, a 24°C y 150 rpm. Se grafica el valor promedio de 2 ensayos independientes cada uno con 2 replicas

El crecimiento de la cepa en salicilato de sodio sería un primer indicio de la presencia en la cepa de una ruta de degradación completa, clivando los tres anillos aromáticos.

IV.B.4 Actividad mineralizante

Con el fin de determinar la extensión de la mineralización de fenantreno se inoculó la cepa *S. paucimobilis* 20006FA en biorreactores (Foto IV-9) conteniendo 150 ml de MML y 2000 mg/L de fenantreno (RF1 y RF2). Durante el experimento en el biorreactor RF2 se detectó una contaminación por lo cual fue descartado, los valores presentados se basan en los resultados obtenidos en un solo ensayo (RF1), por lo que los resultados son considerados como una primera aproximación al estudio de la actividad mineralizante de la cepa creciendo en fenantreno como única fuente de carbono y energía.

Adicionalmente y considerando las evidencias encontradas sobre la capacidad de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA de crecer utilizando pireno como única fuente de carbono y energía se inoculó la cepa *S. paucimobilis* 20006FA en biorreactores conteniendo 150 ml de MML y 1000 mg/L de pireno (RP1 y RP2).



Foto IV-9: Biorreactores utilizados para estudiar la mineralización de PAH

La actividad fisiológica del inoculo se determinó a través de la medida de la producción de CO_2 y el consumo de O_2 , las cuales fueron determinadas diariamente durante la primera semana de incubación y luego cada 48 h. A los 20 días, cuando la producción de CO_2 había disminuido significativamente, se realizó la extracción del PAH residual presente en cada biorreactor y se determinó su concentración por cromatografía gaseosa (Tabla IV-5).

En la figura IV-6 se muestra la producción CO_2 y el consumo de O_2 en el biorreactor RF1. En los biorreactores RP1 y RP2 no fue posible detectar producción de CO_2 .

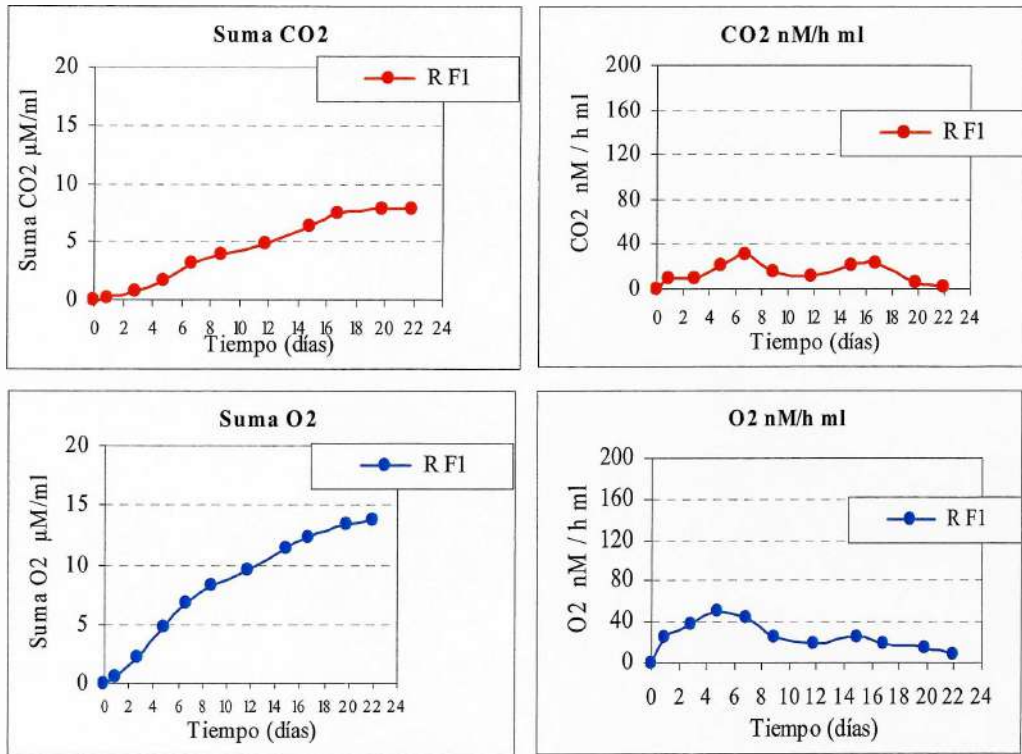


Figura IV-6: Valores acumulativos y velocidad de producción CO₂ y O₂ en el biorreactor RF1 durante la degradación de fenantreno la cepa *S. paucimobilis* 20006FA.

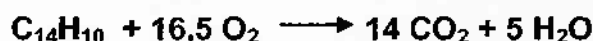
Biorreactor	Concentración residual	
	Fenantreno mg/ml ± DS	Pireno mg/ml ± DS
RF1 (2000 mg/L de fenantreno)	0,48 ± 0.114	0
RP1 (1000 mg/L de pireno)	0	0,898 ± 0.02
RP2 (1000 mg/L de pireno)	0	0,855 ± 0.07

Tabla IV-5: Concentraciones residuales de fenantreno y pireno en los biorreactores RF1, RP1 y RP2 después de 20 días de incubación. Se presenta el valor promedio de 2 replicas y la correspondiente desviación estándar.

La Tabla IV-5 muestra las concentraciones residuales de fenantreno y pireno en los biorreactores RF1, RP1 y RP2.

En el biorreactor RF1 se observó que la eliminación de fenantreno luego de 20 días de incubación con *S. paucimobilis* 20006FA alcanzó el 75±5%. Aquí la producción de CO₂ total fue de 9 μmoles/ml, que corresponde a una mineralización del 14±1% del fenantreno eliminado.

Ecuación IV-1: Mineralización teórica del fenantreno



Para la ecuación IV-1 se considera que una mineralización del 50% corresponde al consumo total de la molécula de fenantreno y el resto del carbono se destinó a biomasa (García-Junco y col., 2003). Por lo tanto, en las condiciones estudiadas, la cepa no sería capaz de mineralizar todo el fenantreno degradado, por lo que parte del carbono quedaría acumulado en productos de degradación que serían los responsables de la aparición de un color amarillo en los biorreactores que se mantiene e intensifica durante la incubación.

La Tabla IV-5 muestra que en concordancia con los resultados de producción de CO₂, en los dos biorreactores que contenían pireno (RP1 y RP2) la disminución en la concentración del mismo fue del 12 ± 4%, niveles similares a los encontrados para la pérdida abiótica de PAH.

Adicionalmente se estudió el efecto de la presencia de una mezcla de PAH (fenantreno y pireno) sobre la degradación y mineralización de cada PAH por la cepa en estudio. Con este propósito se inoculó la cepa *S. paucimobilis* 20006FA en un biorreactor conteniendo 2000 mg/l de fenantreno + 1000 mg/l de pireno (RFP). En este reactor la producción de CO₂ y el consumo de O₂ se determinaron cada 48 hs (Figura IV-7). A los 10 días se realizó la extracción del PAH residual presente en el biorreactor RFP y se determinó su concentración por cromatografía gaseosa (Tabla IV-6).

Biorreactor	Concentración residual	
	Fenantreno mg/ml ± DS	Pireno mg/ml ± DS
RFP (2000 mg/L de fenantreno y 1000 mg/L de pireno)	1,54 ± 0.006	0,627 ± 0.027

Tabla IV-6: Concentraciones residuales de fenantreno y pireno en el biorreactor RFP después de 10 días de incubación. Se presenta el valor promedio de 2 replicas y la correspondiente desviación estándar.

En la Figura IV-7 se puede observar que tanto el consumo de O₂ como la producción de CO₂ mostró una fase de latencia inicial que no se había evidenciado en los biorreactores contaminados solo con fenantreno, sugiriendo un efecto inhibitorio del pireno o de la mezcla fenantreno-pireno sobre la cepa.

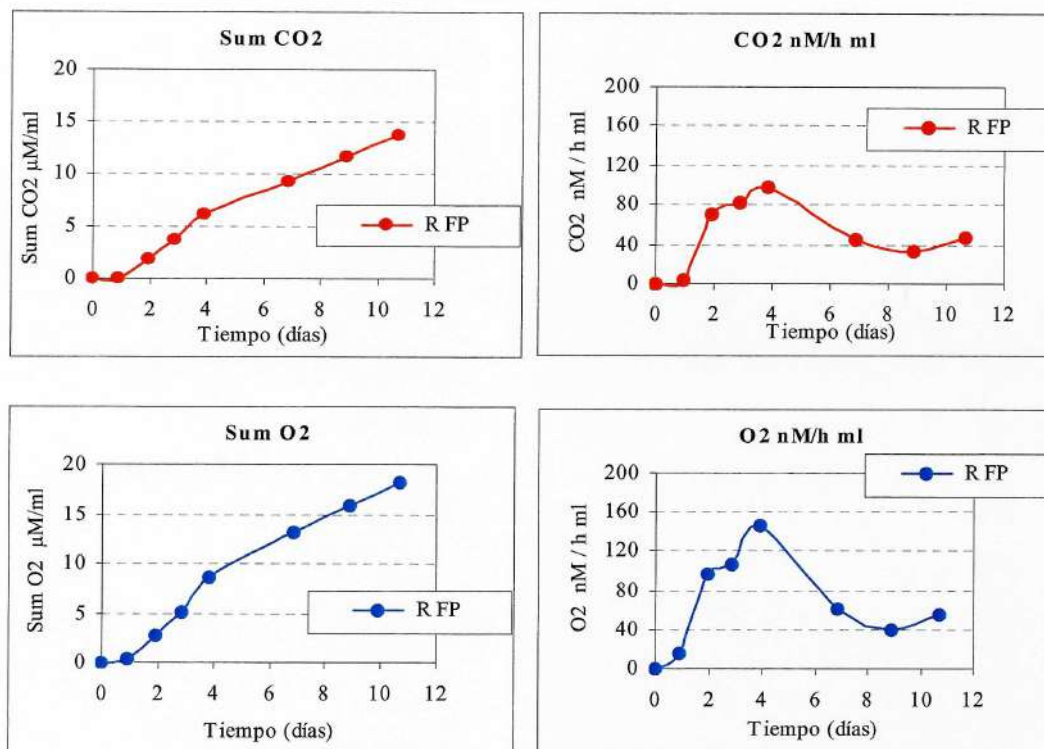


Figura IV-7: Valores acumulativos y velocidad de producción CO₂ y O₂ en el biorreactor RFP durante la degradación de fenantreno y pireno por la cepa *S. paucimobilis* 20006FA.

Esta fase de latencia podría explicar el hecho de que solo el $23 \pm 1\%$ del fenantreno se había eliminado luego de 10 días de incubación (Tabla IV-6). Sin embargo fue posible observar un efecto positivo sobre la degradación de pireno que alcanzó el $37 \pm 3\%$ luego de 10 días de incubación.

La producción de total CO₂ en el biorreactor RFP fue de 14 μmoles, lo que correspondería según la ecuación IV-1, a una mineralización del 100% del fenantreno degradado por la cepa, si se considera que la eliminación del pireno se debe a reacciones co-metabólicas. Este resultado no concuerda con la mineralización de fenantreno calculada a partir de los datos de la producción de CO₂ obtenidos en el reactor RF ($14 \pm 2\%$) y considerando la evidencia encontrada de la capacidad de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA de crecer utilizando pireno como única fuente de carbono y energía (Fig. IV-4), se podría sugerir que parte del CO₂ obtenido en el reactor RFP se estarían produciendo a partir de la degradación del pireno.

IV.C. Caracterización ecológica de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA

IV.C.1 Investigación de la presencia de plásmidos en la cepa *S. paucimobilis* 20006FA

Se observó que la capacidad degradadora de fenantreno de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA se mantuvo a lo largo de repiques sucesivos durante 2 años, sin necesidad de utilizar para su cultivo medio con presión selectiva.

Se estudió la presencia de plásmidos en la cepa *S. paucimobilis* 20006FA mediante dos técnicas diferentes, la minipreparación para extraer DNA plasmídico (Sambrook, Fritsch y Maniatis 1989) y el método de lisis en el gel de Eckhardt (Meyers y col. (1976).

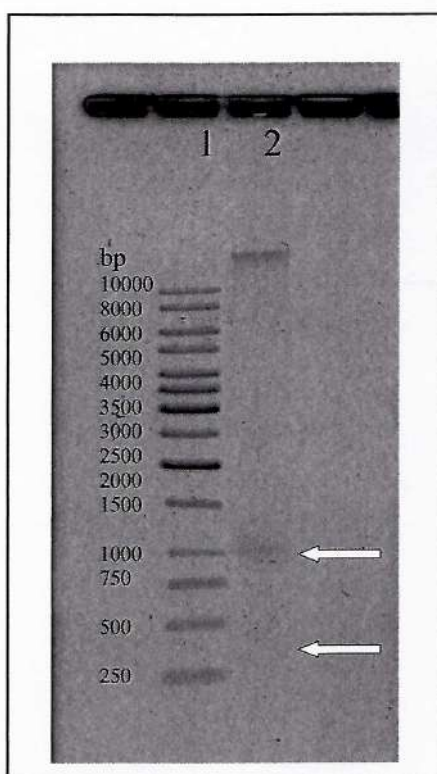


Figura IV-8: Electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos presentes en *S. paucimobilis* 20006FA según la técnica descrita en Sambrook, Fritsch y Maniatis (1989). Calle 1: Marcador de PM, Calle 2: *S. paucimobilis* 20006FA

La Figura IV-8 muestra los resultados obtenidos con la mini preparación, la calle 1 muestra el marcador de peso molecular y la calle 2 muestra el DNA obtenido a partir de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA. En la parte superior de la calle 2 la banda intensa corresponde a DNA cromosomal de la cepa. En la misma calle se puede observar la presencia de una banda nítida que corre a la altura de la banda 1000pb del marcador de peso molecular y otra banda mas difusa que corre a la altura de aproximadamente 300pb. Debido a que las formas superenrolladas se mueven más lentamente que las formas lineales en la electroforesis (Basta

y col., 2004), no ha sido posible distinguir si las dos bandas observadas corresponden a dos plásmidos diferentes o a un único plásmido con conformaciones diferentes. Estos resultados estarían indicando que la cepa posee al menos un plásmido.

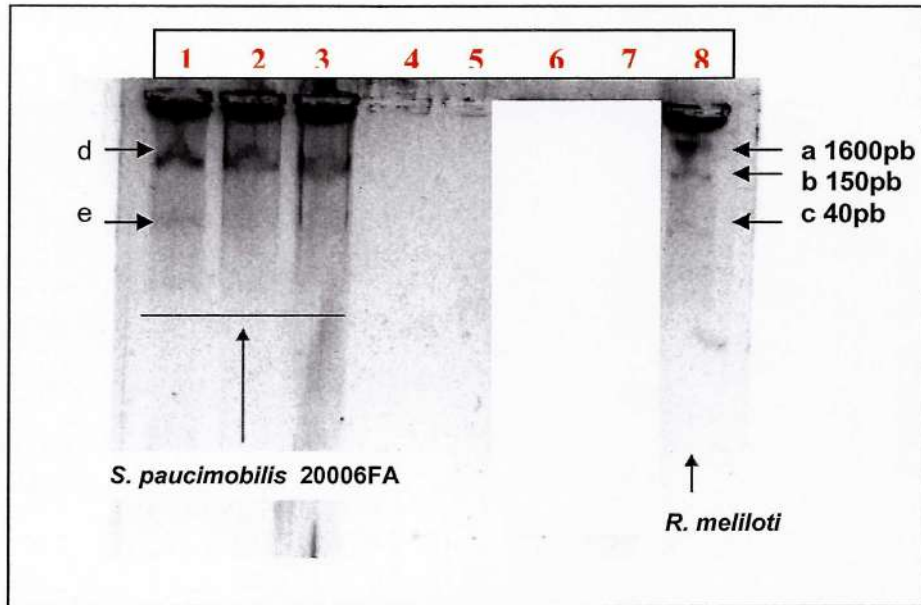


Figura IV-9: Electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos presentes en *S. paucimobilis* 20006FA por el método de lisis en gel según Eckhardt. Calle 1, 2 y 3: *S. paucimobilis* 20006FA, Calle 8: *Rhizobium meliloti*

La Figura IV-9 muestra los resultados obtenidos mediante la técnica de lisis en el gel. En las diferentes repeticiones del experimento el número de bandas obtenidas a partir de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA varió desde 1 hasta 4. En la figura IV-9 se muestra el resultado de un experimento, donde en las calles 1, 2 y 3, correspondientes a DNA obtenidos a partir de 0,15, 0,25 y 0,5 ml de un cultivo de 24h de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA en el medio R3A, pueden observarse dos bandas (indicadas como d y e). Puede apreciarse que las bandas d y e encontradas en las calles correspondientes al DNA de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA corren a la altura de los megaplásmidos de una cepa de *Rhizobium meliloti* (a: 1600, b: 150 y c: 40 pb) (Dr. Pistorio, comunicación personal) que fue utilizada como control (calle 8, Fig. IV-4).

Aunque no fue posible establecer si la información de las rutas metabólicas para la degradación de PAH se encuentra codificada en plásmidos, hemos podido observar que la cepa *S. paucimobilis* 20006FA posee al menos un megaplásmido.

IV.C.2 Estudio de diferentes estrategias utilizadas por la cepa *S. paucimobilis* 20006FA para favorecer la degradación de los PAH

Como se dijo anteriormente la biodisponibilidad de los PAH en suelos es baja debido a factores como la hidrofobicidad de los compuestos, el secuestro en la matriz orgánica del suelo, cambios en la estructura de la molécula y la formación de partículas de alquitrán (Cerniglia, 1992; Chiou y col., 1998; Kanaly y Harayama 2000). Por lo tanto los microorganismos involucrados en procesos de remediación eficientes de suelos contaminados con PAH deberán poseer estrategias apropiadas para promover la biodisponibilidad (Reid y col., 2000).

Conociendo la habilidad de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA para degradar PAH, en especial fenantreno, se avanzó en el estudio de las posibles estrategias utilizadas por ella para favorecer la degradación de compuestos hidrofóbicos, como son las propiedades de adhesión celular a la superficie de sustratos, la producción de biofilms y/o la producción de biosurfactantes.

IV.C.2.i Análisis microscópico células de *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA creciendo en MML suplementado con cristales de fenantreno

Los mecanismos de promoción de la biodisponibilidad que poseen los microorganismos para incrementar la transferencia de masa hacia las células son: la adherencia de las células a la superficie del PAH, el desarrollo de sistemas de captura de alta afinidad para PAH y la producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS).

En experimentos previos de crecimiento de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA en MML suplementado con una fina capa de cristales de fenantreno que recubrían las paredes de los tubos se evidenció la capacidad de la cepa de formar un biofilm estable por más de 30 horas (Dias, 2006). Así mismo como se presenta en la sección IV.B.1, se encontraron evidencias que la cepa se adhiere a los cristales de pireno, lo que sería un primer indicio de la capacidad de formación de biofilm sobre este PAH.

Se realizaron cultivos de *S. paucimobilis* 20006FA en medios líquidos (R3A y MML conteniendo fenantreno), los cuales fueron observados por distintas técnicas de microscopía para observar mecanismos de anclaje o formación de biofilms y para investigar la producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS).

Tinción con colorantes fluorescentes

Para realizar este estudio las células de un cultivo de *S. paucimobilis* 20006FA en MML adicionado con 2000 mg/L de fenantreno fueron teñidas con Sybr Green, un fluorocromo que se une al DNA, produciendo una señal verde.

- **Microscopía de Epifluorescencia**

La Foto IV-10 se obtuvo a partir de un cultivo de 72 h de *S. paucimobilis* 20006FA en MML adicionado con 2000 mg/L de fenantreno teñida con Sybr Green.

La Foto A corresponde a células de *S. paucimobilis* 20006FA creciendo en forma libre.

La Foto B1 muestra la imagen en campo claro de un cristal de fenantreno, en la observación por microscopía de epifluorescencia de ese mismo cristal se pueden observar las células de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA teñidas con Sybr Green depositadas sobre una de las cavidades del cristal (B2).

La Foto C muestra otro cristal de fenantreno con algunas células de *S. paucimobilis* 20006FA depositadas sobre su superficie.

- **Microscopía láser confocal (CLSM)**

Se analizaron muestras de cultivos de *S. paucimobilis* 20006FA en MML adicionado con fenantreno utilizando Microscopía láser confocal.

Aproximadamente 10 campos fueron examinados por microscopía de epifluorescencia y un lugar representativo fue seleccionado para obtener la imagen utilizando CLSM.

En la Foto IV-11, se observa un cultivo de 5 días de *S. paucimobilis* 20006FA en MML adicionado con 2000 mg/L fenantreno. La señal blanca corresponde a la superficie del cristal de fenantreno, sobre ella pueden observarse algunos agregados celulares (señal verde) en forma de microcolonias, cercanos a los cristales (A y B). Se podría sugerir que la cepa está adherida a la superficie de los cristales y que forma un biofilm en forma de parches (patchy biofilm).

Para obtener una primera información sobre la composición del EPS se utilizaron cinco lectinas fluorescentes con especificidad por distintos azúcares normalmente presentes en EPS proveniente de *Sphingomonas*. Cuando las muestras del cultivo *S. paucimobilis* 20006FA en MML adicionado con 2000 ppm fenantreno fueron incubadas en presencia de las lectinas no se observó señal fluorescente.

Microscopía electrónica de Barrido (SEM)

El análisis por SEM se realizó para estudiar cambios en la superficie de interacción célula-partícula a diferentes tiempos de incubación.

Para poder observar las estructura fina de las células libres y adheridas a superficie, se analizaron cultivos de *S. paucimobilis* 20006FA creciendo en R3A y MML suplementado con fenantreno 2000 mg/L utilizando el método de Microscopía electrónica de barrido (Fotos IV-12 a IV-19).

A partir de un cultivo de **24h** de *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA en R3A, (Foto IV-12), fue posible observar bacilos con estructuras filamentosas en escasa cantidad. Sobre la superficie de las células se observaron algunas pequeñas vesículas brillantes.

La foto IV-13, muestra un cristal de fenantreno sin células, con una superficie característicamente rugosa.

Las siguientes fotografías muestran una secuencia temporal del desarrollo de *S. paucimobilis* 20006FA en MML suplementado con **fenantreno**:

La Foto IV-14 corresponde a cultivos de **9h**, se puede observar que la mayoría de las células se encuentran en división y la presencia de filamentos nacientes de la zona de división celular así como pequeñas vesículas brillantes que podrían estar determinando las zonas de nacimiento de esos filamentos (S-1 y S-2). Se observan además células en división y adheridas al cristal de fenantreno en múltiples puntos por medio estructuras filamentosas (S-3 y S-4).

La Foto IV-15 corresponde a cultivos de **24h**. Se observaron células inmersas en una matriz de exopolímero (S-6 y S-8), y células en clusters adheridas a los cristales de fenantreno mediante gran cantidad de filamentos (S-5 y S-7).

La Foto IV-16 corresponde a cultivos de **48h**. En estos cultivos, se observaron abundantes filamentos que podrían formar parte de un biopolímero que parecerían estar adhiriendo las células al cristal (S-9 y S-11). También se muestra una estructura que podría ser interpretada como parte de un biofilm (células inmersas en una matriz extracelular) que se ha despegado del cristal de fenantreno (S-10).

Las Fotos IV-17 y IV-18 corresponden a cultivos de **5 días**. En las Foto IV-17, los cristales de fenantreno han perdido sus características de rugosidad. Se muestran células sobre y debajo de la superficie del cristal (indicado por flechas) (S-13a). Algunas de las células parecen estar dentro de una matriz de lo que podría ser un biopolímero extracelular. En la Foto IV-18 se observan sobre el cristal de fenantreno estructuras que parecen ser canales o agujeros (S-14 y S-14a).

Se observaron células cubiertas con lo que parecen vesículas pequeñas y brillantes, lo que podría ser un indicio de la inminente producción de un biopolímero o biosurfactante (S-15a

Foto IV-10: Imágenes de cultivos de *S. paucimobilis* 20006FA en MML suplementado con 2000 mg/L de fenantreno, teñidos con SybrGreen obtenidas por microscopía de epifluorescencia

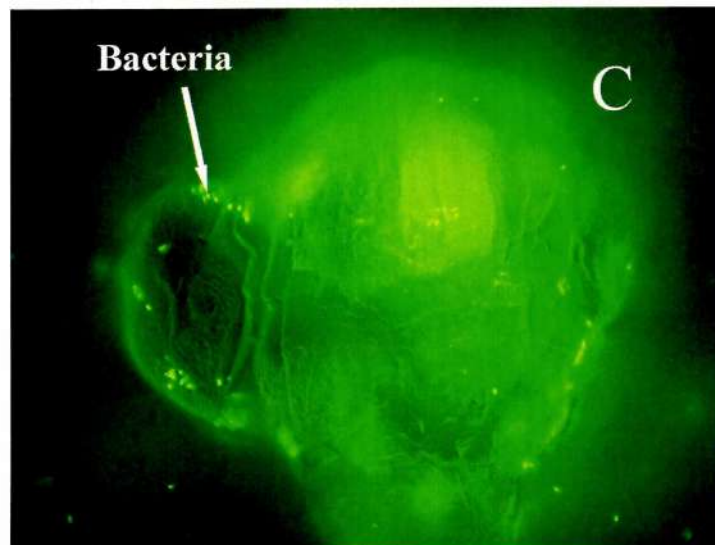
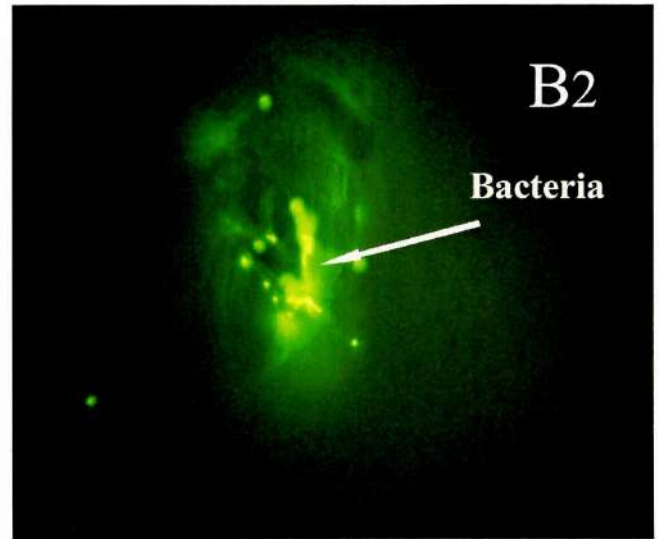
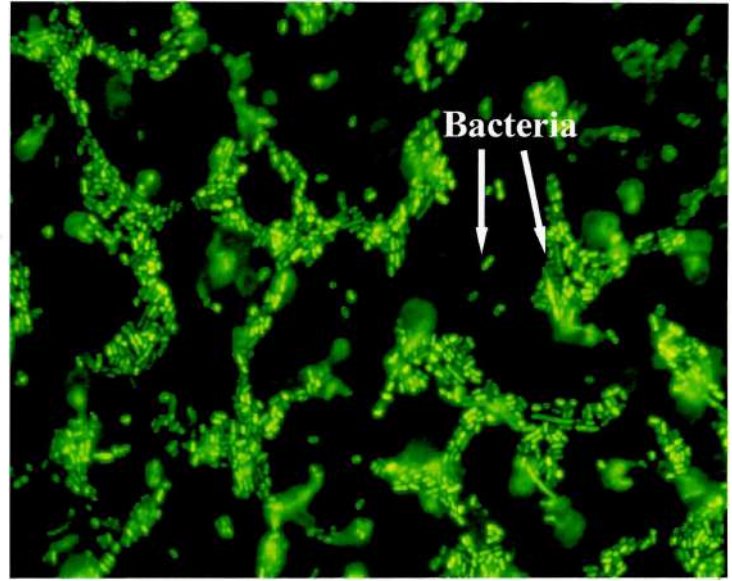


Foto IV-11: Imágenes de cultivos de 5 días de *S. paucimobilis* 20006FA teñidos con SybrGreen. Las células crecieron en MML adicionado con 2000 mg/L de fenanteno. Obtenidas por microscopía láser confocal d

A1 y B1: imagen MIP (maximun intensity proyectioin) en 2D.

A2 y B2:Imagen en 3D

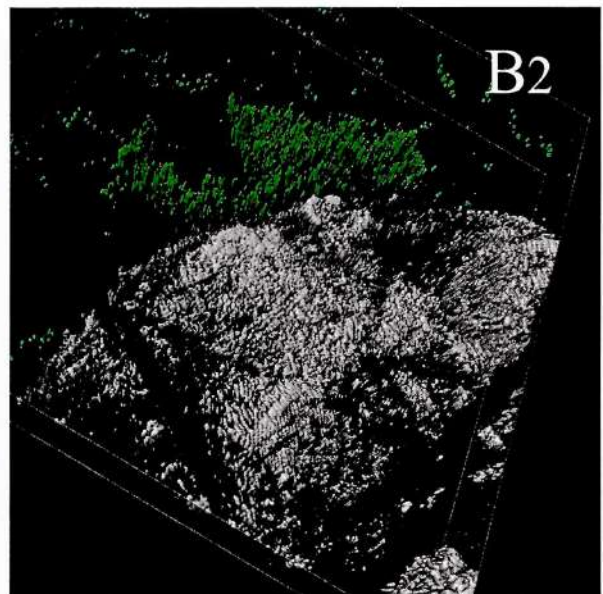
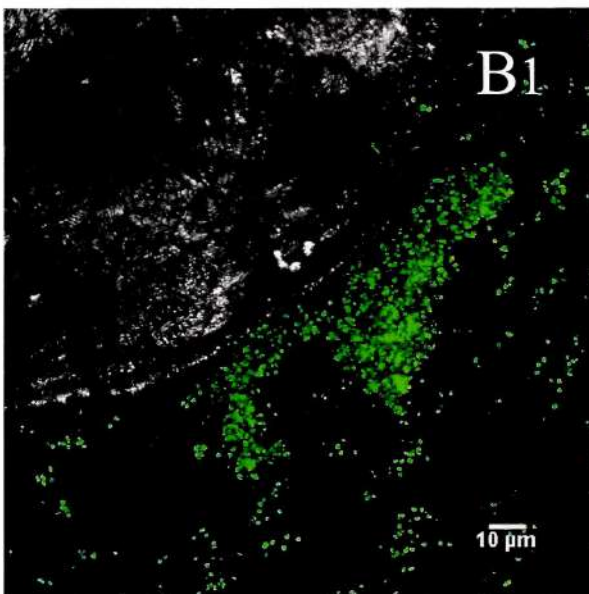
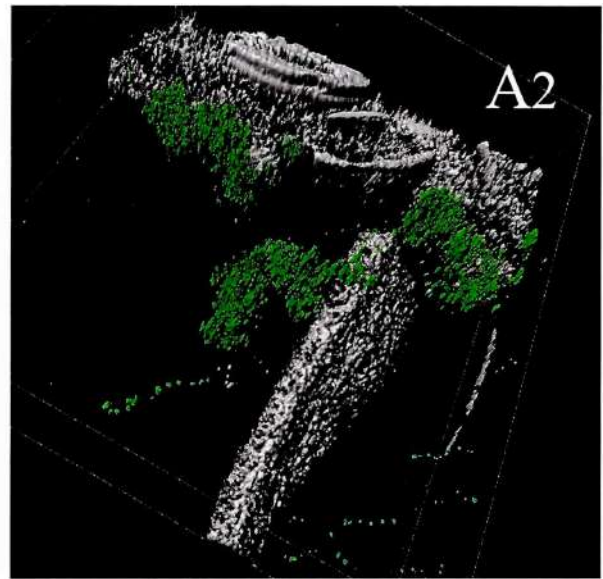
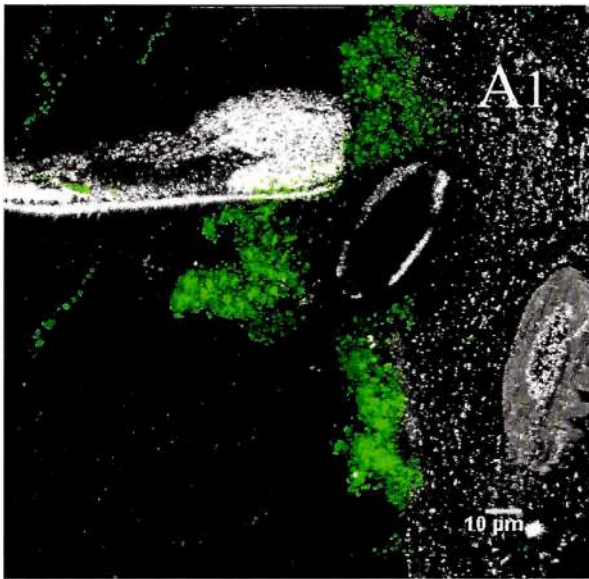
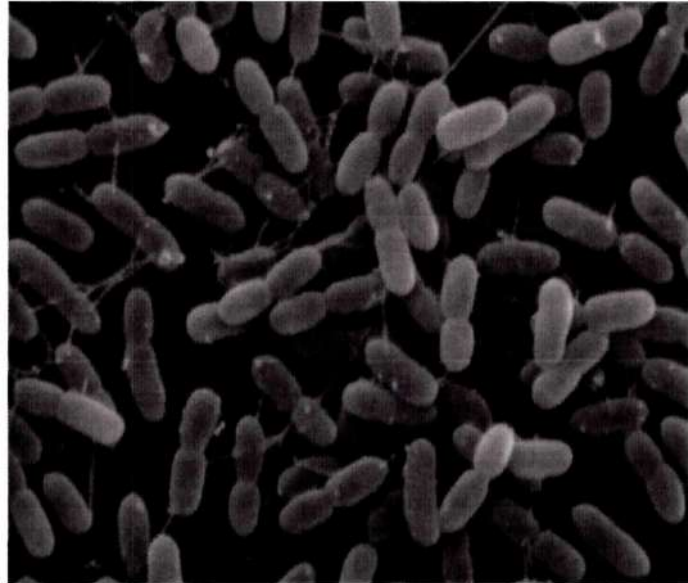


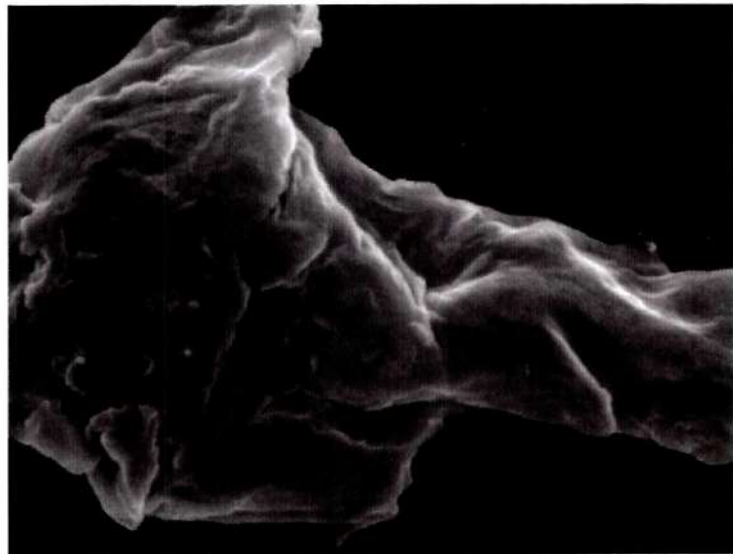
Foto IV-12: imagen de un cultivo de 24 h de *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA en R3A obtenida por de microscopía electrónica de barrido



20006FA in R3A

— 2 μ m —

Foto IV-13: microscopía electrónica de barrido de un cristal de fenantreno.



Phenanthrene Cristal

— 3 μ m —

Foto IV-14 : imágenes de cultivos de 9 h de *S. paucimobilis* 20006FA en MML adicionado con 2000 mg/L de fenantreno. obtenidas por de microscopía electrónica de barrido

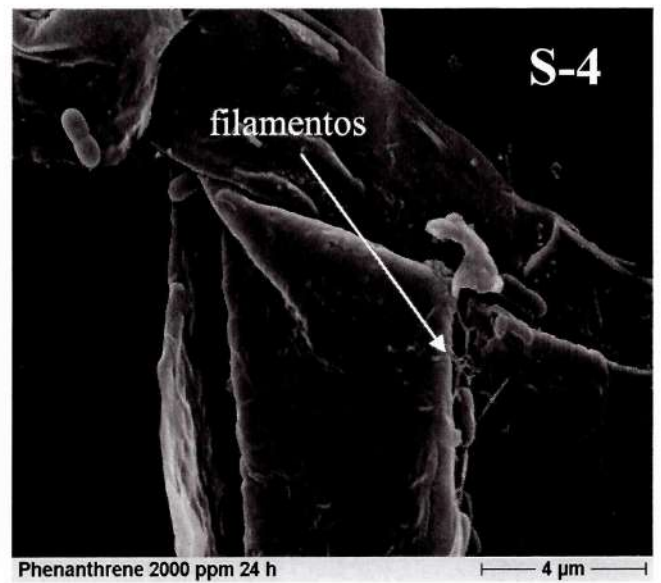
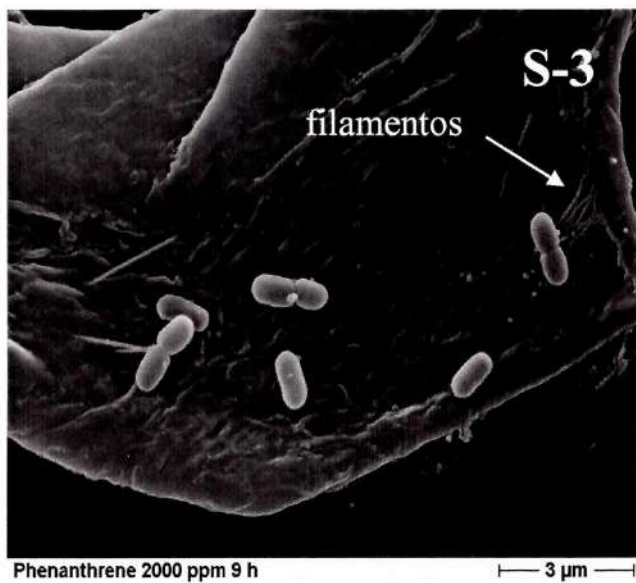
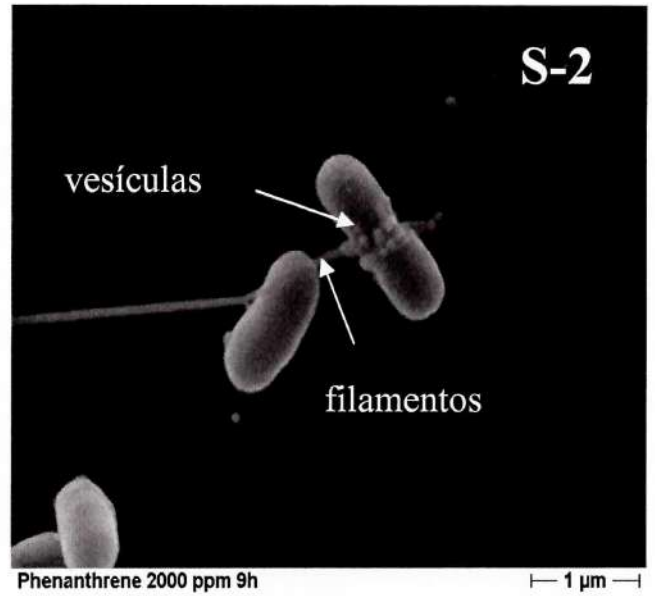
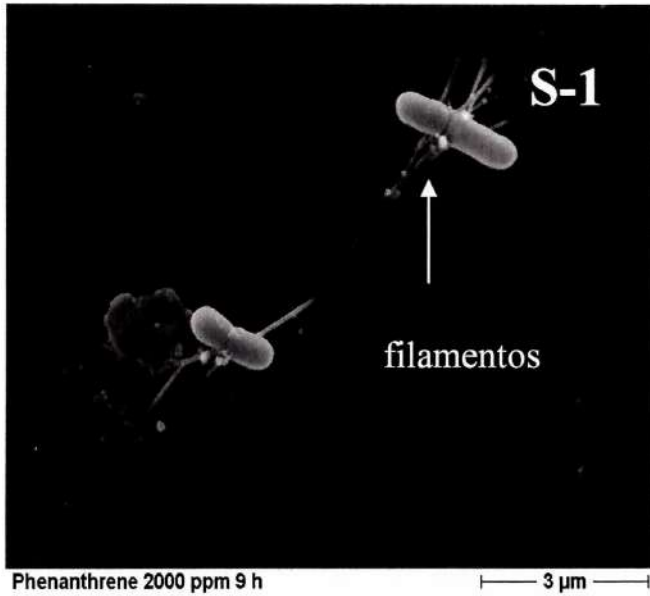
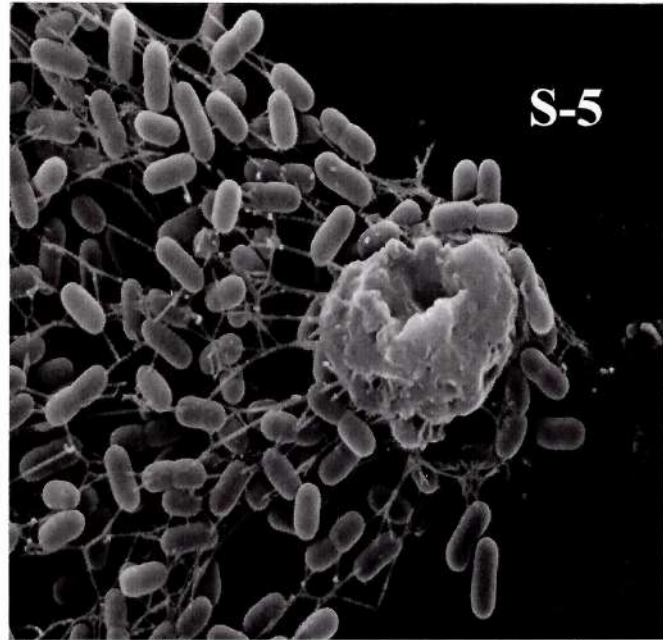
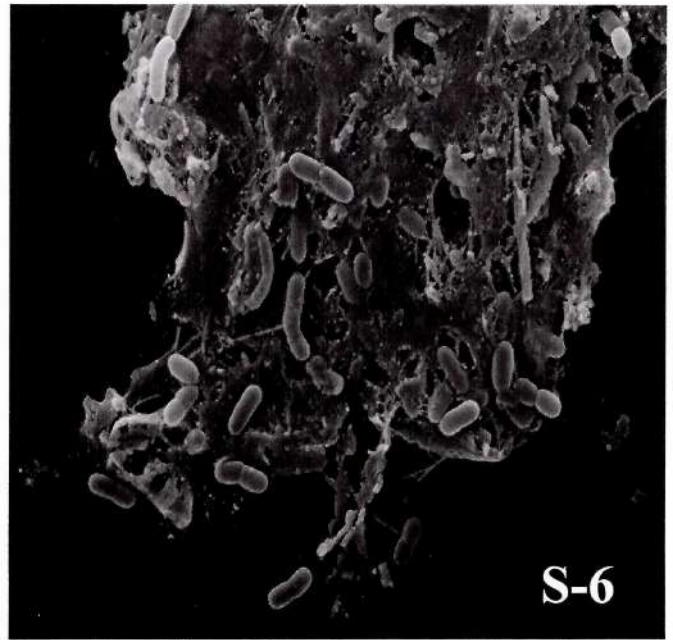


Foto IV-15 : imágenes de cultivos de 24 h de *S. paucimobilis* 20006FA en MML adicionado con 2000 mg/L de fenantreno obtenidas por de microscopía electrónica de barrido



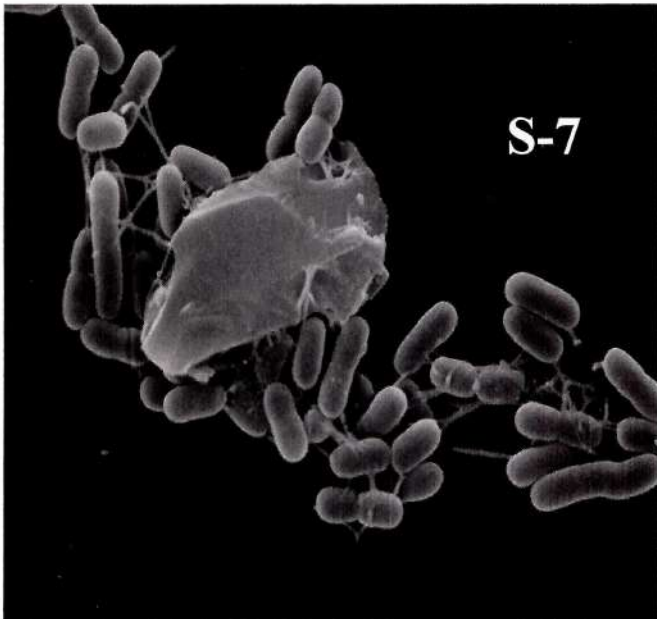
Phenanthrene 2000 ppm 24 h

3 μ m



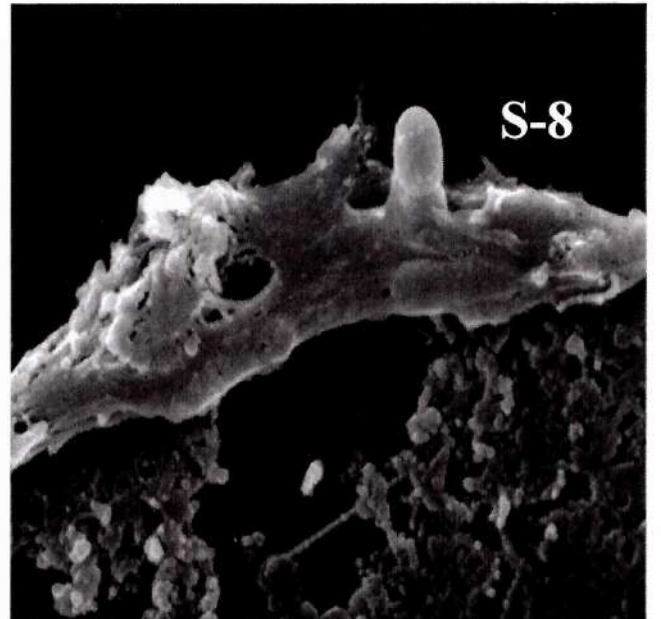
Phenanthrene 2000 ppm 24 h

5 μ m



Phenanthrene 2000 ppm 24 h

3 μ m



Phenanthrene 2000 ppm 24 h

2 μ m

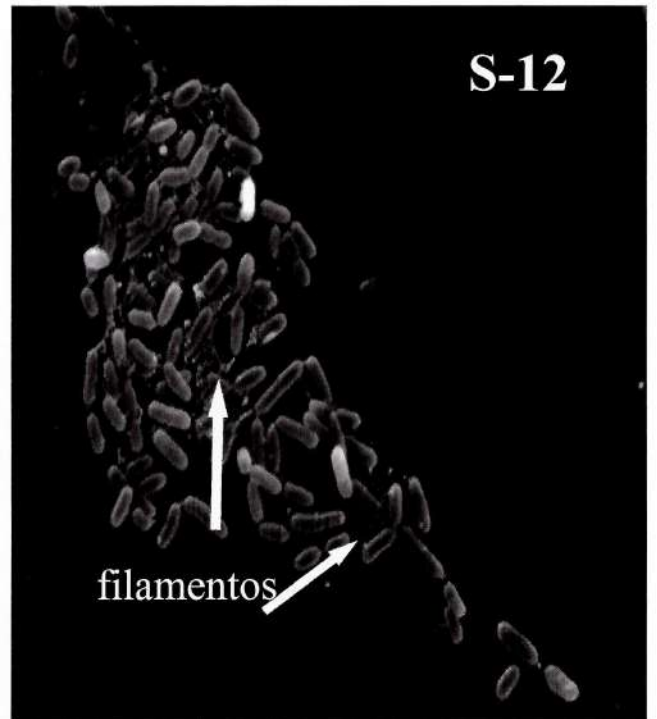
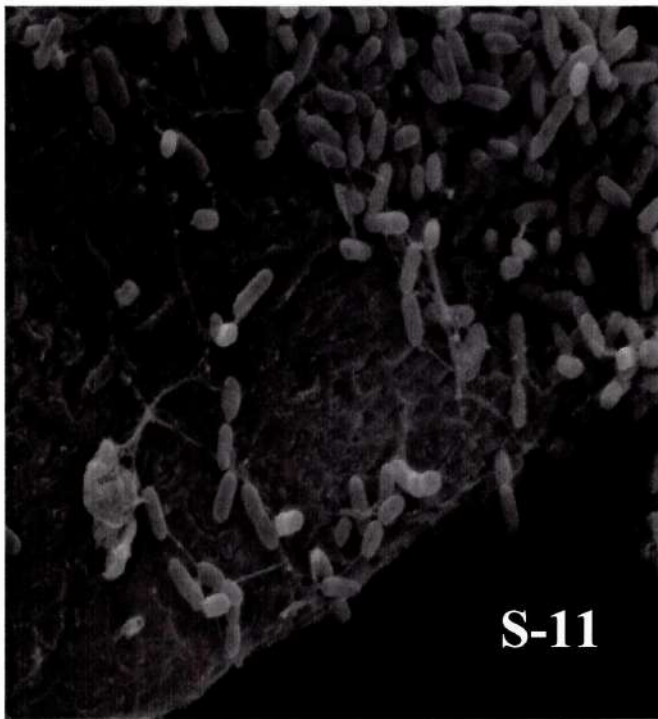
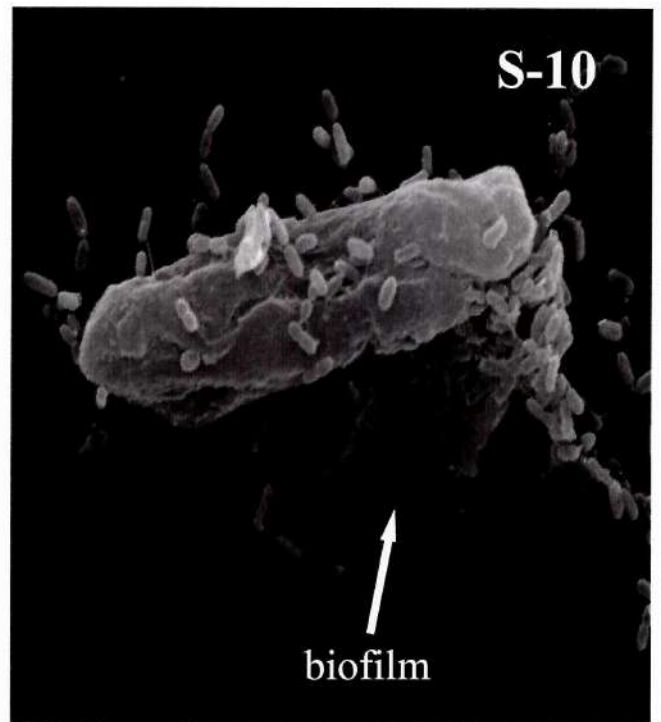
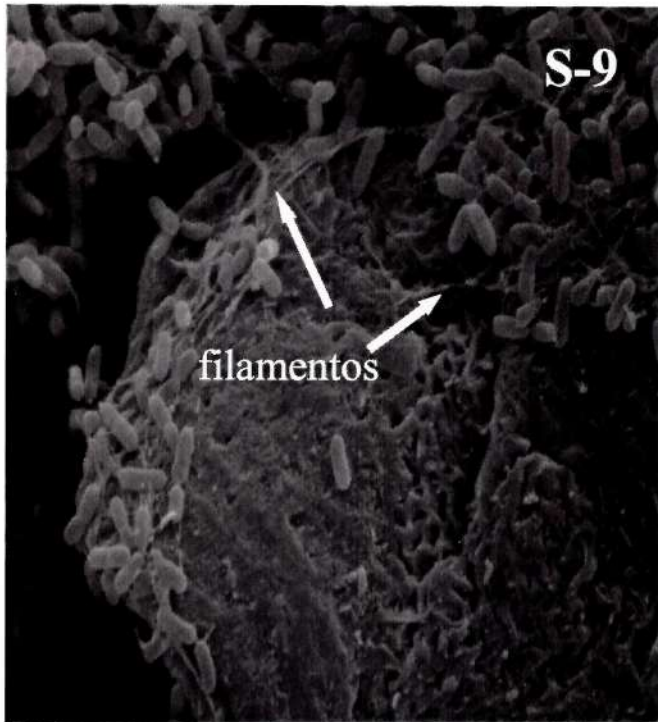
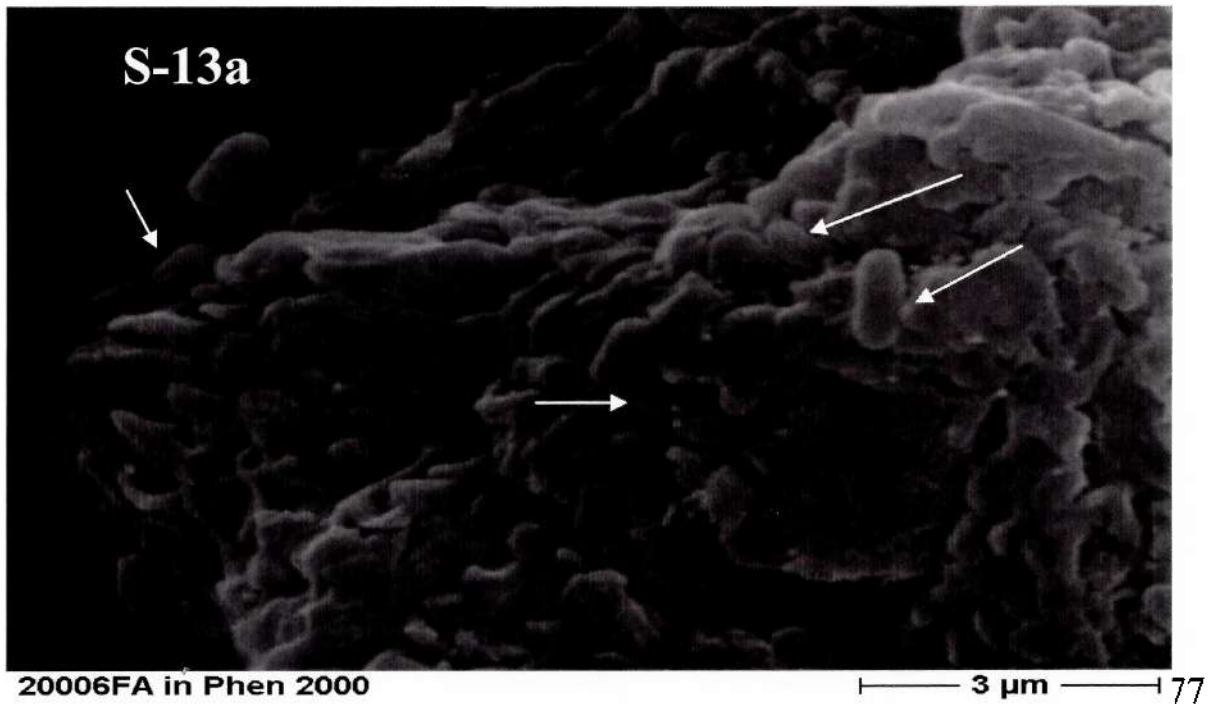
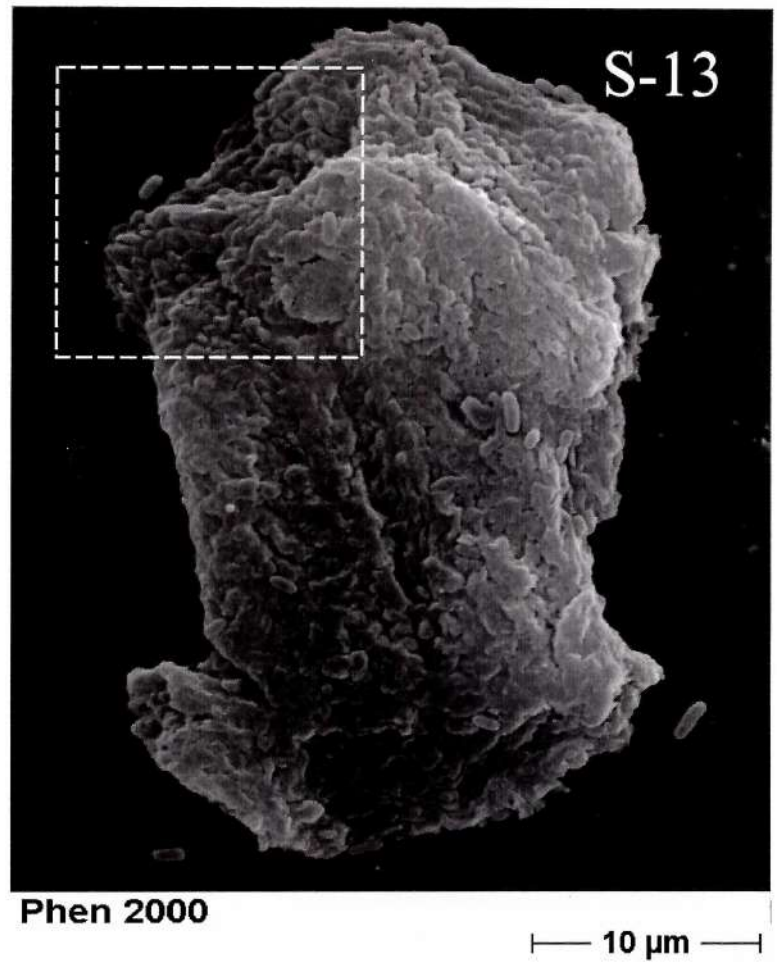


Foto IV-16: imágenes de cultivos de 48h de *S. paucimobilis* 20006FA en MML adicionado con 2000 mg/L de fenantreno obtenidas por de microscopía electrónica de barrido

Foto IV-17: imágenes de un cultivo de 5 días de *S. paucimobilis* 20006FA en MML con fenantreno 2000 mg/L obtenidas por de microscopía electrónica de barrido. Las células se indican con flechas.



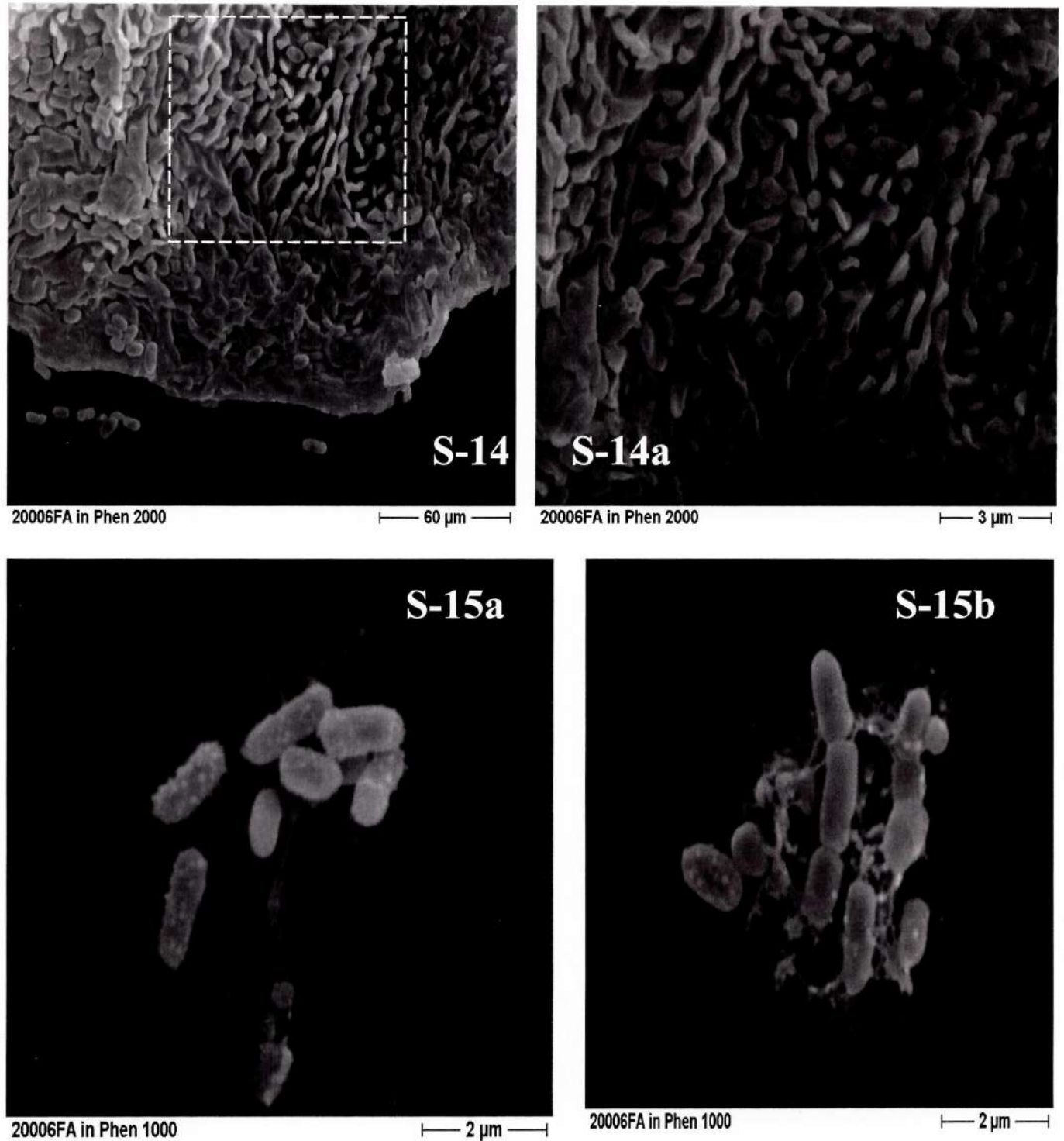


Foto IV-18: imágenes de un cultivo de 5 días de *S. paucimobilis* 20006FA en MML con fenantreno 2000 mg/L obtenidas por de microscopía electrónica de barrido. Las células se indican con flechas.

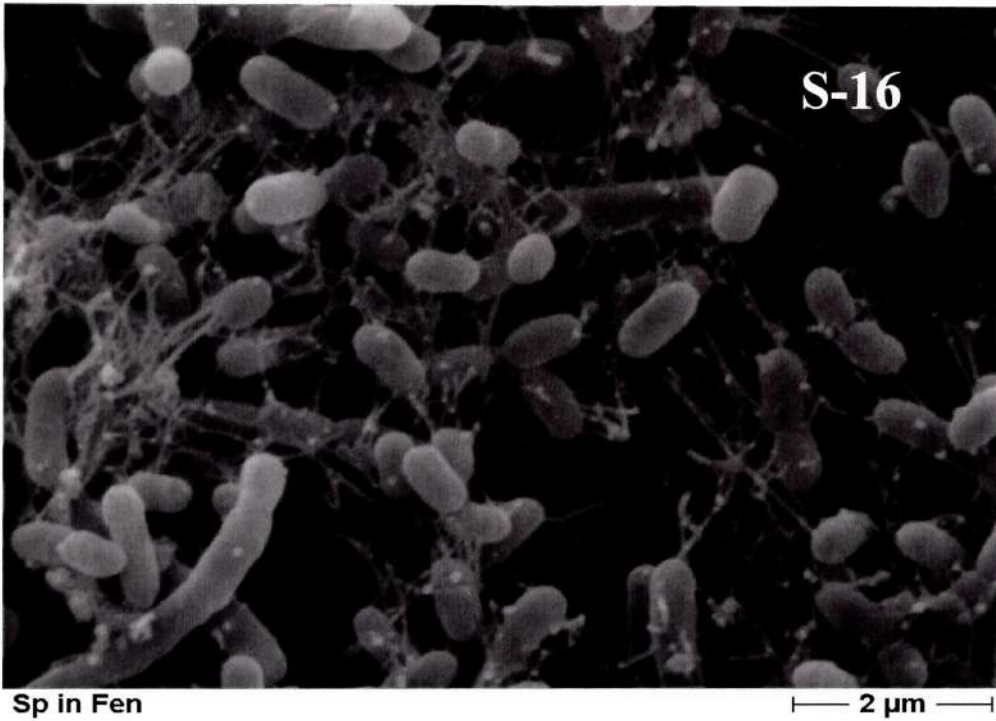
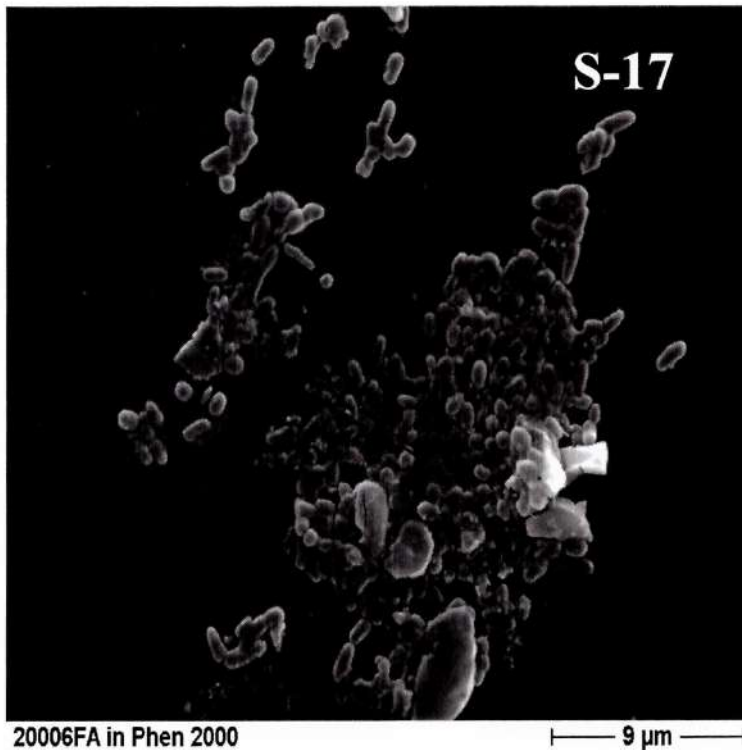


Foto IV-19: imágenes de microscopía electrónica de barrido de un cultivo de 15 días de *S. paucimobilis* 20006FA en MML con fenantreno 2000 mg/L obtenidas por de microscopía electrónica de barrido



y S-15b), también se muestran las células unidas por una red de biopolímero con vesículas brillantes sobre ellas (S-15 b).

Los cultivos de **15 días** (Foto IV-19) mostraron abundantes filamentos que podrían corresponder a un biopolímero. Cuando los filamentos están presentes, se observan también algunas estructuras similares a pequeñas vesículas brillantes localizadas sobre las células como en los cultivos más jóvenes. También pudieron observarse células adheridas una a la otra e inmersas en una matriz extracelular en lo que parece ser un biofilm alrededor de algunos cristales (S-17).

Se ha observado que en estas condiciones las células de *S. paucimobilis* 20006FA crecieron formando flóculos (Fig. IV-16 S-12 y IV-18 S-15), pero también adheridas a los cristales de fenantreno (Fotos IV-14 S-3, IV-15 S-5 y IV-16 S-9 y S-11). Las células suspendidas formaron flóculos que se encontraban unidos por un biopolímero, estos flóculos aumentaron su tamaño durante el tiempo de incubación (9, 24 y 48hs). Los cristales de fenantreno en el cultivo fresco (9 hs de incubación) estaban sólo escasamente colonizados con células, estas células se encontraban en división (Foto IV-14 S-3) indicando claramente que la cepa *S. paucimobilis* 20006FA tiene la capacidad de crecer adherida a los cristales de fenantreno. Los cultivos de más de 48 hs de incubación muestran un crecimiento en biofilm sobre los cristales de fenantreno. La formación de un biofilm en la superficie de los cristales de fenantreno y la formación de la red de polímero puede ser causada por la presencia de una matriz polimérica extracelular.

IV.C.2.ii Screening de la producción de agentes tensioactivos

Los biosurfactantes son moléculas anfipáticas de origen biológico, con dominios hidrofílicos e hidrofóbicos que le dan la propiedad característica de actuar en interfaces de distinta polaridad. Tales biosurfactantes ayudan a incrementar la transferencia de masa formando micelas en la interfase PAH-agua (Noordman y col., 1998) o pseudosolubilizando hidrocarburos y facilitando su captura por las células (Ahimou y col., 2000; Ron y Rosenberg, 2001).

Diferentes autores demostraron que el metabolismo de los hidrocarburos, incluyendo los PAH puede ser facilitado por la producción de biosurfactantes (García-Junco y col., 2001).

Se investigó si *S. paucimobilis* 20006FA creciendo en cultivos líquidos conteniendo fenantreno y pireno (no polares) produce agentes tensioactivos los cuales podrían facilitar la biodisponibilidad de la fuente de carbono.

Se utilizaron el test de la gota colapsada y la tensiometría del anillo para analizar cambios en la tensión superficial de los sobrenadantes de los cultivos.

Los cultivos de *S. paucimobilis* 20006FA fueron realizados en MML + 2000 mg/L de fenantreno, en MML + 1000 mg/L de pireno y en R3 (medio conteniendo varias fuentes de carbono simple). Como control positivo se utilizó un cultivo de *Alcanivorax borkumensis* en medio marino (Difco) suplementado con hexadecano (1%). Este microorganismo se destaca por la producción de sustancias que reducen la tensión superficial (Yakimov y col., 1998).

Test de la gota colapsada

El método la gota colapsada es un método rápido para determinar cambios en la tensión superficial, las gotas de la suspensión celular de las colonias productoras de biosurfactantes colapsan en una superficie cubierta de aceite (Jain et al, 1991)

La sensibilidad del test fue analizada utilizando soluciones de diferentes concentraciones del detergente SDS en diferentes medios de cultivo estériles (MML, Medio Marino y R3). La Figura IV-10 muestra las curvas de calibración obtenida en los diferentes medios. En ella puede apreciarse que el método posee buena sensibilidad para diámetros de gota entre 2,6 y 4,6 mm.

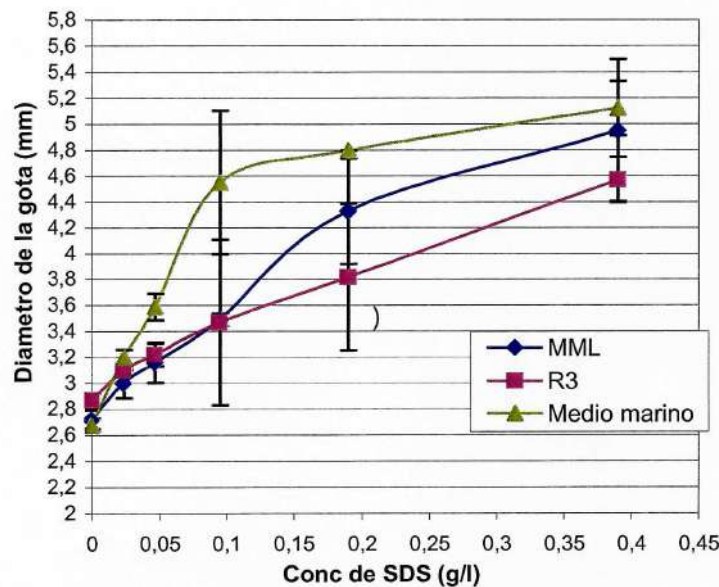


Figura IV-10: Diámetro de la gota de soluciones de SDS en diferentes medios: MML, R3A y Medio marino. Cada punto en el gráfico representa 2 ensayos independientes cada uno con 8 medidas por análisis.

En la Figura IV-11 se muestran los diámetros de gota obtenidos a partir del sobrenadante del cultivo de *A. borkumensis* en medio marino. La línea azul indica el diámetro de la gota obtenido con medio marino estéril.

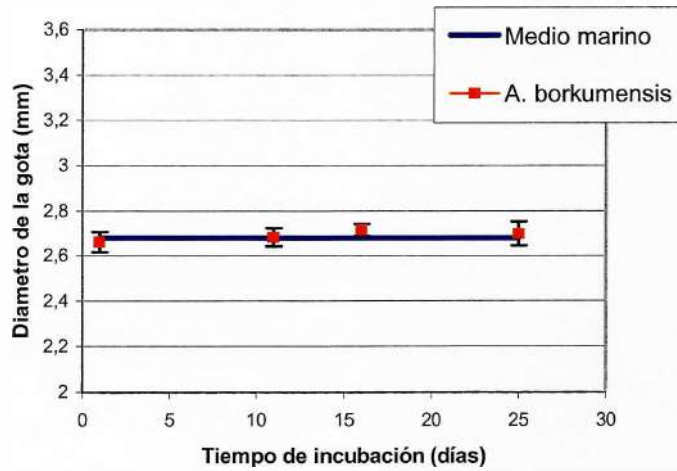


Figura IV-11: Diámetro de la gota de un cultivo de *A. borkumensis* en medio marino suplementado con hexadecano. Cada punto en el gráfico representa 2 ensayos independientes cada uno con 8 medidas por análisis

El análisis de los sobrenadantes de los cultivos utilizando el test de la gota colapsada no reveló disminución en la tensión superficial de los cultivos de *A. borkumensis*. Esto pudo deberse a que la tensión superficial se modificaba en un rango que no fue posible detectar con la sensibilidad del método.

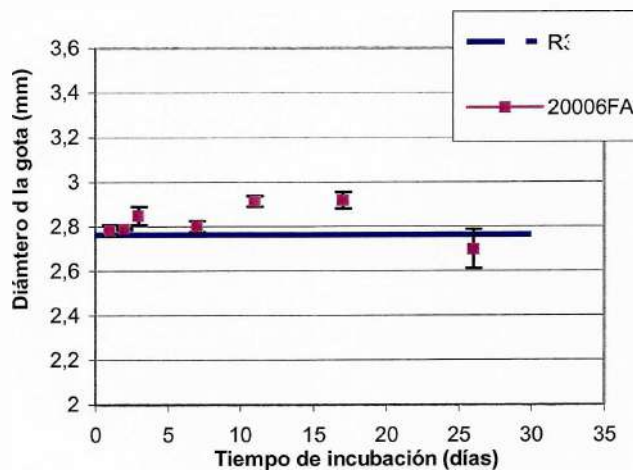


Figura IV-12: Diámetro de la gota de un cultivo de *S. paucimobilis* 20006FA en caldo R3. Cada punto en el gráfico representa 2 ensayos independientes cada uno con 8 medidas por análisis

En las Figuras IV-12 y IV-13 se muestran los diámetros de gota obtenidos a partir del sobrenadante de los cultivos de *S. paucimobilis* 20006FA en R3A y en MML suplementado con fenantreno respectivamente. La línea azul indica el diámetro de la gota obtenido con el medio estéril.

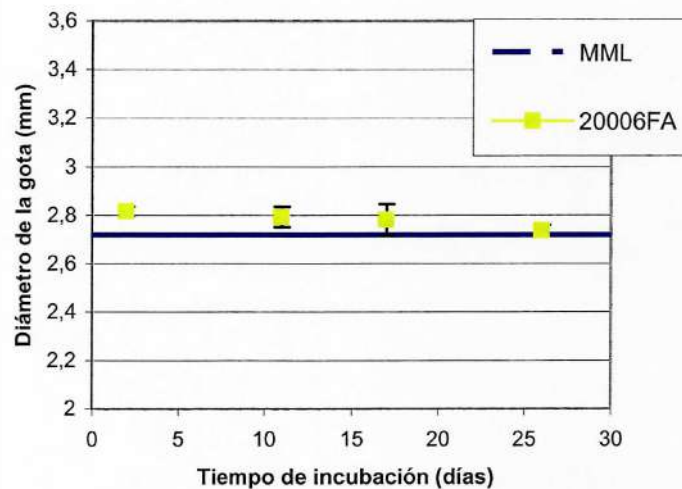


Figura IV-13: Diámetro de la gota de un cultivo de *S. paucimobilis* 20006FA en MML con 2000 mg/L de fenantreno. Cada punto en el gráfico representa 2 ensayos independientes cada uno con 8 medidas por análisis

Cuando se analizaron los cultivos de *S. paucimobilis* 20006FA MML suplementado con 2000 mg/L de fenantreno (Figura IV-13) y en caldo R3 (Figura IV-12), no se observaron cambios significativos en el tamaño de la gota.

Tensiometría del anillo

La tensión superficial de interfaces agua / aire puede ser fácilmente medida con un tensiómetro (Denger y Schink, 1995). La sensibilidad de la tensiometría del anillo fue analizada utilizando soluciones de diferentes concentraciones del detergente SDS en diferentes medios de cultivo estériles. En la figura IV-14 se muestran las curvas de calibración mostrando que el método posee la mayor sensibilidad para fuerzas entre 7 y 10 N/m. En las Figuras IV-15 a IV-17 se muestran los gráficos que ilustran la tensión superficial de los medios de cultivo luego que las células fueran separadas por centrifugación.

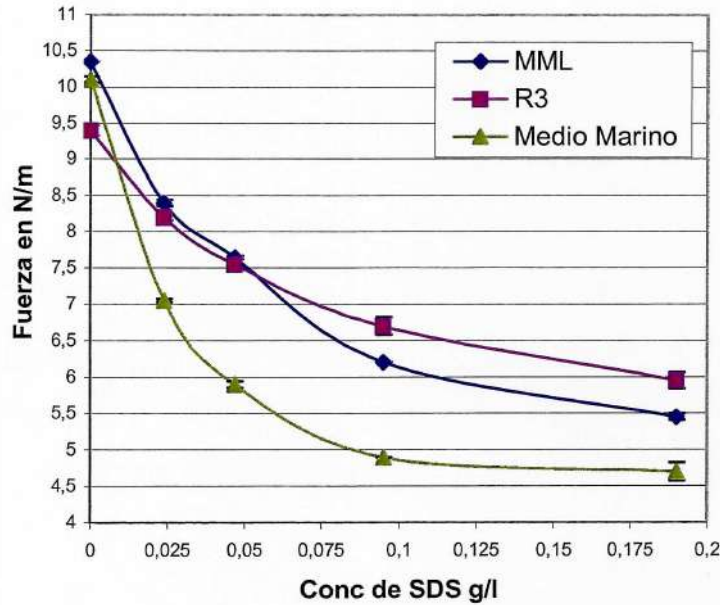


Figura IV-14: Medida de la tensión superficial de soluciones de SDS en diferentes medios: MML, R3A y Medio Marino. Se presenta la medida de 2 ensayos independientes cada uno con 5 medidas por análisis y su desviación estándar.

En la Figura IV-15 se muestra la tensión superficial del cultivo de *A. borkumensis* en medio marino. La línea punteada indica el diámetro de la gota obtenido con medio marino estéril.

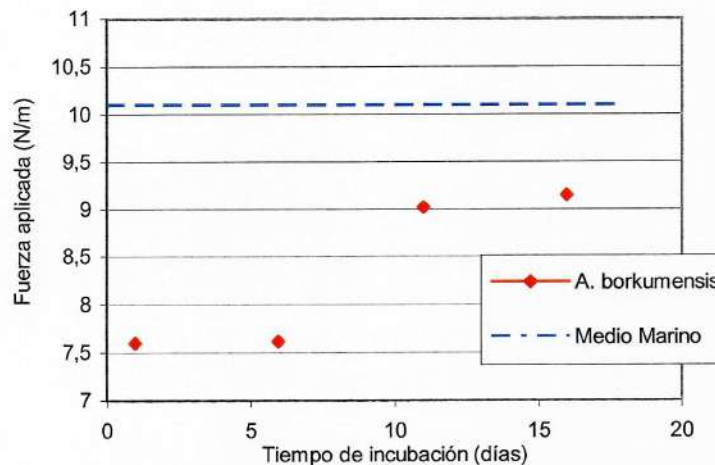


Figura IV-15: Medida de la tensión superficial del medio de cultivo de *A. borkumensis* en medio marino. Se presenta la medida de 2 ensayos independientes cada uno con 5 medidas por análisis y su desviación estándar.

El cultivo de *A. borkumensis* en medio marino suplementado con hexadecano produjo un descenso de la tensión superficial fue de 10,1 N/m. hasta 7,6 N/m a las 24 h de incubación.

En las Figuras IV-16 y IV-17 se muestran la tensión superficial de los sobrenadantes de los cultivos de *S. paucimobilis* 20006FA en MML adicionado con fenantreno, MML adicionado con pireno y en R3 respectivamente. La línea azul indica el diámetro de la gota obtenido con el medio estéril.

El análisis de los sobrenadantes de los cultivos líquidos utilizando el método de la tensiometría del anillo reveló disminución en la tensión superficial de los cultivos de *S. paucimobilis* 20006FA. La disminución en la tensión superficial fue más marcada en los cultivos en MML que habían sido adicionados con fenantreno (2000 mg/L) (Figura IV-16) que en cultivos en caldo R3 los cuales no contenían ningún hidrocarburo (Figura IV-17).

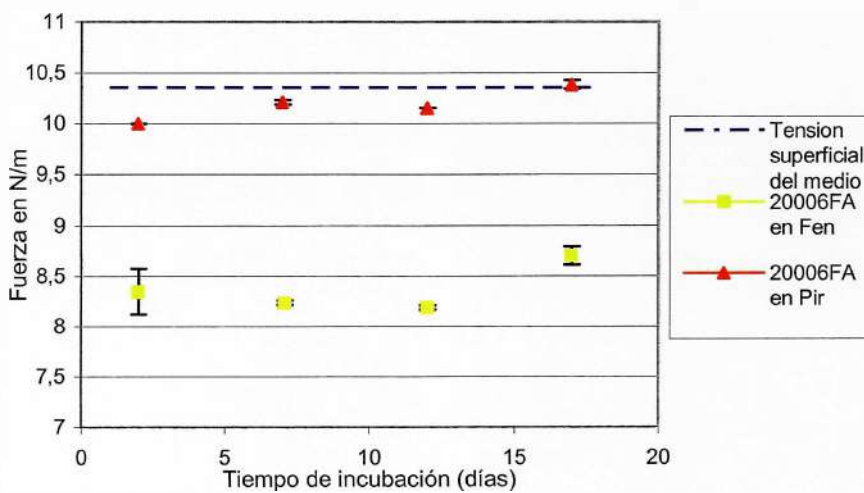


Figura IV-16: Medida de la tensión superficial del medio de cultivo de *S. paucimobilis* 20006FA en MML adicionado con fenantreno (2000 mg/L) y con pireno(1000 mg/L). Cada punto en el grafico representa 2 ensayos independientes cada uno con 5 medidas por análisis.

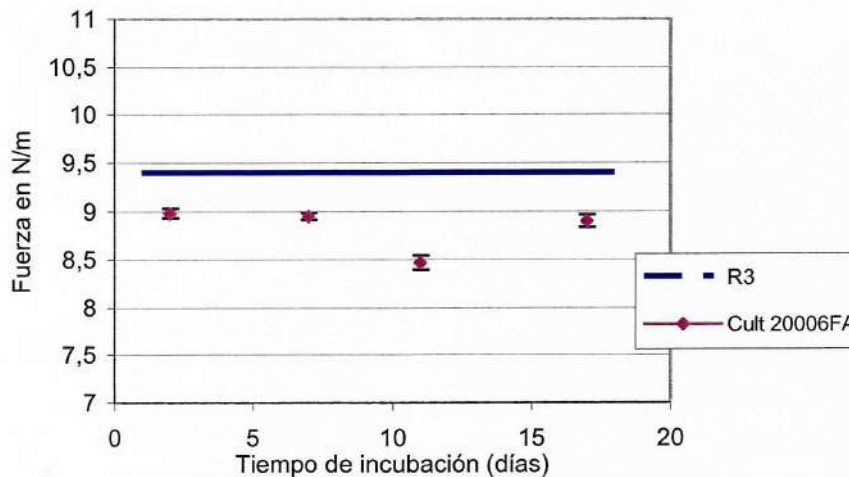


Figura IV-17: Medida de la tensión superficial el medio de cultivo de *S. paucimobilis* 20006FA en caldo R3. Cada punto en el grafico representa 2 ensayos independientes cada uno con 5 medidas por análisis.

Cuando *S. paucimobilis* 20006FA fue cultivada en caldo R3 la disminución en la tensión superficial fue desde 9,4 N/m hasta 9 N/m, esta disminución es menor que la observada en cultivos con fenantreno donde fue desde 10,4 N/m a 8,3 N/m. La disminución en la tensión superficial puede atribuirse a la producción de sustancias tensioactivas (biosurfactantes) por la cepa *S. paucimobilis* 20006FA. En cambio no se observó una disminución significativa de la tensión superficial cuando la cepa creció en MML suplementado con pireno (Figura IV-16).

IV.D. Discusión

La degradación de PAH en suelo es dominada por algunos géneros bacterianos como *Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* y *Mycobacterium* (Kästner y col., 1996; Mueller y col., 1997; Ho y col., 2000; Bastiaens y col., 2000; Johnsen y col., 2002).

Un alto porcentaje de los aislados ambientales con capacidad de degradar una variedad de compuestos ambientalmente peligrosos, incluyendo los PAH (Fredrickson y col., 1995; Mueller y col., 1997; Ho y col., 2000), dioxinas (Halden y col., 1999) y fenoles clorados (Nohynek y col., 1995; Edere y col., 1997; Copley, 2000), pertenecen al género *Sphingomonas*. Los miembros del género *Sphingomonas* parecen ser especializados en la degradación de compuestos aromáticos (Romine y col., 1999; Wattiau, 2002). Las *Sphingomonas* son el mayor grupo de bacterias degradadoras de PAH presentes en muchos sitios contaminados (Bastiaens y col., 2000; Pinyakong y col., 2000; Leys y col., 2004) y han demostrado poseer habilidades específicas para degradar esos contaminantes. Son consideradas como importantes biocatalizadores para la remediación del suelo debido a su amplia distribución y a la diversidad de sus capacidades metabólicas frente a contaminantes orgánicos recalcitrantes (Leys y col., 2004).

Muchas *Sphingomonas* pueden degradar naftaleno, antraceno, fenantreno, bifenilo, tolueno y xileno por una vía de degradación común a otras bacterias Gram-negativas y los intermediarios claves en la degradación de naftaleno, fenantreno y antraceno son el salicilato, el ácido 1-hidroxi 2-naftoico y el ácido 2-hidroxi 3-naftoico respectivamente (Piyankong y col., 2003).

Recientemente el estudio genético de las rutas de degradación de compuestos aromáticos de varias *Sphingomonas* reveló la presencia de un complejo arreglo de genes de degradación, los cuales muestran poca similitud con los encontrados en otras bacterias Gram-negativas como *Pseudomonas*, es decir poseen diferente secuencia y orden. Además los genes requeridos para una ruta catabólica en particular están organizados en varios operones

(Basta y col., 2004). Se sabe que estos genes están muy conservados en las *Sphingomonas* degradadoras de PAH (Kim y Zylstra, 1999; Romine y col., 1999; Piyankong y col., 2003).

Con el protocolo de aislamiento utilizado en este trabajo se obtuvieron varios cultivos capaces de degradar PAH. Entre estos cultivos fue seleccionado un aislado (20006FA) por demostrar utilizar un amplio espectro de PAH, produciendo el mayor halo de degradación de fenantreno en medio sólido. Este cultivo fue caracterizado morfológicamente (Fotos VI-3 y VI-4), fisiológicamente y bioquímicamente (Tabla IV-2) encontrándose que sus características eran consistentes con las características del género *Sphingomonas*, según fue definida por Yabuuchi y col. (1990 y 2002) (Tabla IV-2). El género del aislado bacteriano fue confirmado mediante la amplificación con primers específicos (Fig. IV-1) y su identificación como *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA fue realizada mediante el análisis de gen 16S rRNA (Tabla IV-3).

A partir del análisis de la secuencia mediante BLAST (Tabla IV-3) se observó que entre las bacterias genéticamente relacionadas con la cepa aislada, existen otras capaces de degradar PAH (remarcadas en celeste en la Tabla IV-3), entre ellas la que ha sido más estudiada por su capacidad biodegradadora es la *Sphingomonas paucimobilis* EPA 505 (Mueller y col., 1997; Ho y col., 2000; Luning y Pritchard, 2002; Uyttebroek y col., 2006). Se conoce que esta cepa es capaz de degradar fenantreno, antraceno, naftaleno y fluorantreno y de co-metabolizar PAH de alto peso molecular como pireno, criseno, benzo-a-pireno y benzo-b-fluorantreno (Mueller y col., 1997) y que los genes degradadores se encuentran en plásmidos (Pinyakong y col., 2003).

El mecanismo de co-metabolismo de esta cepa probablemente involucre por un lado una baja especificidad de las dioxigenasas involucradas en el metabolismo del fluoranteno y los PAH de alto PM, que no actúan como sustrato de crecimiento, y por otro lado la carencia de enzimas para seguir metabolizando el anillo abierto (Ho y col., 2000).

En *S. paucimobilis* EPA 505 existen indicios de que el fenantreno, el pireno y el fluoranteno compiten por los mismos sitios enzimáticos (Luning y Pritchard, 2002). Además se sabe que la cepa no es capaz de crecer en pireno pero sí acumula un metabolito intermediario de la ruta de degradación de pireno, indicando que este no puede ser ulteriormente metabolizado (Ho y col., 2000).

Ho (2000) sugirió que la diversidad metabólica entre *Sphingomonas* puede variar considerablemente.

En el caso de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA, se observó que es capaz de crecer en presencia de altas concentraciones de fenantreno, utilizándolo como única fuente de carbono y energía (Fig. IV-3), produciendo una eliminación del 75 ± 5 % de fenantreno (Tabla IV-5). El ataque inicial ocurriría a través de una enzima dioxigenasa constitutiva (sección IV.B.2). La

cepa *S. paucimobilis* 20006FA es capaz de realizar el clivaje del fenantreno hasta su metabolización completa por la vía del salicilato (Ibarrolaza y col., 2007).

Durante el crecimiento en fenantreno y en salicilato, el cultivo desarrolló un color amarillo-rojizo (Foto IV-8). Se sabe que los productos coloreados corresponden a la producción y transitoria acumulación de productos de degradación de fenantreno (Story y col., 2000), lo que se corresponde con el hecho de que la cepa solo es capaz de mineralizar un bajo porcentaje ($14 \pm 2\%$) del fenantreno que degrada (Fig. IV-6). Esta acumulación de productos de degradación, a pesar de los indicios de la existencia de una ruta de degradación completa (Ibarrolaza y col., 2007), podría estar relacionada con la regulación no coordinada de la expresión de enzimas catabólicas a causa de la ubicación de sus genes en operones diferentes (Basta y col., 2004).

A diferencia de la cepa *S. paucimobilis* EPA 505 se encontraron evidencias de que la cepa *S. paucimobilis* 20006FA sería capaz de crecer en pireno (Fig. IV-4) y se han obtenido pruebas de lo que podría ser un indicio de la formación de un biofilm sobre la superficie del cristal de pireno. (Foto IV-6); aunque no fue posible detectar una significativa degradación de pireno ($12 \pm 4\%$) ni se observó mineralización cuando la cepa se cultivó en biorreactores conteniendo pireno como única fuente de carbono y energía. Sin embargo fue posible observar una mayor producción de CO₂ y un significativo aumento de la eliminación de pireno en el biorreactor que contenía la mezcla fenantreno y pireno (Fig. IV-7 y Tabla IV-6) con respecto al biorreactor que contenía solo fenantreno, esto estaría dando un indicio de la estimulación de la degradación del pireno cuando el fenantreno está presente. La estimulación de la eliminación de un hidrocarburo por otro ha sido previamente observada por Bouchez y col. (1999). Adicionalmente la presencia de una fase de latencia en la producción de CO₂ y el consumo de oxígeno en el biorreactor con MML suplementado con fenantreno y pireno, que no se observó en los biorreactores suplementados solo con fenantreno, podría estar indicando un posible efecto inhibitorio del pireno sobre la cepa.

Durante el crecimiento de cultivos en medio líquido con cristales de PAH en cantidades que exceden la solubilidad acuosa como única fuente de carbono y energía se observa que la concentración de PAH disuelto satura el sistema de toma de las bacterias, que permanece saturado porque la disolución de PAH es lo suficientemente rápida como para satisfacer el consumo de sustrato por la población creciente. En este caso la población bacteriana crece exponencialmente a su velocidad fisiológica máxima. Cuando el consumo de PAH por la población creciente excede la velocidad de disolución del PAH, la concentración del PAH disuelto cae a valores más bajos que los de saturación y el crecimiento exponencial cesa, de modo que la fase exponencial en la curva de crecimiento en PAH es corta (Johnsen y col., 2005).

Típicamente el cristal de PAH tiene una baja relación área / volumen que permanece constante por largos períodos de tiempo conduciendo a un flujo casi constante de sustrato hacia la población bacteriana. La velocidad de crecimiento específica decrece a medida que el número de células aumenta porque la población creciente comparte el flujo total de sustrato. Por lo tanto la formación de biomasa caerá con una población creciente, aun cuando el sustrato cristalino sea proveído en exceso y la velocidad de disolución permanezca constante. El consumo de sustrato para el mantenimiento total crecerá a medida que crezca la población bacteriana y la fracción de sustrato que es canalizada hacia la formación de biomasa disminuirá constantemente hasta llegar a cero (Pirt, 1965). En la fase pseudo estacionaria las células alcanzan un quasi-equilibrio donde el flujo total de PAH es consumido para el mantenimiento celular y el crecimiento cesa (Johnsen y col., 2005).

Cuando se estudió la curva de crecimiento de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA en MML adicionado con cristales de fenantreno (Fig. IV-3) se analizó el crecimiento mediante el recuento de bacterias planctónicas y se observó una fase de crecimiento exponencial durante 40 hs mostrando que durante ese período la disolución del fenantreno permitió satisfacer la demanda de la población creciente. En cambio al estudiar la curva de crecimiento en MML adicionado con cristales de pireno (Figura IV-4) se observó una fase muy corta de crecimiento exponencial. Esto podría deberse a la diferente solubilidad de los PAH utilizados. La solubilidad del pireno es baja (0,135 mg/L, 25° C) en comparación con la de fenantreno (0,730-1,600 mg/L, 25°C) lo que podría provocar el rápido establecimiento de la fase pseudo estacionaria durante el crecimiento en pireno, en la que el sustrato disuelto solo alcanza para el mantenimiento celular.

Hay varias publicaciones que indican que los genes que codifican para las enzimas de las vías metabólicas de degradación de compuestos xenobióticos por cepas de *Sphingomonas* están presentes en grandes plásmidos (Romine y col., 1999; Basta y col., 2004).

Kim y col. (1996) estudiaron la ubicación de los genes para la degradación de PAH en *Sphingomonas* y encontraron que los genes degradadores en algunas cepas podían encontrarse en el cromosoma mientras que en otras se ubicaban en plásmidos.

En el caso de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA se observó que la habilidad de crecer en PAH se mantuvo luego de muchas generaciones de cultivos en medios no selectivos. Sin embargo, el número de bandas de plásmidos que aparecen después de la electroforesis (Figura IV-9) fue variable (de uno a cuatro) en las diferentes repeticiones del experimento, indicando una alta inestabilidad para los plásmidos presentes en esta cepa. Esta característica también fue observada por Bastiaens y col., (2000) en cepas de *Sphingomonas* degradadoras de PAH. Debido a estos resultados podríamos suponer que la capacidad degradadora de la cepa en estudio podría no estar codificada en plásmidos.

Un número de propiedades fenotípicas han sido propuestas demostrando jugar un rol característico en la degradación de PAH ya que logran incrementar su biodisponibilidad. Ellas son, la habilidad de utilizar un amplio rango de fuentes de carbono, la eficiencia en la formación de biofilm, la hidrofobicidad de superficie, la producción de biosurfactantes, la movilidad y la quimiotaxis (Cunliffe y Kertesz, 2006).

La habilidad de una cepa bacteriana de utilizar una variedad de fuentes de carbono puede ser ventajosa en suelo, el cual es característicamente oligotrófico (Cunliffe y Kertesz, 2006). El hecho de que la cepa en estudio no fuera capaz de crecer utilizando ninguno de los sustratos incluidos en el análisis ECOplate, que contiene distintas fuentes de carbono consideradas ambientalmente relevantes (Garland y Mills, 1991), y solo pudiera utilizar algunos pocos de los sustratos incluidos en el API-20NE (Tabla IV-2) podría indicar que se trata de una cepa PAH-especialista y que tal vez no sería capaz de sobrevivir en un ambiente no contaminado. Sin embargo debe aclararse que la concentración de los sustratos en estos sistemas de identificación es relativamente alta, y puede no ser la adecuada para todas las bacterias oligotróficas (Cunliffe y Kertesz, 2006).

Se han investigado las propiedades ecológicas significativas de la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA para estimar su actividad biodegradadora en suelo, como son la producción de biosurfactantes, la capacidad de las células de adherirse a superficies y de producir biofilms.

Se pudo observar una clara reducción de la tensión superficial en los cultivos de *S. paucimobilis* 20006FA, especialmente en los cultivos en MML suplementado con fenantreno (Fig. IV-16). Es bien conocido que los biosurfactantes que reducen la tensión superficial son aquellos de bajo peso molecular (Ron y Rosenberg, 2001). Se observó además que, cuando la cepa crece en MML suplementado con fenantreno, la superficie celular se encuentra cubierta de vesículas extracelulares (Foto IV-18, figura S-15a). Los mismos cambios en la superficie celular durante el crecimiento en hidrocarburos fueron reportados previamente para *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (Fernandez-Linares y col., 1996), *Pseudomonas nautica* 617 (Husain y col., 1997) y *Sphingomonas sp.* (Gilewicz y col., 1997). Estas vesículas extracelulares podrían ser biosurfactantes particulados que particionan hidrocarburos para formar una microemulsión (Zinjarde y Pant, 2002). De esto se deduce que una de las estrategias que podría utilizar la cepa para favorecer la incorporación de PAH a la célula sería la producción de sustancias tensioactivas de bajo PM en forma de pequeñas vesículas que se ubican en la interfase entre la superficie acuosa en que se encuentra inmersa la células en el poro de suelo y el PAH hidrófobo, jugando un rol importante en la facilitación de la toma de PAH por las células microbianas.

Existen reportes de captura de compuestos solubilizados por biosurfactantes que son especie específicos y dependientes de energía, los cuales muestran una directa interacción de

las micelas de biosurfactantes con las membranas celulares (Beal y Betts, 2000; Noordman y Jansen, 2002). Conociéndose que los biosurfactantes representan constituyentes de la envoltura celular (Neu, 1996) no resulta extraña la posibilidad de una fusión entre las micelas y las células.

Los microorganismos se depositan y adhieren a las superficies inmersas en un ambiente acuoso como resultado de un proceso en varios pasos, conduciendo a la formación de una comunidad adherente compleja llamada biofilm (Gomez-Suarez y col., 2002).

Los biofilms se caracterizan por poseer una compleja arquitectura. La distribución de las células y la secreción de exopolímeros (EPS) es una manifestación de la compleja organización física, química y biológica del biofilm.

Los biofilms monocultivo son relativamente raros en la naturaleza. Pero desde el punto de vista experimental hay ventajas en estudiarlos, porque se evitan las variaciones en la arquitectura introducidas por otras especies (Venugopalan, 2005).

Utilizando microscopía de epifluorescencia confocal se observaron estructuras similares a un biofilm producidas por *S. paucimobilis* 20006FA (Foto IV-11), en ellas se pudo comprobar que la cepa se deposita en forma de microcolonias sobre los cristales de fenantreno después de 5 días de cultivo. Estos resultados están de acuerdo con Venugopalan y col. (2004), quienes describieron la arquitectura de biofilms de *Sphingomonas sp.* L138 (degradadora de PAH) encontrando que esta consistía en microcolonias distribuidas en forma no uniforme y secreción de EPS, pobre al principio pero incrementada después de 96hs.

Cuando estudiamos el proceso de formación de ese biofilm, a tiempos cortos pudimos observar finos filamentos que parecen estar mediando el contacto entre la célula y la superficie del sustrato (Foto IV-14) y mas tarde la aparición de una sustancia polimérica extracelular (EPS) que rodea las células (foto IV-15), las EPS están a menudo asociadas a la capacidad de las bacterias de utilizar hidrocarburos (Olivera y col., 2003). Aunque para el caso de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA la producción de los filamentos ocurrió bajo diferentes condiciones, cuando la cepa fue cultivada en R3 (Foto IV-12) y en MML suplementado con fenantreno (Foto IV-15 y IV-16). En el cultivo conteniendo el hidrocarburo estos filamentos se produjeron en mucha mayor cantidad. De estas observaciones suponemos que *S. paucimobilis* 20006FA produce una sustancia extracelular que ayuda favorecer la degradación de fenantreno en cultivos líquidos.

La observación de que las células de los cultivos de 9 h poseían una superficie homogénea con la formación visible de productos extracelulares en forma de filamentos (Fig.IV-14), mientras que las de mas de 24 h desarrollaron una superficie rugosa, formando agregados (Fotos IV-15, IV-16 y S-17) y parecían estar rodeadas por sustancias poliméricas extracelulares, fue previamente realizada por Lin y col. (2005) en cultivos de *Gordonia alicanivorax* creciendo en medios líquidos suplementados con diesel.

Se pensó que los filamentos producidos por *S. paucimobilis* 20006FA podrían estar formados por polisacáridos y se realizaron observaciones con CLSM donde se utilizaron cinco lectinas que tienen afinidad por distintos azúcares que se conoce están presentes en EPS de *Sphingomonas* (Johnsen y col., 2000), pero no pudo demostrarse la presencia de tales azúcares.

Azeredo y Oliveira (2000) encontraron que la presencia de compuestos activos de superficie incrementaban la adherencia de *Sphingomonas paucimobilis* al vidrio. Se sabe que el EPS está involucrado en el anclaje de biofilms a superficies hidrofóbicas (Wick y col., 2001; Rodrigues y col., 2003). Así mismo el EPS puede facilitar el contacto entre las células y la superficie del cristal al ser considerado como un emulsificante. Lin y col. (2005) detectaron que la producción de EPS por *Pseudomonas aeruginosa* SG81 produjo una disminución en la tensión superficial del cultivo bacteriano de 70 a 45 mJ/ m. En cultivos de 5 días (Foto IV-18) se observaron estructuras que parecen ser hoyos o canales sobre los cristales de fenantreno. Pueden discutirse dos causas:

- i) Los hoyos o canales representan lugares en la superficie del cristal cubierta por un biopolímero donde las células estaban ubicadas antes del proceso de fijado. La estructura del biopolímero es abandonada después del fijado y muestra hoyos en esos lugares específicos. Sin embargo todavía se observan algunas células.
- ii) Los hoyos se originan en el cristal de fenantreno después de que este es degradado por las células y de este modo se produce la estructura de canales (Wick y col., 2004).

En la mayoría de los ambientes existe deposición y despegado cíclico de microorganismos. Los organismos despegados pueden dejar huellas (footprints) detrás (Neu y Marshall, 1991), que consisten tanto en fragmentos de la superficie celular abandonados (Neu, 1992), biosurfactantes excretados (Velraeds y col., 1998) o EPS. Esas huellas forman una nueva superficie para la re-deposición de una nueva generación de microorganismos.

El material presente en las huellas puede ser marcado utilizando lectinas para identificar sus propiedades (Neu, 1996).

Wick y col. (2002) publicaron una investigación donde demuestran que el mecanismo por el cual *Mycobacterium* sp. LBo1T favorece la biodisponibilidad del antraceno es la formación de un biofilm sobre los cristales de ese PAH.

En el presente trabajo, utilizando la microscopía electrónica de barrido pudimos demostrar que la cepa *S. paucimobilis* 20006FA es capaz de producir fisión binaria sobre la superficie de los cristales de fenantreno (Foto IV-14, S-3) demostrando de esta manera que las células proliferan y crecen en contacto directo con los cristales. Adicionalmente se ha observado que la cepa disminuye la tensión superficial en medio líquido conteniendo fenantreno. Esto podría explicar el hecho de que también se encontraran células en crecimiento suspendidas en el medio de cultivo que probablemente estarían consumiendo el

fenantreno disuelto. Contrariamente a lo que ha publicado Wick y col. (2002) en el presente trabajo no se ha podido detectar que la cepa en estudio prefiera uno solo de los posibles mecanismos para favorecer la biodisponibilidad de fenantreno.

Durante el desarrollo del presente capítulo se ha demostrado que la cepa de *S. paucimobilis* 20006FA, aislada a partir de suelos contaminados con fenantreno posee un amplio espectro degradador de PAH (antraceno, dibenzotiofeno y fenantreno). Se determinó que es capaz de crecer utilizando fenantreno como única fuente de carbono y energía, produciendo la mineralización parcial del mismo. Adicionalmente se comprobó que es capaz de crecer utilizando pireno como única fuente de carbono y energía. Se ha comprobado cierta estabilidad de la capacidad degradadora de PAH. Así mismo se ha demostrado que esta cepa posee propiedades promotoras de la biodisponibilidad de PAH: se determinó en forma directa, a través de observaciones microscópicas la capacidad de la cepa de formar biofilms sobre los cristales de PAH y se encontraron evidencias de la producción de agentes que favorecen su acercamiento a los PAH (EPS) y su solubilización (biosurfactantes). Por todo esto se consideró que la cepa posee condiciones que justifican la realización de ensayos de inoculación en procesos de biorremediación de suelos contaminados con PAH.

A grayscale micrograph showing a dense population of soil bacteria. The cells are mostly rod-shaped and appear to be in various stages of growth or division. Some cells are more prominent than others, showing clear outlines and internal structures. The background is a complex, textured pattern of overlapping cells and fibers.

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSION

Dinámica del proceso de biorremediación de suelos contaminados con fenantreno y estudio de los mecanismos de adhesión celular en ensayos de bioaumentación en biorreactores

V. Dinámica del proceso de biorremediación de suelos contaminados con fenantreno y estudio de los mecanismos de adhesión celular en ensayos de bioaumentación en biorreactores

Debido a los contradictorios resultados encontrados hasta el momento sobre el bioaumentación se hace necesaria la simplificación de los sistemas para minimizar el número de variables, es por esta razón que al igual que otros autores (Johnsen y col., 2004; Gomes et al., 2005; Cunliffe and Kertesz; 2006) se decidió estudiar sistemas contaminados con un solo PAH puro o mezclas de dos PAH, en condiciones controladas, lo cuales resultan más accesibles para evaluar la efectividad de las estrategias de bioaumentación sobre los procesos de biorremediación de PAH.

Los estudios iniciales de bioaumentación con la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA fueron realizados en biorreactores de suelo en columnas (ver Materiales y Métodos). En estos biorreactores se produce una degradación efectiva de los contaminantes presentes en el suelo debido a que el aireado se produce a través del pasaje por toda la columna de un flujo de aire, esto provee oxígeno bajo condiciones controladas y optimizadas (Kumada y col., 2005). Además los biorreactores presentan la ventaja de ser un sistema cerrado por lo que el microcosmo puede mantenerse estéril y permite la medida de producción de CO₂ on line.

Para estudiar los mecanismos básicos de adhesión celular, producción de biofilms y/o producción de biosurfactantes por la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA se realizaron observaciones microscópicas de las células en los biorreactores de suelo y en cultivos líquidos conteniendo suelo en suspensión.

V.A. Determinación del efecto del bioaumentación sobre la dinámica del proceso de biorremediación en biorreactores

Se prepararon ocho biorreactores (Foto V-1 y Tabla V-1) los cuales fueron preparados con: (i) suelo (Biorreactor V); (ii) suelo contaminado con fenantreno (Biorreactor I); (iii) suelo contaminado con fenantreno e inoculado con la cepa *S. paucimobilis* 20006FA (Biorreactores II y III); (iv) suelo inoculado con la cepa *S. paucimobilis* 20006FA (Biorreactor IV). Adicionalmente se prepararon biorreactores a partir del (v) suelo estéril inoculado con la cepa *S. paucimobilis* 20006FA (Biorreactor VI) y (vi) suelo estéril contaminado con fenantreno e inoculado con *S. paucimobilis* 20006FA (Biorreactores VII y VIII). Los biorreactores inoculados fueron adicionados una única vez con $1,410^8$ ufc/g de suelo seco, el día 0 de tratamiento. La contaminación con

fenantreno fue realizada 24 hs antes. Los biorreactores fueron incubados por un período de 60 días con aireación diaria.



Foto V-1: Biorreactores utilizados para el monitoreo de la biorremediación

Durante el período de incubación se analizó la eliminación del contaminante y actividad metabólica de la comunidad microbiana del suelo, la que fue determinada midiendo la producción de CO₂. Se determinó también la dinámica de las poblaciones microbianas cultivables degradadoras de PAH y heterótrofas totales, la adhesión de las células a superficie de las partículas de suelo y la producción de sustancias poliméricas extracelulares.

Condiciones	Biorreactores							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Suelo	☐	☐	☐	☐	☐			
Suelo estéril						☐	☐	☐
Fenantreno 2000 mg/kg de suelo seco	☐	☐	☐				☐	☐
Células inoculadas		☐	☐	☐		☐	☐	☐

Tabla V-1: Descripción de los biorreactores conteniendo microcosmos de suelo con diferentes condiciones de contaminación e inoculación. (☐)=indica componente agregado al sistema

V.A.1 Efecto del bioaumentación sobre la eliminación del contaminante en suelo

La concentración de fenantreno durante el tratamiento de biorremediación en biorreactores se determinó por cromatografía gaseosa.

En la figura V-1 se muestra la concentración de fenantreno en los biorreactores contaminados (I, II, III y VII) durante el tratamiento. Se puede observar que después de 40 días de tratamiento los biorreactores I, II y III mostraron una eliminación del hidrocarburo de alrededor del 90%.

La curva de eliminación del biorreactor no inoculado (I) mostró una fase de latencia (alrededor de nueve días). Esta fase de latencia no fue observada en los biorreactores inoculados (II y III), por lo tanto estos reactores mostraron concentraciones residuales de fenantreno menores a los valores hallados en el biorreactor I durante los primeros 20 días de incubación.

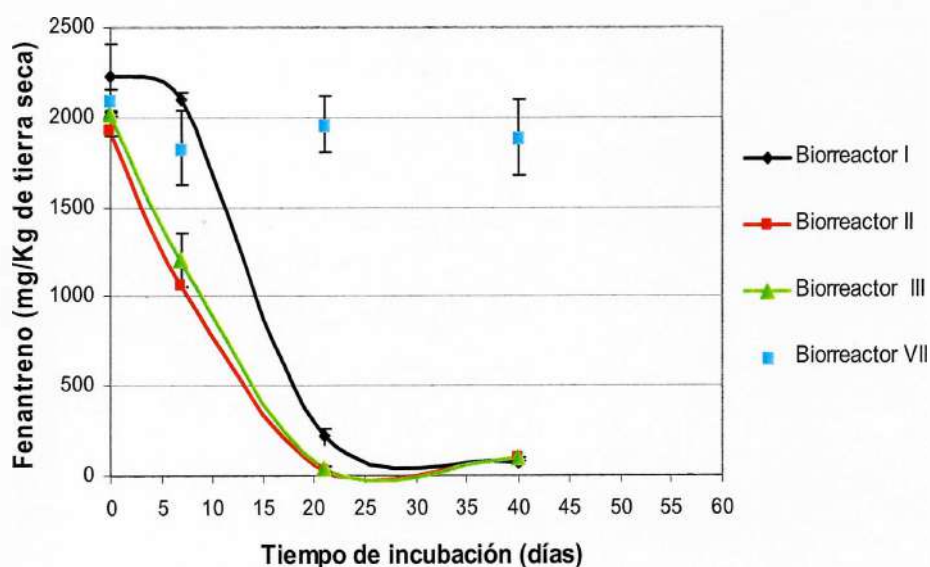


Figura V-1: Concentración de fenantreno en los biorreactores de suelo (I : Suelo+Fenantreno; II y III: Suelo+Fenantreno+S. *paucimobilis* 20006FA); VII: Suelo estéril+Fenantreno+S. *paucimobilis* 20006FA) durante el tiempo de incubación. Se grafican los valores promedio y las desviaciones estándar de cuatro replicas por biorreactor.

Después de 25 días de tratamiento no hubo diferencias entre las concentraciones residuales de fenantreno de los microcosmos inoculados (II y III) y el no inoculado (I).

Sorpresivamente la curva de eliminación del contaminante correspondiente al biorreactor VII (conteniendo suelo estéril, fenantreno y el inóculo) no mostró una eliminación significativa de fenantreno (Figura V-1).

V.A.2 Efecto del bioaumentación sobre la actividad metabólica de las poblaciones bacterianas durante el proceso de biorremediación

La actividad metabólica del suelo contenido en los biorreactores fue monitoreada on-line analizando la producción de CO_2 en cada columna (figuras V-2a y V-2b).

Los biorreactores que no fueron contaminados con fenantreno (IV y V) mostraron una baja producción de CO_2 a lo largo de todo el tratamiento (Fig. V-2a). El biorreactor inoculada pero no contaminado (IV) no mostró diferencias en comparación con el suelo control (V).

Todos los biorreactores con suelo contaminado mostraron un inicial incremento en la producción de CO_2 durante los primeros 5 días de tratamiento (I, II y III) y la producción total de CO_2 alcanzó valores similares a los 30 días de incubación (Fig.V-2a). Sin embargo los biorreactores difirieron en su actividad metabólica. Los biorreactores inoculados (II y III) mostraron un pico de producción de CO_2 que se inició al comienzo del tratamiento y fue sostenido hasta el día 16 de incubación (Fig. V-2b), manteniendo la velocidad de producción de CO_2 durante este período (Fig.V-2a). En cambio en el biorreactor no inoculado (I) se observó una fase de latencia en la producción de CO_2 entre los días 5 y 10 de incubación (Fig.V-2a), produciéndose su mayor pico luego de 10 días de tratamiento (Fig. V-2b).

En la figura V-2b se observa que la fase de alta producción de CO_2 en los biorreactores I, II y III (días 0 a 20) coincide con la fase de alta eliminación de fenantreno (Fig. V-1).

En los biorreactores que contenían suelo estéril (VI, VII y VIII), no se observó producción de CO_2 dentro de los primeros 15 días de incubación. Los valores observados luego del día 15 de incubación se produjeron como consecuencia de una contaminación, según fue determinado por observación de las colonias aisladas a partir de este suelo.

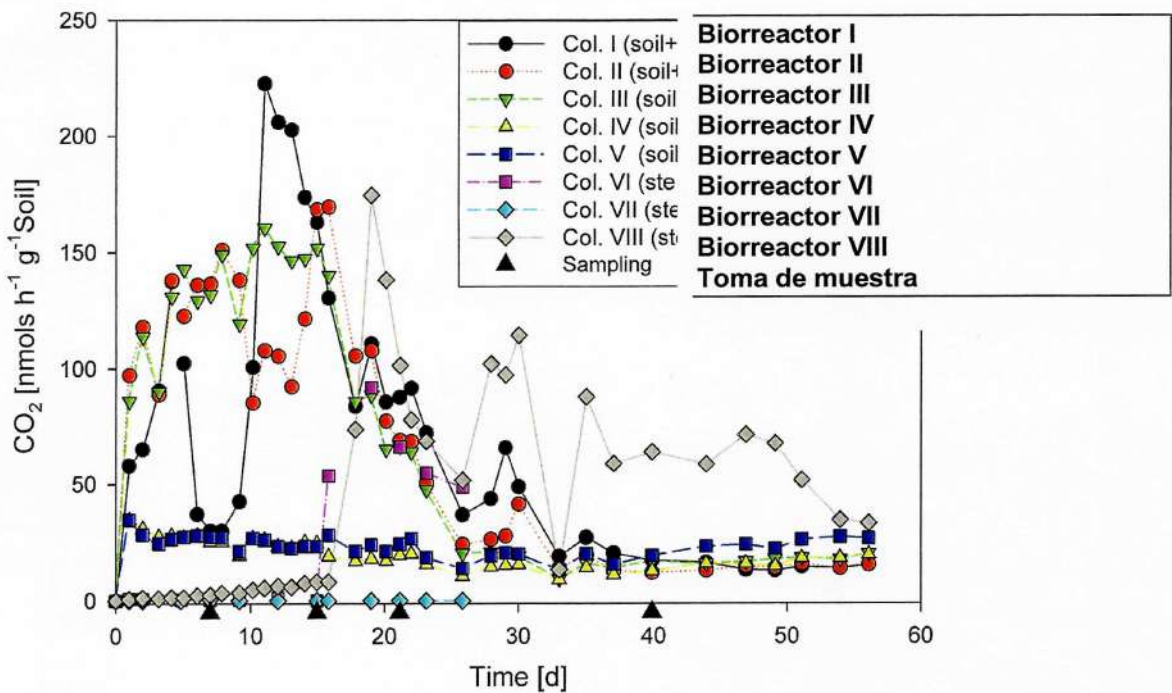
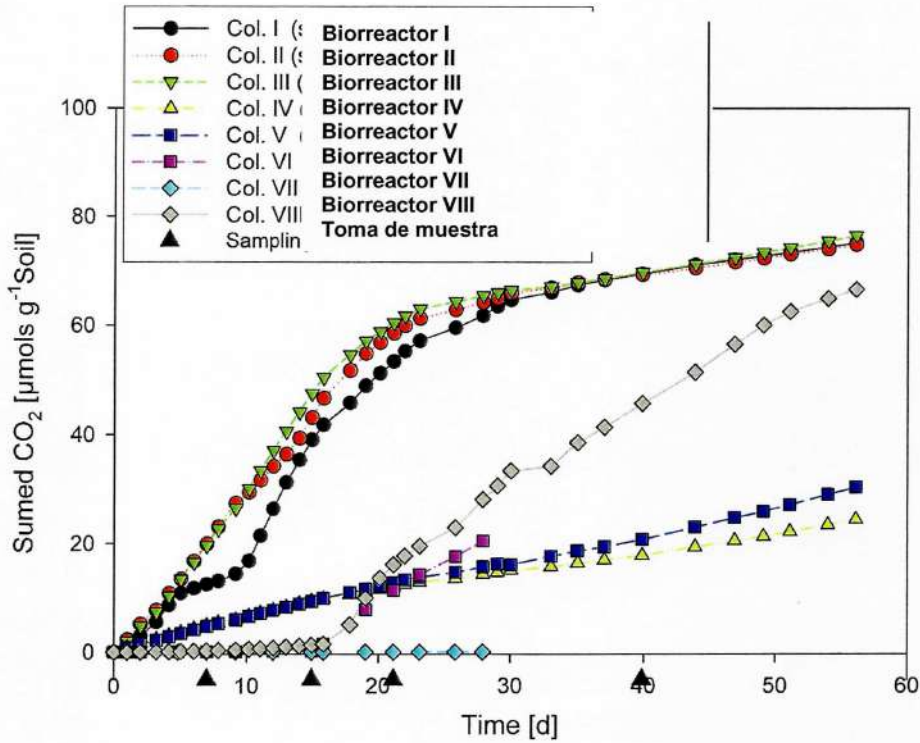


Figura V-2: 2a: Suma de la producción de CO₂ en las Columnas I - VIII durante el proceso de biorremediación.

2b: Producción de CO₂ en las Columnas I - VIII durante el proceso de biorremediación. (I: Suelo+Fenantreno; II y III: Suelo+Fenantreno+S. paucimobills 20006FA); IV: Suelo+S. paucimobills 20006FA; V: Suelo; VI: Suelo estéril +S. paucimobills 20006FA; VII y VIII: Suelo estéril+Fenantreno+S. paucimobills 20006FA)

V.A.3 Efecto del bioaumentación sobre la dinámica de las poblaciones microbianas cultivables

El número de bacterias heterótrofas cultivables determinado por el método de recuento en placa en R2A-agar en cada biorreactor se muestra en la figura V-3 y el número de bacterias cultivables degradadoras de PAH determinadas por el método del NMP se muestra en la figura IV-4.

La contaminación del suelo con fenantreno produjo un importante aumento (alrededor de dos órdenes de magnitud) en el número de bacterias heterótrofas cultivables del biorreactor I con respecto al control (biorreactor V). La inoculación logró producir un aumento adicional en el número de ufc de microorganismos heterótrofos en los biorreactores II y III, que persistió hasta el día 7 de incubación.

Durante todo el experimento el número de ufc en los biorreactores contaminados (I, II y III) permaneció considerablemente mas alto que en los no contaminados (VI y V).

En cuanto al biorreactor inoculado pero no contaminado (VI) después de la inoculación hubo una rápida disminución en el número de ufc y se alcanzando niveles similares al control (biorreactor V) luego de 7 días de incubación.

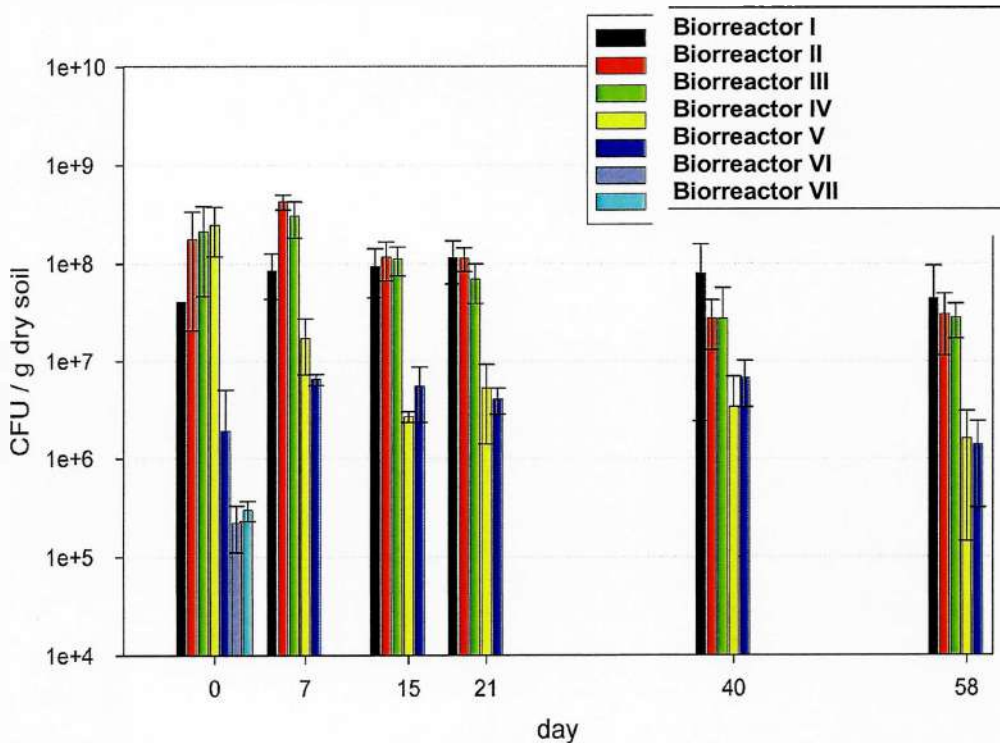


Figura V-3: Evolución del número de bacterias heterótrofas cultivables en R2A-agar en las columnas conteniendo microcosmos de suelo, después de 0, 7, 15, 21, 40 y 58 días de incubación. Los datos representan los valores medios incluyendo las desviaciones estándar de dos medidas por biorreactor. (I: Suelo+Fenantreno; II y III: Suelo+Fenantreno+S. paucimobilis 20006FA); IV: Suelo+S. paucimobilis 20006FA; V: Suelo; VI: Suelo estéril +S .paucimobilis 20006FA; VII: Suelo estéril+Fenantreno+S. paucimobilis 20006FA)

Los biorreactores que contenían suelo estéril (VI y VII), independientemente de la presencia o no del contaminante, mostraron valores de ufc detectables sólo el día de la inoculación (día 0), más tarde el número de bacterias heterótrofas cultivables cayó por debajo del límite de detección del método (100 ufc/g de suelo seco). Esto estaría indicando que la cepa no tiene la capacidad de colonizar suelo estéril aún en presencia de fenantreno.

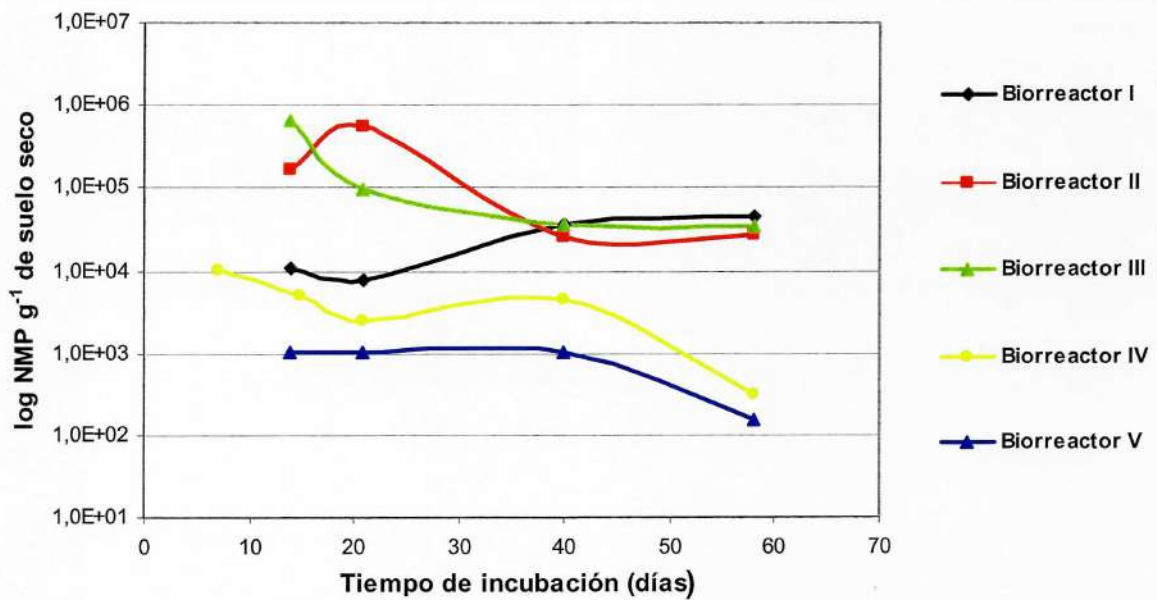


Figura V-4: Evolución del número de bacterias cultivables degradadoras de PAH en las columnas conteniendo microcosmos de suelo, después 7, 15, 21, 40 y 58 días de incubación. (I: Suelo+Fenantreno; II y III: Suelo+Fenantreno+S. paucimobilis 20006FA); IV: Suelo+S. paucimobilis 20006FA; V: Suelo)

La adición de fenantreno al suelo provocó un incremento en la densidad de bacterias degradadoras de PAH en el biorreactor I con respecto al V (control) (fig. V-3).

Adicionalmente en los biorreactores contaminados, la inoculación con *S. paucimobilis* 20006FA (II y III) produjo un incremento mayor de la población degradadora durante los primeros 30 días del tratamiento. Al final del tratamiento, las poblaciones bacterianas degradadoras de PAH en estos dos biorreactores declinaron hasta niveles similares a los del biorreactor contaminado sin inocular (I).

La incorporación de *S. paucimobilis* 20006FA al suelo sin contaminar (biorreactor IV) produjo un ligero aumento de la población de bacterias degradadoras con respecto al suelo control (biorreactor V), esta tendencia se mantuvo a lo largo de todo el período de incubación.

En los biorreactores conteniendo suelo estéril (col. VI, VII y VIII) no fue posible detectar bacterias degradadoras de PAH, esto pudo deberse a que el número de células cultivables cayó por debajo del límite de detección del método (NMP)(100 bacterias/ g de suelo seco).

Se observó que la inoculación con la cepa *S. paucimobilis* 20006FA aceleró la eliminación de fenantreno durante los primeros 20 días de incubación, esto fue acompañado con una alta actividad biológica sostenida desde el comienzo del tratamiento en los biorreactores inoculados y con un mayor número de bacterias heterótrofas cultivables y degradadoras de PAH.

V.B. Estudio de los mecanismos/estrategias de adhesión de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA a la superficie partículas de suelo contaminado con fenantreno en biorreactores

Se tomaron muestras de los biorreactores I, II, III IV y V después de 7 días de incubación para realizar microscopías de epifluorescencia y estudiar la adherencia de las células de *S. paucimobilis* 20006FA a las partículas de suelo durante el proceso de biodegradación de fenantreno.

V.B.1 Hibridización fluorescente in situ (FISH)

La hibridización in situ permite detectar grupos bacterianos específicos dentro de la comunidad total de suelo, por lo que es posible el uso de suelo no estéril.

En este estudio se utilizan los fluorocromos DAPI (azul) y SybrGreen (verde) para la tinción del DNA y las sondas específicas para Eubacterias, EUB338 (marcada con el fluorocromo Cy3 (rojo)) y para el género *Sphingomonas*, SPH-120 (marcada con el fluorocromo Texas red (rojo)).

Como control de la efectividad del protocolo de hibridización en presencia de hidrocarburos se hibridizaron cultivos de *S. paucimobilis* 20006FA en medio R3A (Foto V-2) y MML suplementado con 2000 mg/L de fenantreno (Foto V-3), con la sonda EUB338 y posteriormente se tiñeron con DAPI.

El procedimiento de hibridización fue exitoso ya que alrededor del 100% de las células observadas con la coloración para DNA fueron observadas también con la sonda, aún en presencia de fenantreno, y se obtuvieron datos reproducibles, sin embargo no pudieron observarse células adheridas a los cristales de fenantreno (Fotos V-2 y V-3).

Para la puesta a punto del protocolo de hibridización en suelo se utilizaron cultivos en suspensión en MML de suelo estéril (5% m/v) contaminado con fenantreno. En este caso la

hibridización con EUB338 fue exitosa pero con la tinción DAPI las partículas de suelo no pudieron verse claramente. También fue difícil diferenciar entre células hibridizadas adheridas a las superficies de las partículas de suelo y las partículas mismas. Esto ocurrió porque la autofluorescencia de las partículas de suelo era de la misma longitud de onda que la fluorescencia de las células hibridizadas.

Para ensayar el funcionamiento de la hibridización con la sonda SPH-120, se utilizaron cultivos en suspensión de suelo estéril (5% m/v) contaminado con fenantreno en MML, las células fueron hibridizadas y adicionalmente teñidas con SybrGreen. Los resultados son ilustrados en las Fotos V-4 y V-5. Con ambos fluorocromos se observó una gran cantidad de células (indicadas por las flechas) adheridas a la superficie de las partículas de suelo contaminado (Foto V-4 micrografías 1 y 2). Sin embargo, la señal de fluorescencia de la sonda SPH-120 fue tenue y fue difícil distinguir las células por la autofluorescencia roja a naranja de la partícula de suelo (Foto V-5).

La Foto V-15 muestra células (verde) adheridas en los planos focales superior (a), medio (b) e inferior (c) de una partícula de suelo.

Las muestras obtenidas de los biorreactores de suelo fueron observadas por Microscopía láser confocal (CLSM), con este microscopio es posible detectar la interferencia de las longitudes de onda de modo que las células que hibridizan con la sonda y son teñidas por SybrGreen pueden observarse en color amarillo. Los resultados son ilustrados en las Fotos V-6 a V-9.

En la Foto V-6 se observa la muestra de la columna V (Suelo limpio). Fue difícil distinguir las células hibridizadas de la partícula de suelo por la autofluorescencia roja de la partícula. Se observa poca cantidad de células totales (en verde) adheridas a la superficie de las partículas de suelo. También se observan algunas células hibridizadas con la sonda SPH-120 (señal en rojo), otras adicionalmente son teñidas con SybrGreen (señal amarilla), lo que indicaría la presencia de bacterias del género *Sphingomonas* dentro de la microflora del suelo limpio.

En la Foto V-7, de la Columna I (Suelo + Fenantreno), a pesar de la autofluorescencia roja de la partícula, puede observarse un mayor número de células totales adheridas a las partículas de suelo. También se observan células hibridizadas (amarillas), en menor cantidad que las totales, que corresponderían a bacterias del género *Sphingomonas*.

En la Foto V-8 de la Columna III (Suelo + Fenantreno + *S. paucimobilis* 20000 6FA), se observa gran cantidad de células adheridas a la partícula de suelo (en verde) con predominancia del color amarillo, indicando una mayor proporción de células hibridizadas pertenecientes al género *Sphingomonas*.

En la Foto V-9 de la Columna IV (suelo + cepa), se observa gran cantidad de células amarillas.

A pesar de que la sonda no es específica para la especie inoculada y por lo tanto no podemos determinar si la cepa se estableció en suelo, independientemente de la presencia o no del fenantreno las columnas inoculadas (III y IV) mostraron mayor proporción de células hibridizadas que las no inoculadas (Col. I y V).

V.C. Estudio de los mecanismos de adhesión de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA a la superficie de las partículas de suelo contaminado con fenantreno en medio líquido

Ante las dificultades que se presentaron para poder visualizar la sonda utilizada para la hibridación in situ sobre las partículas de suelo y ante la imposibilidad de establecer a la cepa en suelo estéril, para realizar el análisis de los mecanismos de adhesión a las partículas de suelo de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA el cultivo de microorganismos se realizó en medios líquidos conteniendo suspensiones de suelo estéril (5% m/v) previamente contaminado con fenantreno, que fueron observados por distintas técnicas microscópicas.

V.C.1 Tinción con colorantes fluorescentes

Las células fueron teñidas con el fluorocromo SybrGreen (tinción para DNA), el cual permite una buena distinción entre células y partículas ya que las partículas de suelo dan una señal anaranjada y las bacterias una fluorescencia verde.

- **Microscopía de Epifluorescencia**

La foto V-10 muestra cultivos de 72 h de *S. paucimobilis* 20006FA en MML con el agregado de suelo estéril contaminado con fenantreno.

En la Foto V-10A se puede observar una gran cantidad de células (señal verde) adheridas a la partícula de suelo contaminado.

La adherencia de las bacterias (señal verde) a las partículas de suelo (señal anaranjada a roja) puede ser observada en diferentes planos focales de las muestras, como se muestra en la Foto V-10B, planos focal superior (B1), medio (B2) e inferior (B3) de la partícula.

De estas observaciones se puede concluir que la cepa inoculada se adhiere a las partículas de suelo cuando este se encuentra contaminado con fenantreno.

- **Microscopía láser confocal (CLSM)**

En este ensayo se investigó la producción de estructuras de tipo biofilm sobre partículas de suelo contaminadas con fenantreno por la cepa *S. paucimobilis* 20006FA y se intentó realizar una primera caracterización del biofilm utilizando cinco lectinas fluorescentes con especificidad conocida para glúcidos comúnmente presentes en biofilms de *Sphingomonas*.

Aproximadamente 10 lugares fueron examinados por microscopía de epifluorescencia y un lugar representativo fue seleccionado para obtener la imagen utilizando CLSM.

La Foto V-11 muestra un cultivo *S. paucimobilis* 20006FA en MML adicionado con suelo estéril (5%) sin contaminar, aquí no pudieron observarse bacterias, la señal verde se debe a otros constituyentes del suelo (señal inespecífica).

En la Foto V-12, las micrografías a, b y c muestran cultivos de 5 días de *S. paucimobilis* 20006FA en MML +suelo estéril contaminado con fenantreno. Se observan partículas de suelo con varios agregados celulares adheridos, en la micrografía c se muestra un acercamiento de un agregado. Estos agregados parecen estar formando un biofilm de tipo discontinuo (en parches) que recuerda al biofilm producido sobre los cristales de fenantreno (Foto IV-11, Capítulo IV).

Cuando las muestras del cultivo de 72 h fueron incubadas en presencia de las lectinas no se observó señal fluorescente, no pudiendo detectarse la presencia a tiempos cortos de incubación de residuos glusídicos que se encuentran presentes en los EPS de otras especies de *Sphingomonas*.

V.C.2 Microscopía electrónica de Barrido (SEM)

Se analizaron cultivos de *S. paucimobilis* 20006FA en suspensiones de suelo estéril (5% m/v de suelo) conteniendo fenantreno por SEM, microscopía de alta resolución, para observar alteraciones en la morfología de superficie de contacto entre células y partículas de suelo contaminadas que podrían evidenciar mecanismos de adhesión celular.

La Foto V-13 muestra una microscopía electrónica de barrido de una partícula suelo sin contaminación, donde se observa una superficie rugosa sin células.

Las imágenes obtenidas de los cultivos de *S. paucimobilis* 20006FA en **MML+ suelo estéril 5% (m/v)** a distintos tiempos de incubación se muestran en la Fotos V-14 y V-15. En el cultivo de **2 h** se observan muy pocas células (Foto V-14) y en el de **24h** adicionalmente se observan escasos filamentos uniendo las escasas células a las partículas de suelo (Foto V-15).

Las Fotos V-16 a V-22 muestran microscopías electrónicas de barrido de cultivos de *S. paucimobilis* 20006FA en **MML+ suelo estéril 5% (m/v) adicionado con fenantreno**.

Ya a las **2 h** de cultivo se observan células en división y filamentos que emergen de distintas partes sobre la superficie de las células y ligan a estas con las partículas de suelo (Foto V-16). Luego de **9 h** se observan los mismos filamentos aunque mas abundantes (Foto V-17b), en adición aquí las células están cubiertas con lo que parecen vesículas pequeñas y brillantes (Foto V-17a), lo que podría ser un indicio de la producción de un biosurfactante (Maneerat, 2005).

A las **24 h** sobre las partículas de suelo se observó una densa red de filamentos adhiriendo las células a las partículas, esto fue acompañado con un gran número de células, algunas de las cuales se encontraban en división (Foto V-18). La densa red de filamentos podría estar formada por una sustancia biopolimérica.

Luego de **6 días** continúa observándose una red de filamentos adhiriendo las células a las partículas de suelo (Foto V-19 a,b y c), lo que podría estar mostrando la formación de un biofilm.

Las imágenes de los cultivos de **15 días** (Foto V-20 c) y **19 días** (Foto V-20 a y b) mostraron una masa de células insertas en una matriz de exopolímero que se encuentran rodeando las partículas de suelo, en lo que parecería un biofilm despegado de esas partículas.

En las Fotos V-21 y V-22 también se muestran cultivos de **19 días** donde se observan filamentos que podrían corresponder a un biopolímero adhiriendo las células a las partículas de suelo (Fotos V-21a y b y V-22 a y b). También se observa una especie de masa celular que podría ser un biofilm pegado a las partículas de suelo. Las células parecen estar rodeadas y pegadas entre sí por una sustancia polimérica extracelular, que podría ser un exopolisacárido (Fotos V-21c y V-22c).

Se ha observado claramente en cultivos de suelo contaminado con fenantreno en suspensión que las células de *S. paucimobilis* 20006FA forman una red de filamentos mediante los cuales las células se unen a las partículas de suelo, esta red se hace mas densa al transcurrir el tiempo de incubación (Fotos V-17 y V-18). También se observó que las células se encuentran formando una especie de biofilm, rodeadas de una matriz que podría ser un exopolímero (Fotos V- 20, V-21 y V-22). Estas observaciones también fueron realizadas en cultivos de la cepa en medio líquido creciendo con fenantreno como única fuente de carbono y energía (Cap IV, Fotos IV-15, IV-16 y IV-19).

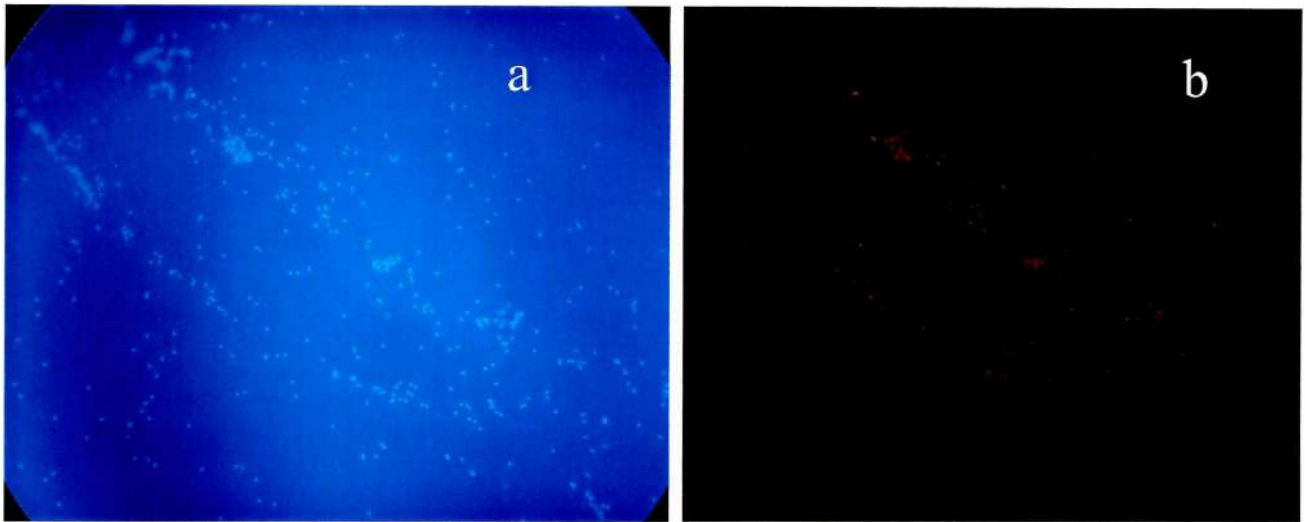


Foto V-2: imágenes de FISH de cultivos de 3 días de *S. paucimobilis* 20006FA en medio R3 obtenidas por microscopía de epifluorescencia. Las células fueron hibridadas con la sonda EUB 338, marcada con CY3 (rojo), específica para eubacterias y teñidas con DAPI (azul)

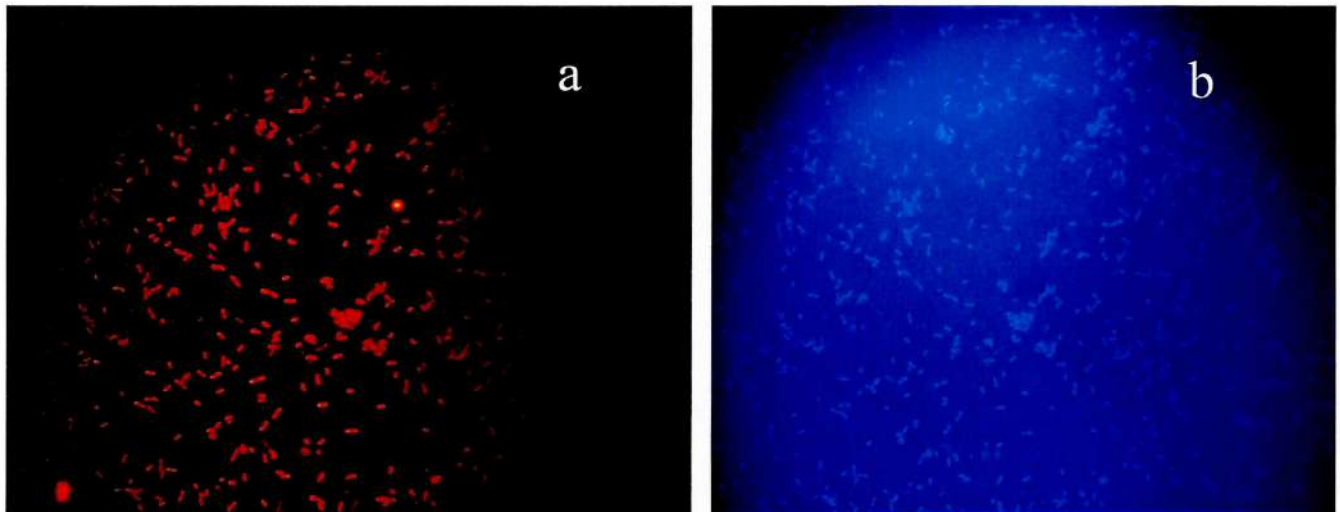


Foto V-3: imágenes de FISH de cultivos de 3 días de *S. paucimobilis* 20006FA en medio MML suplementado con 2000 mg/L de fenantreno obtenidas por microscopía de epifluorescencia. Las células fueron hibridadas con la sonda EUB 338, marcada con CY3 (rojo), específica para eubacterias y teñidas con DAPI (azul)

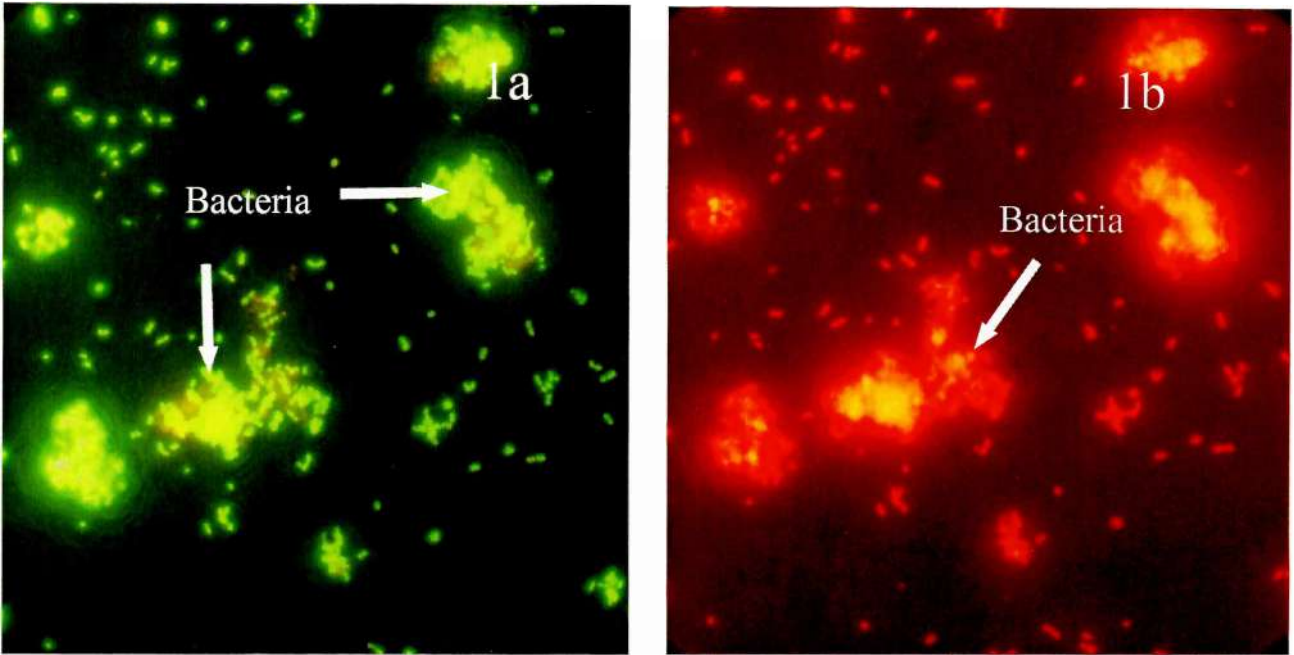
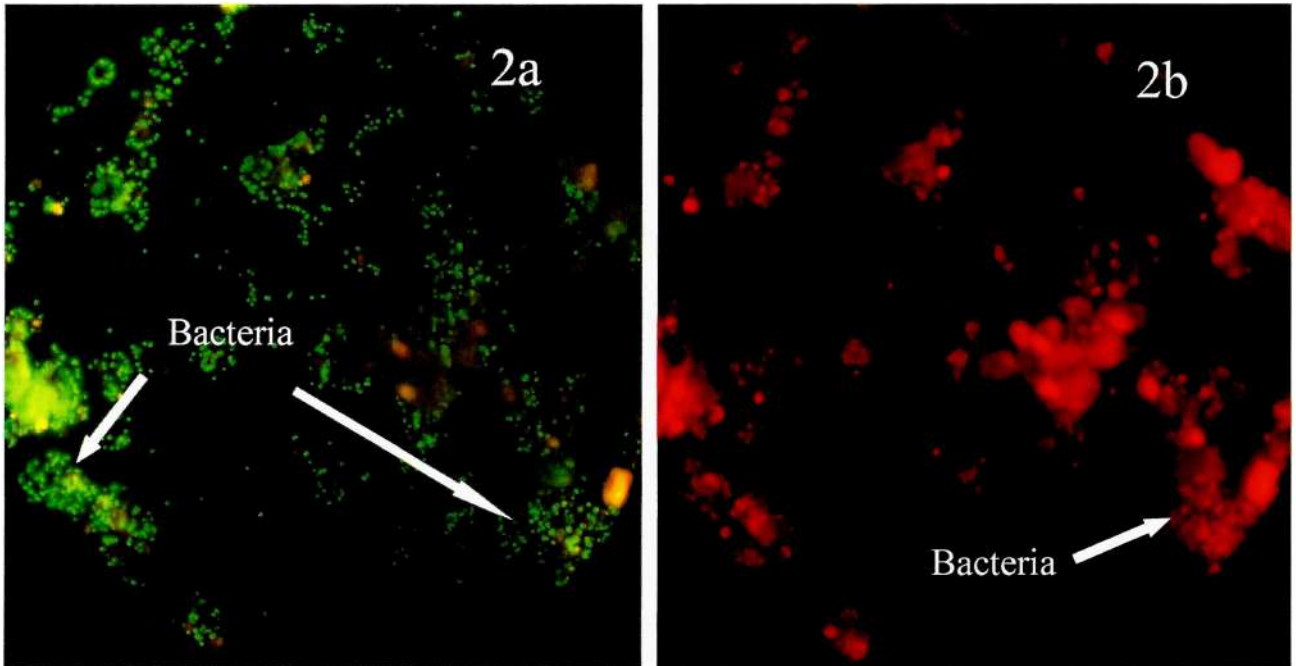


Foto V-4: imágenes de FISH de cultivos de 3 días de *S. paucimobilis* 20006FA en MML con el agregado de suelo estéril (5% m/v) contaminado con fenantreno (2000mg/L) obtenidas por microscopía de epifluorescencia .Las células fueron hibridadas con la sonda SPH-120 , marcada con Texas Red, específica para el género *Sphingomonas* (señal roja) y teñidas con SybrGreen (señal verde)



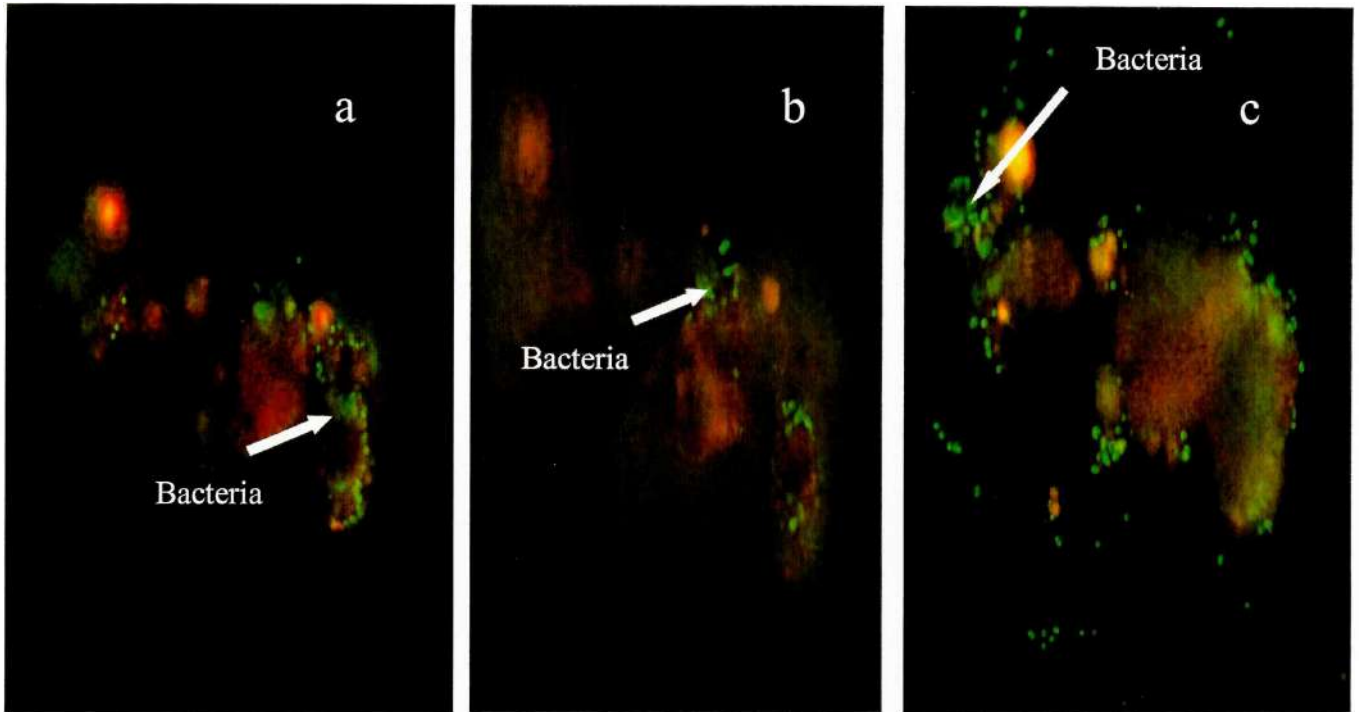
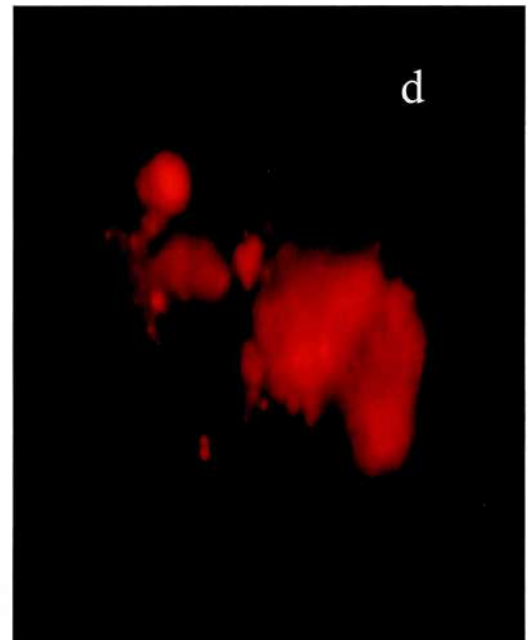
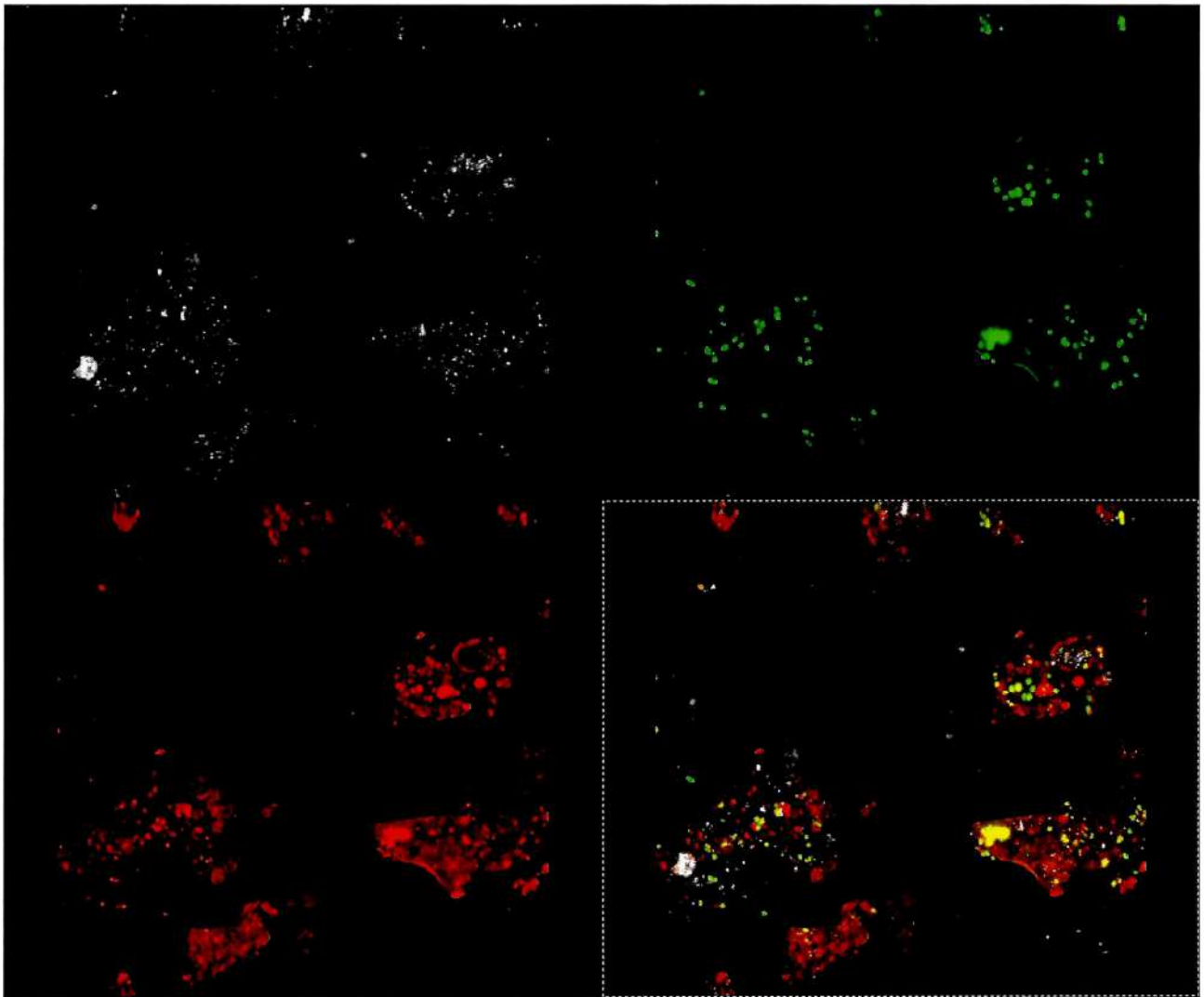
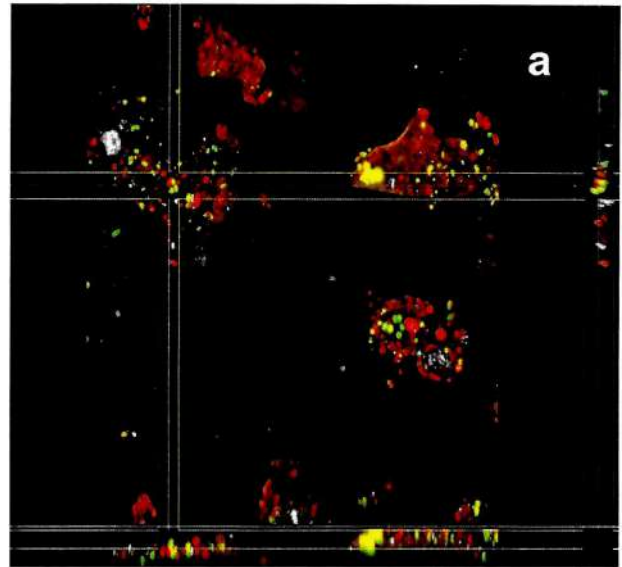


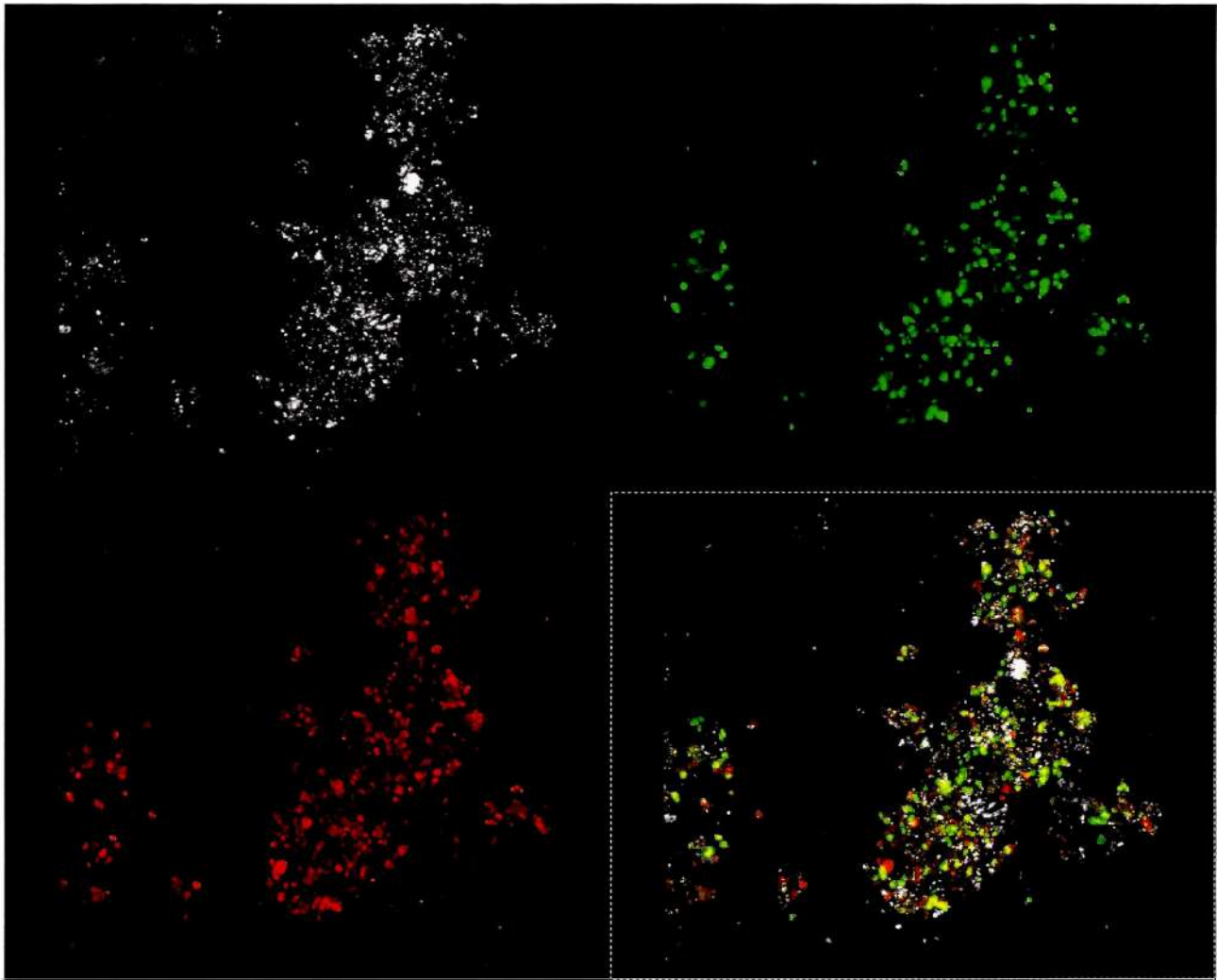
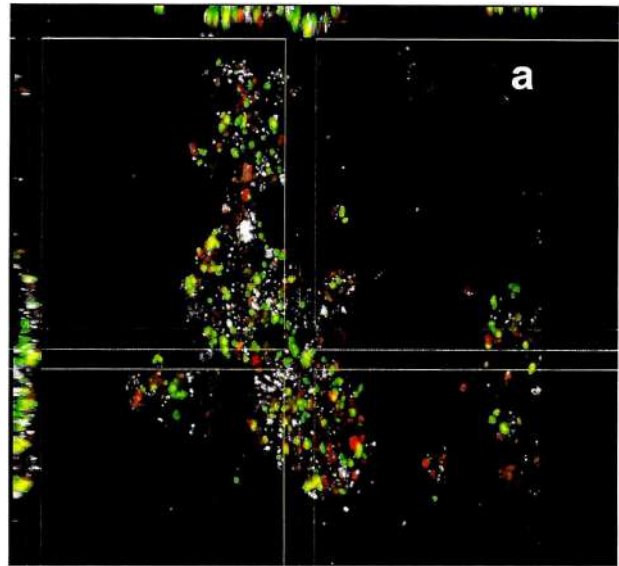
Foto V-5: imágenes de FISH de cultivos de 3 días de *S. paucimobilis* 20006FA en MML con el agregado de suelo estéril (5% m/v) contaminado con fenantreno (2000mg/L) obtenidas por microscopía de epifluorescencia. Las células fueron hibridizadas con la sonda SPH-120 , marcada con Texas Red, específica para el género *Sphingomonas* (señal roja) y teñidas con SybrGreen (señal verde) La presencia de bacterias es indicada por flechas. Las bacterias son mostradas sobre los planos focales superior (a), medio (b) e inferior (c) de la partícula.



**Foto V-6: imágenes de FISH con la sonda, SPH-120, específica para el género *Sphingomonas* (señal roja) y teñidas con SybrGreen (señal verde), obtenidas por microscopía láser confocal, de muestras del Biorreactor V (Suelo) día:7
a) proyección en 3D**



**Foto V-7: imágenes de FISH con la sonda, SPH-120, específica para el género *Sphingomonas* (señal roja) y teñidas con SybrGreen (señal verde), obtenidas por microscopía laser confocal, de muestras del Biorreactor I (Suelo + Fenantreno) día: 7
a) proyección en 3D**



**Foto V-8: imágenes de FISH con la sonda, SPH-120, específica para el género *Sphingomonas* (señal roja) y teñidas con SybrGreen (señal verde), obtenidas por microscopía láser confocal, de muestras del Biorreactor III (Suelo + Fenantreno + *S. paucimoblis* 20000 6FA) día: 7
a) proyección en 3D**

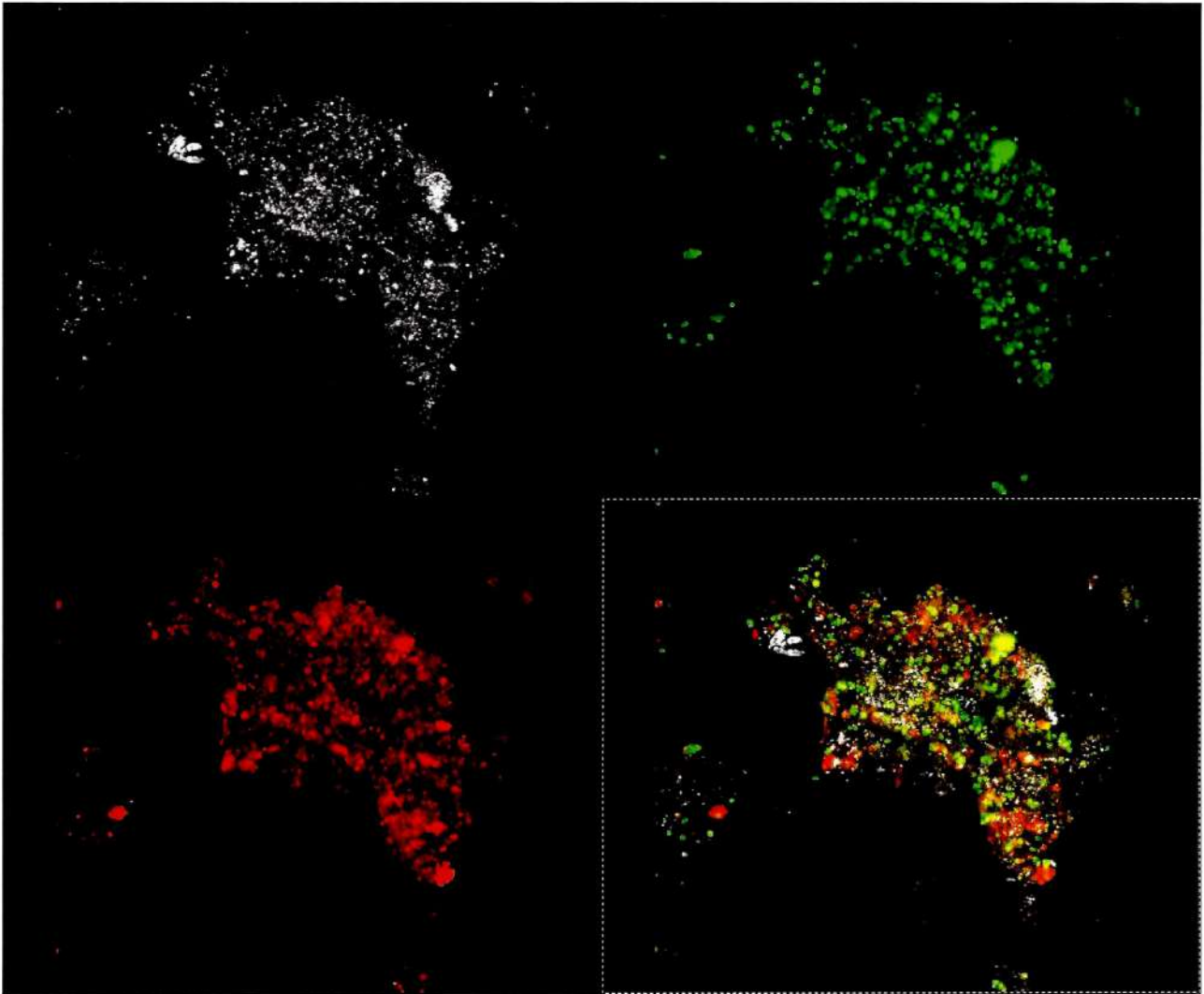
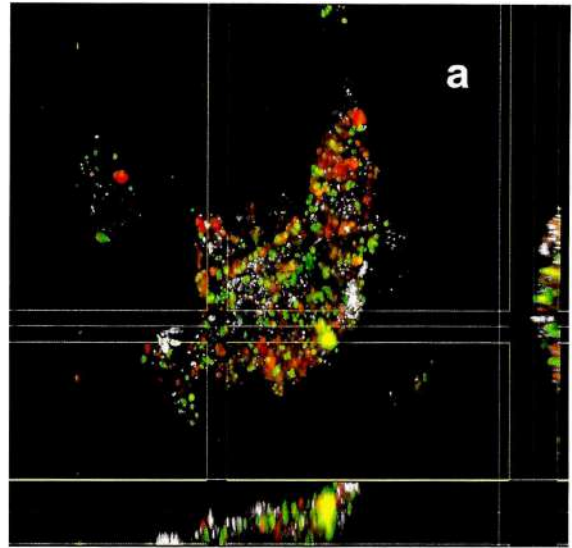
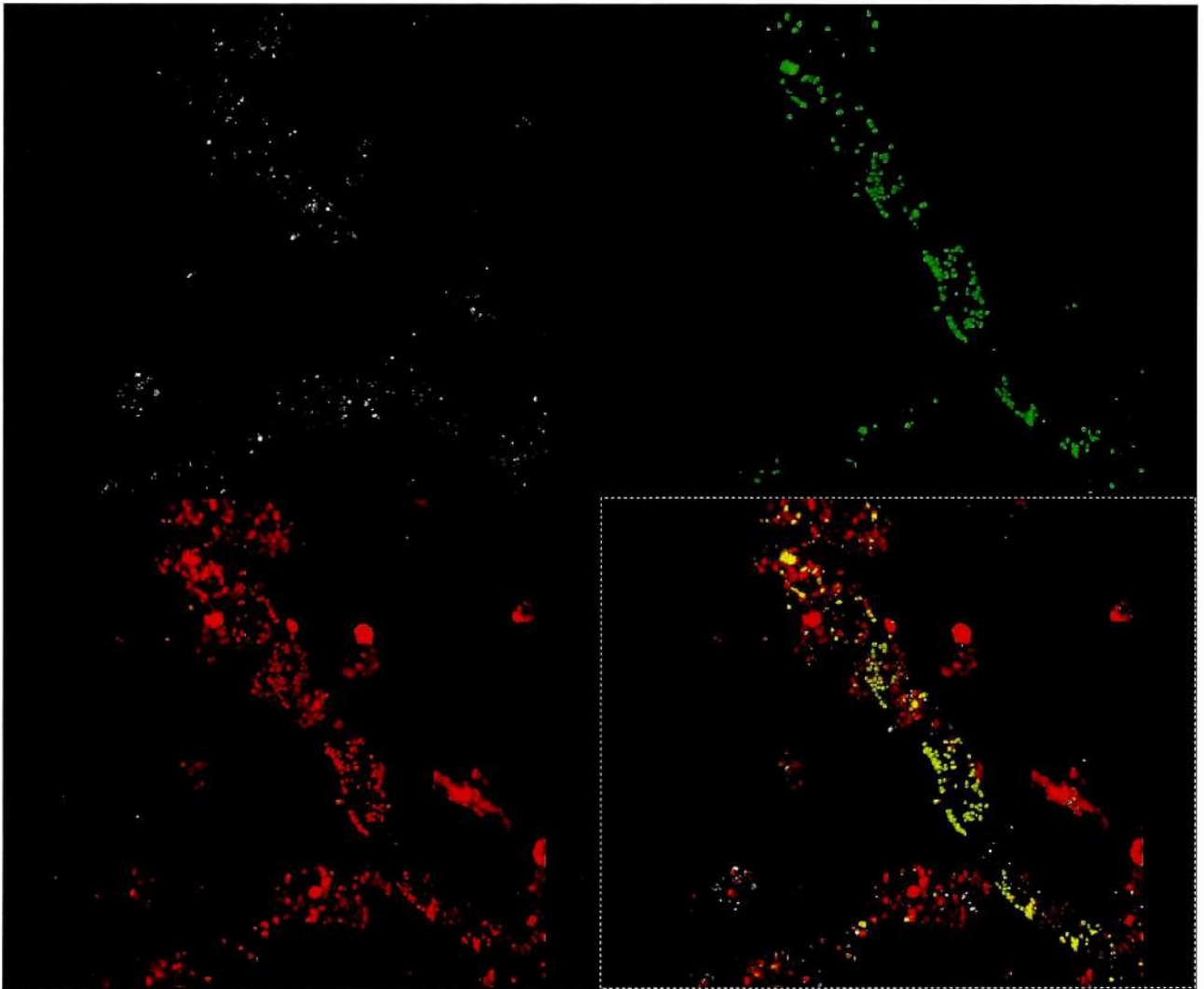
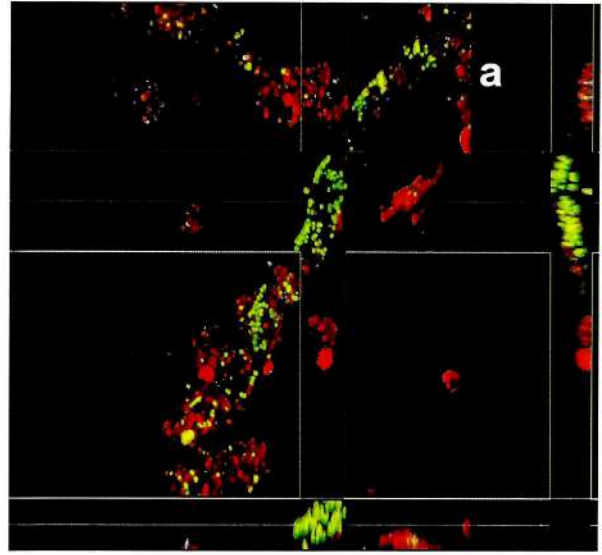
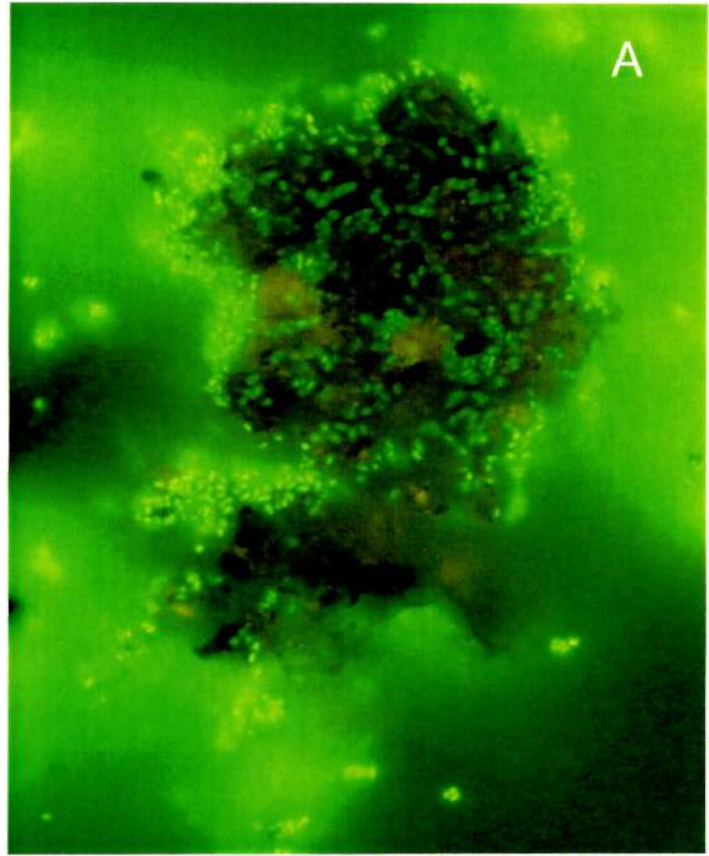


Foto V-9: imágenes de FISH con la sonda, SPH-120, específica para el género *Sphingomonas* (señal roja) y teñidas con SybrGreen (señal verde), obtenidas por microscopía laser confocal, de muestras del Biorreactor IV (suelo + cepa) día : 7
 a) proyección en 3D



Fotos V-10 : Imágenes cultivos de 72 hs de *S.paucimobilis* 20006FA teñidos con SybrGreen obtenidas por microscopía de epifluorescencia. Las células se cultivaron en MML con el agregado de suelo estéril (5% m/v) contaminado con fenantreno (2000 mg/L). En B las bacterias (en verde) son mostradas sobre los planos focales superior (B1) , medio (B2) e inferior (B3) de la partícula (naranja).



Plano focal superior

Plano focal medio

Plano focal inferior

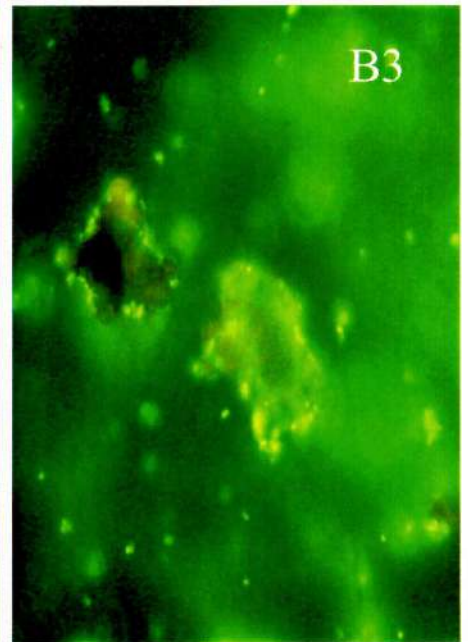
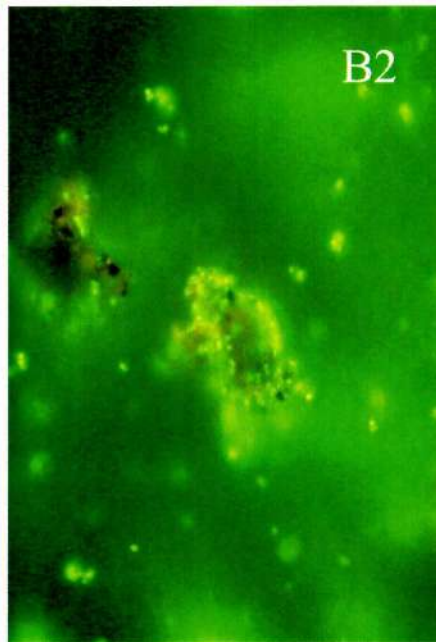
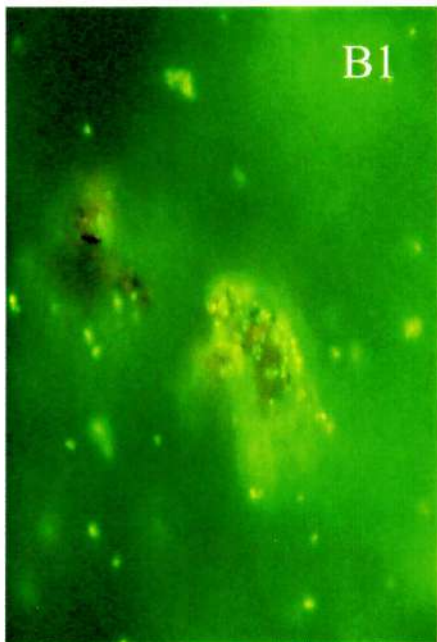


Foto V-11: Imagen de un cultivo de 5 días de *S. paucimobilis* 20006FA teñido con SybrGreen obtenida por microscopía láser confocal. Las células fueron cultivadas en MML adicionado con suelo estéril (5%).

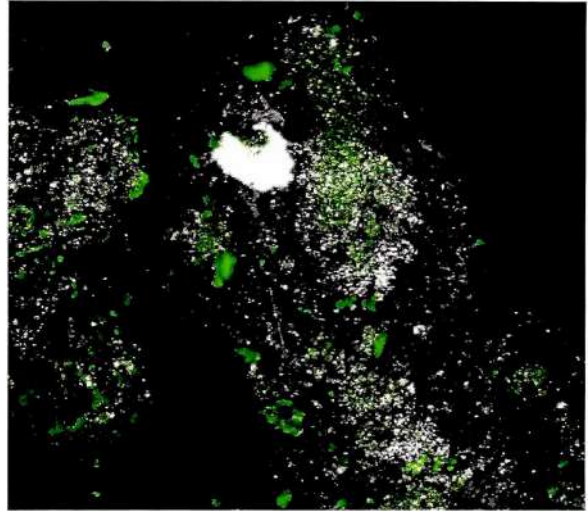


Foto V-12: imágenes de cultivos de 5 días de *S. paucimobilis* 20006FA teñidos con SybrGreen, obtenidas por microscopía láser confocal. Las células fueron cultivadas en MML adicionado con suelo estéril (5% m/v) y 2000 ppm de fenantreno. a: imagen MIP (maximun intensity proyectioin) en 2D. b:Imagen en 3D c:mayor magnificacion

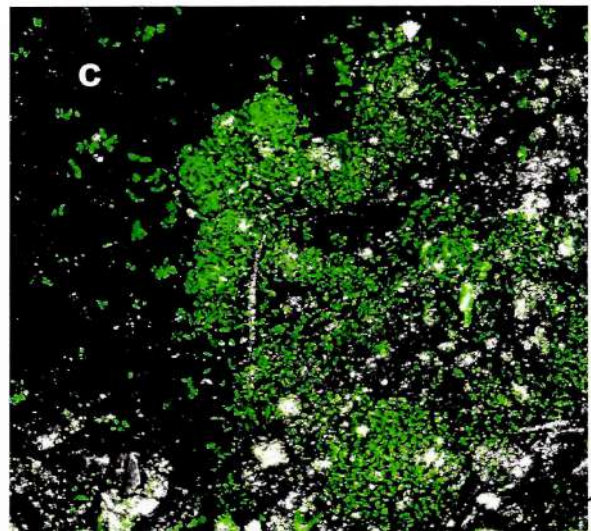
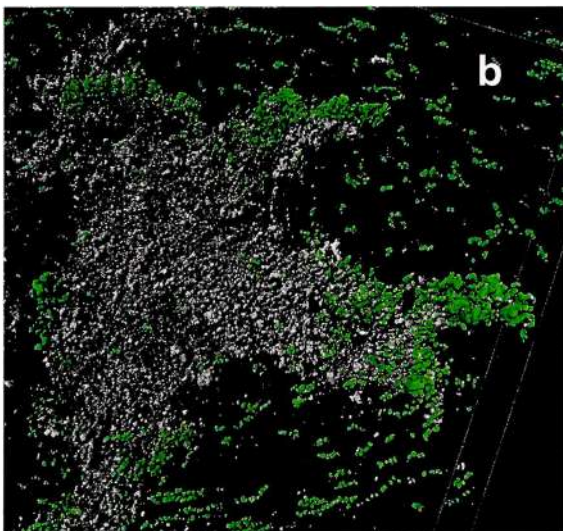
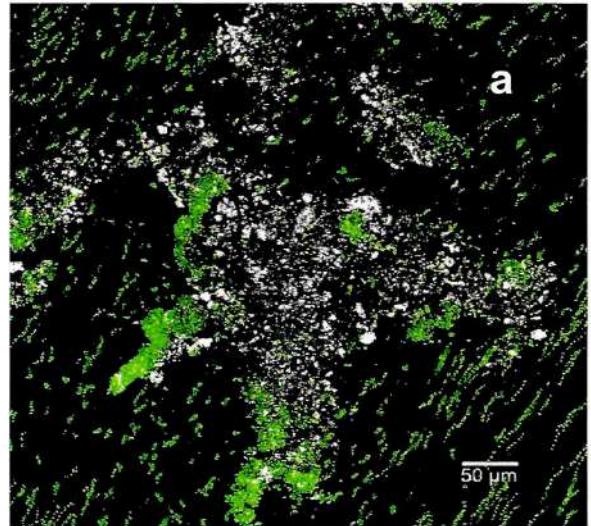


Foto V-13: imagen de una partícula de suelo estéril obtenida por microscopía electrónica de barrido

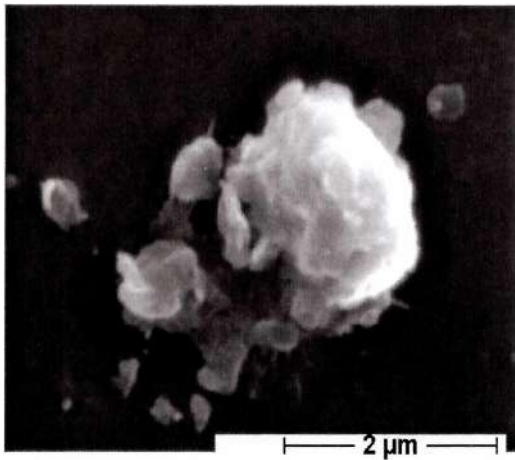


Foto V-14: imagen de un cultivo de 2 h de *S. paucimobilis* 20006FA en MML+ suelo estéril (5% m/v) obtenida por microscopía electrónica de barrido

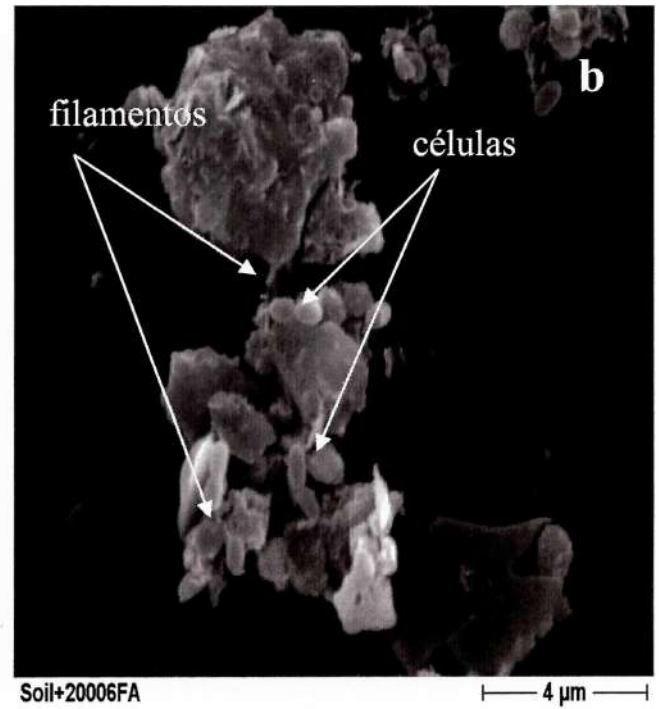
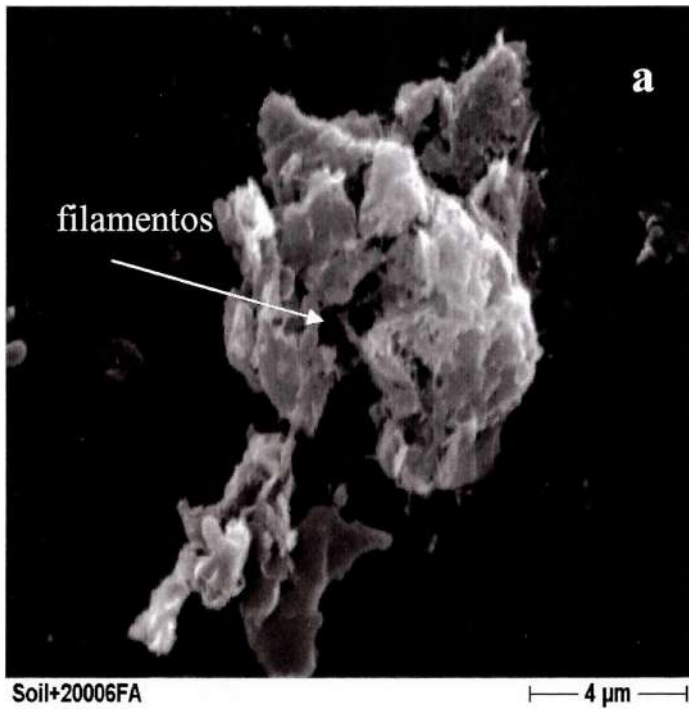
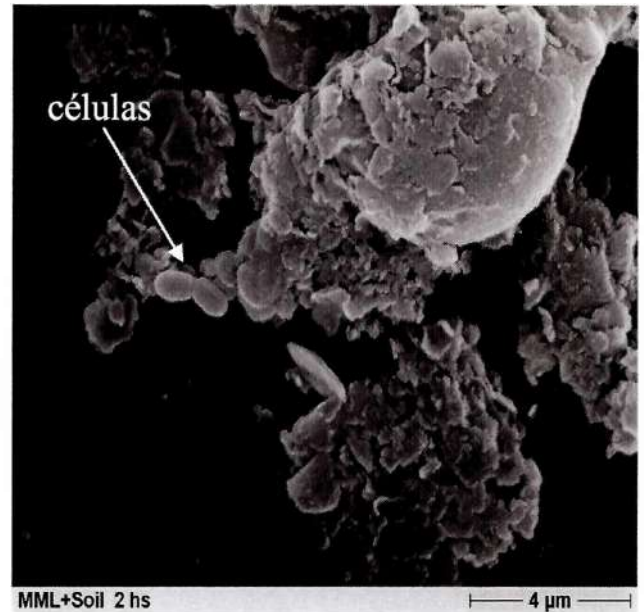


Foto V-15: imágenes de un cultivo de 24 hs de *S. paucimobilis* 20006FA en MML+ suelo estéril (5% m/v) obtenidas por microscopía electrónica de barrido

Foto V-16: imágenes de un cultivo de 2 h de *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA en MML+ suelo estéril (5% m/v) contaminado con fenantreno, obtenidas por microscopía electrónica de barrido

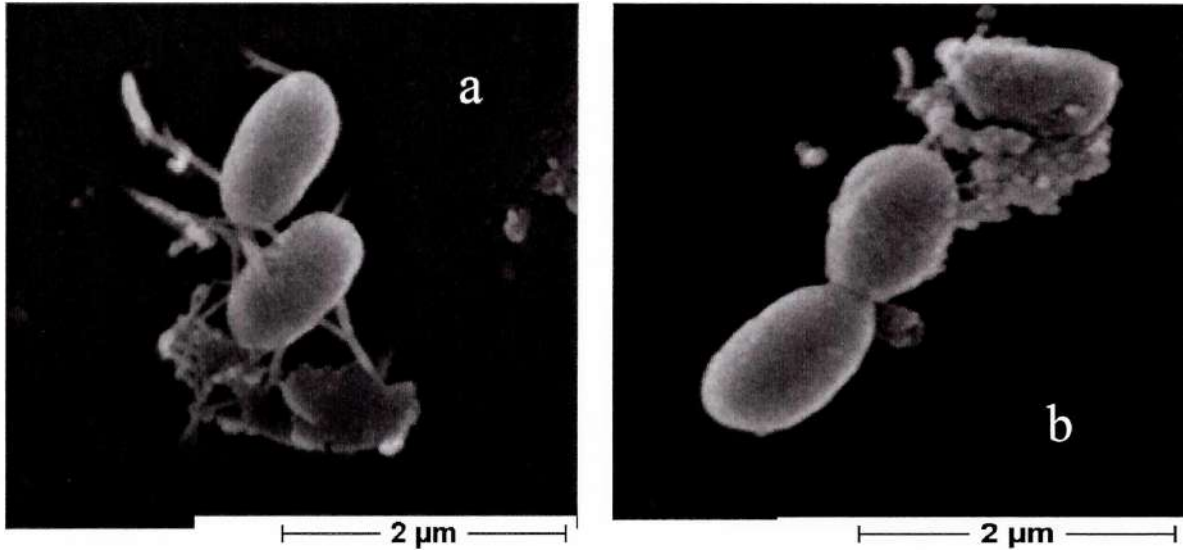


Foto V-17: imágenes de un cultivo de 9 h de *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA en MML+ suelo estéril (5% m/v) contaminado con fenantreno, obtenidas por microscopía electrónica de barrido

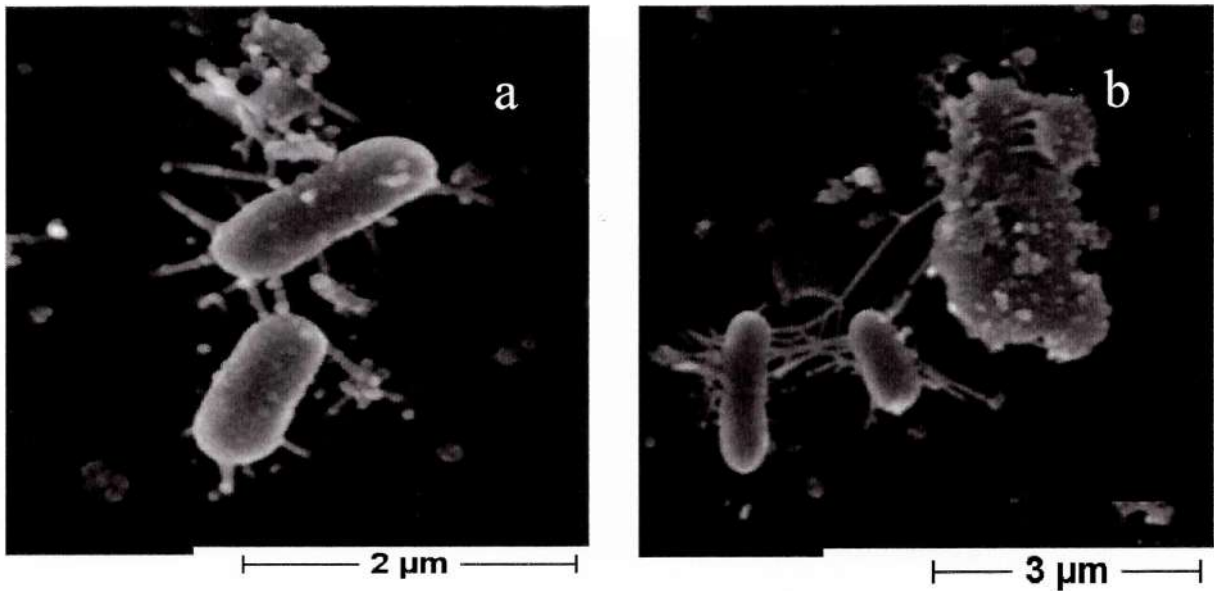
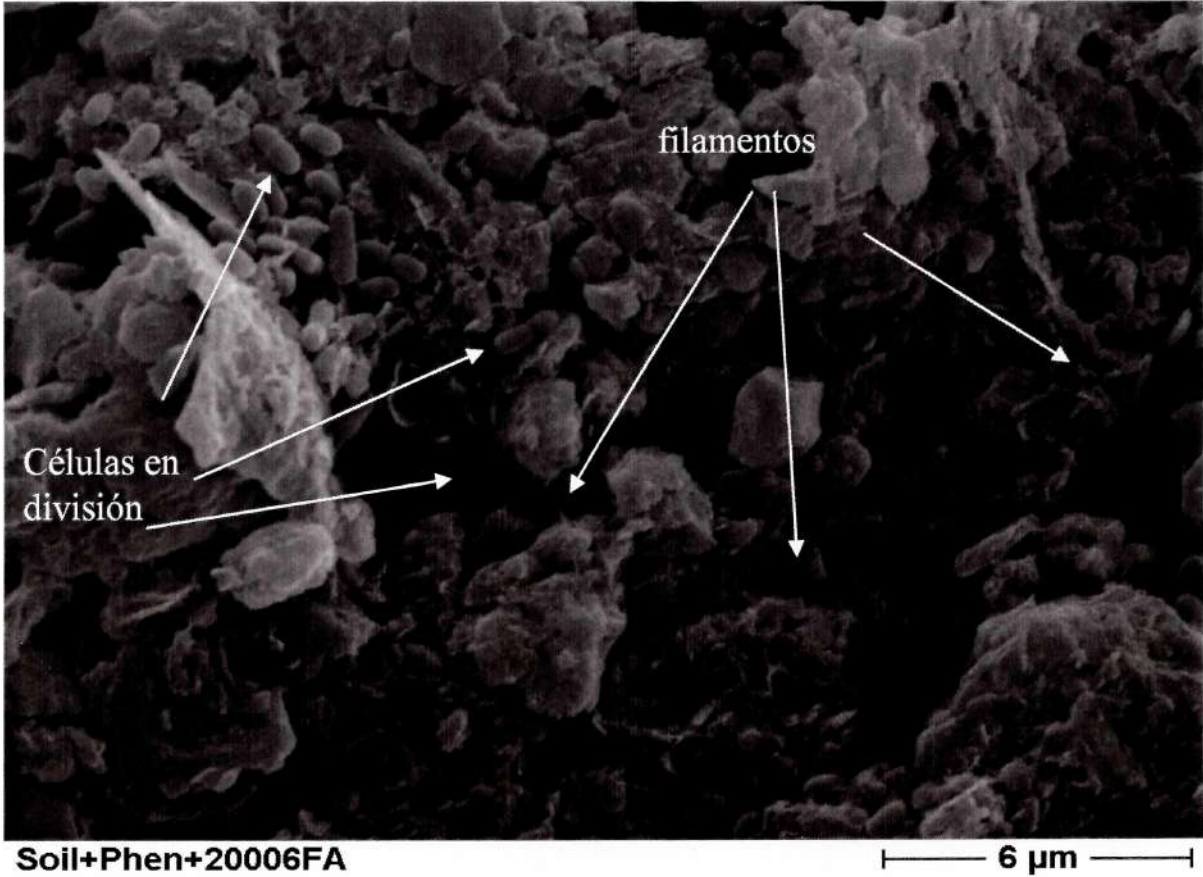
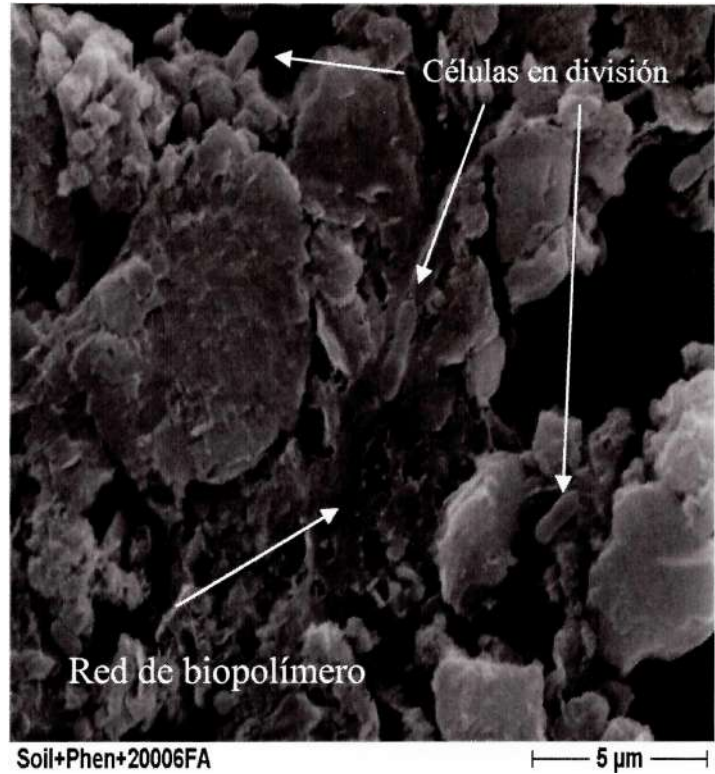


Foto V-18: imágenes de un cultivo de 24 h de *S. paucimobilis* 20006FA en MML+ suelo estéril (5% m/v) contaminado con fenantreno, obtenidas por microscopía electrónica de barrido



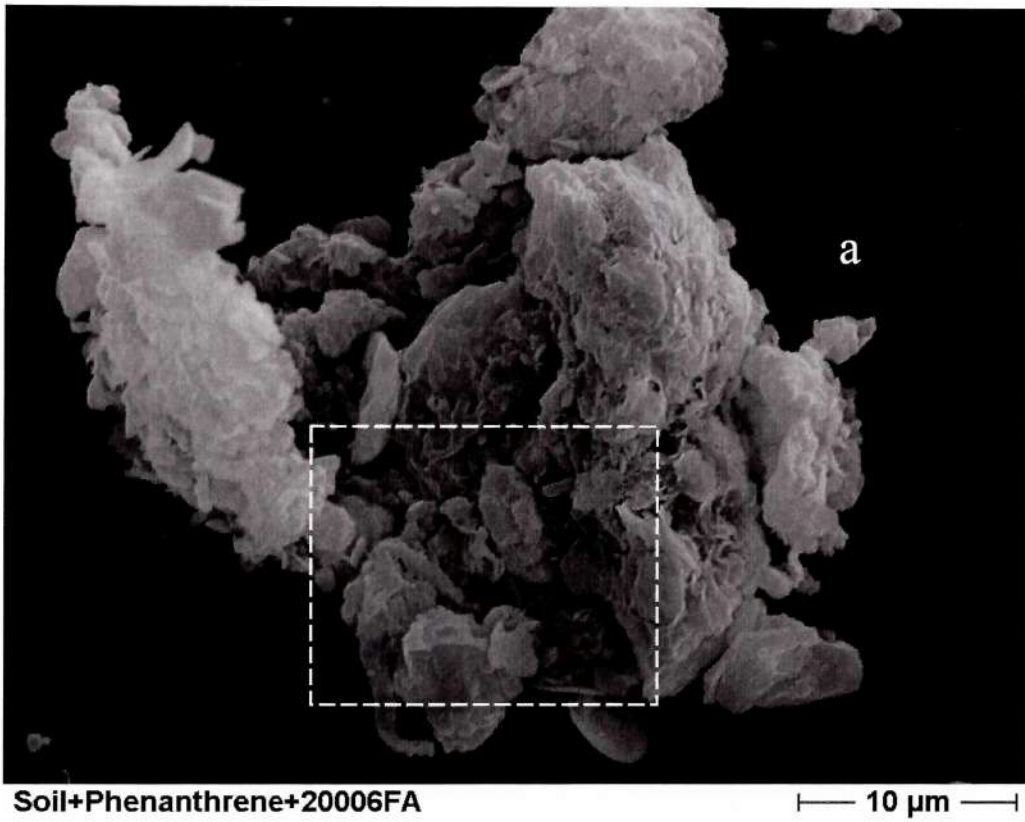


Foto V-19: imágenes de un cultivo de 6 días de *S. paucimobilis* 20006FA en MML+ suelo estéril (5% m/v) contaminado con fenantreno, obtenidas por microscopía electrónica de barrido

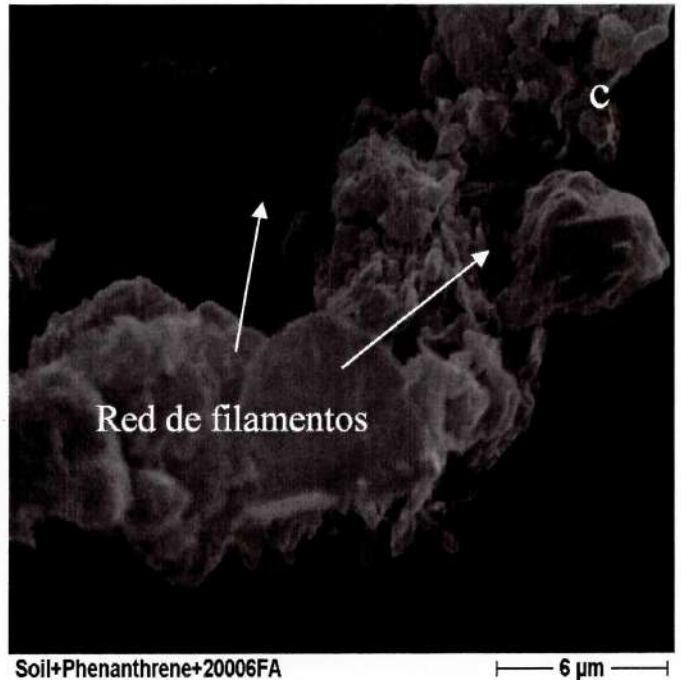
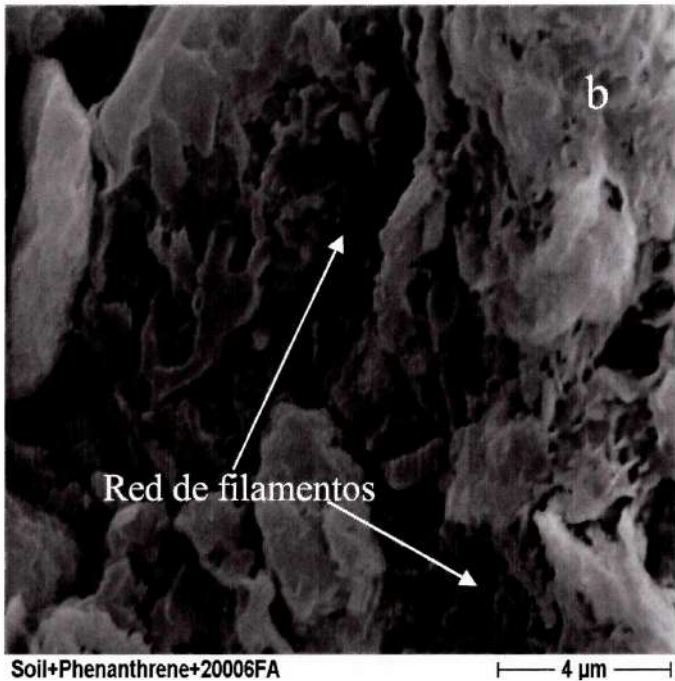
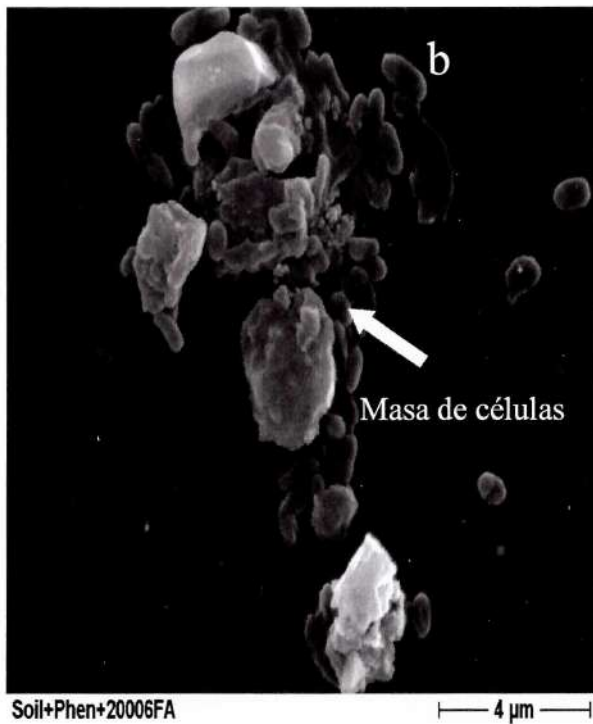


Foto V-20: imágenes de un cultivo de *S. paucimobilis* 20006FA en MML+ suelo estéril (5% m/v) contaminado con fenantreno, día 15 (c) y día 19 (a y b), obtenidas por microscopía electrónica de barrido



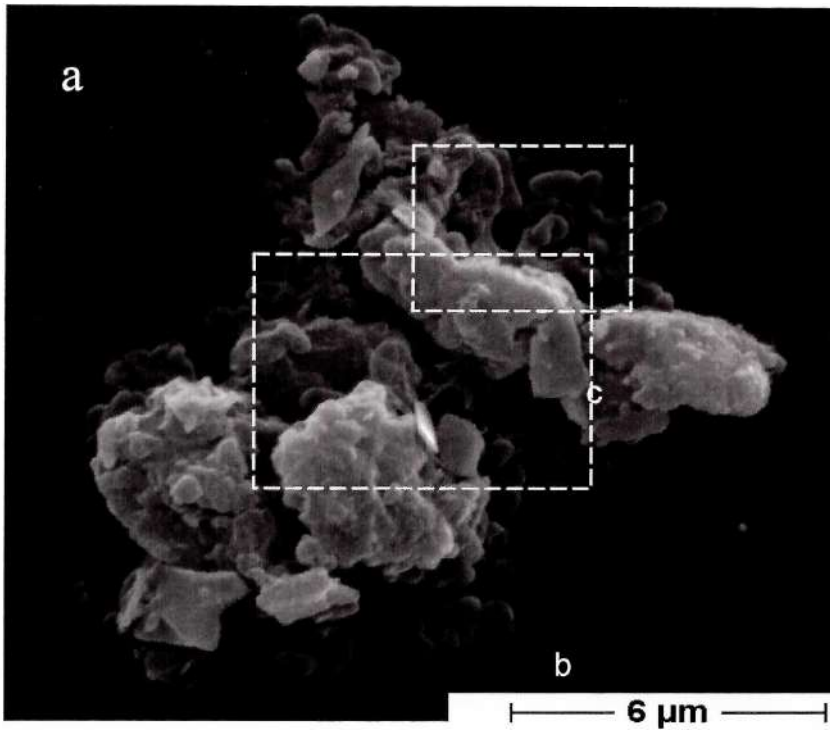
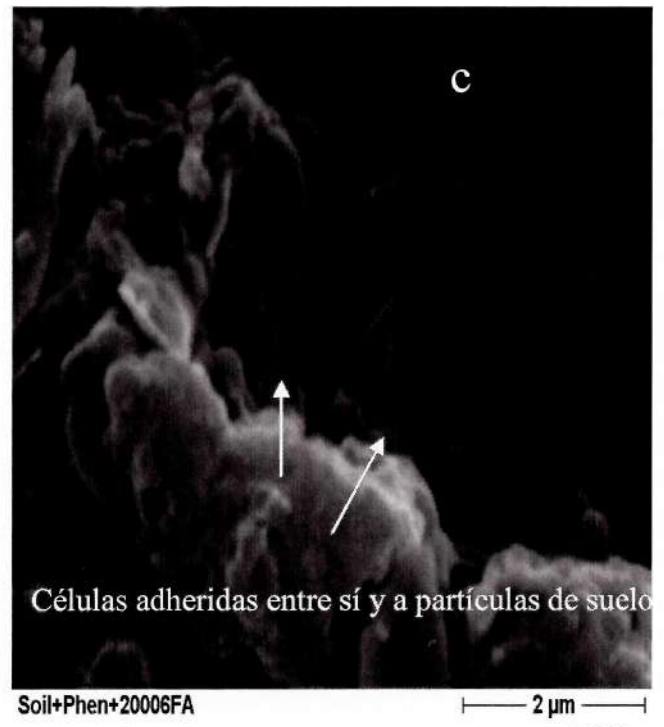
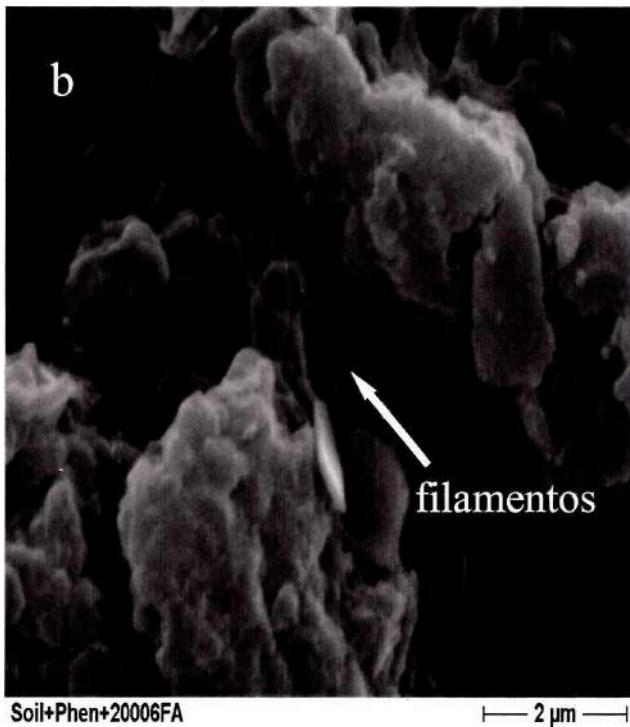


Foto V-21: imágenes de un cultivo de 19 días de *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA en MML+ suelo estéril (5% m/v) contaminado con fenantreno, obtenidas por microscopía electrónica de barrido



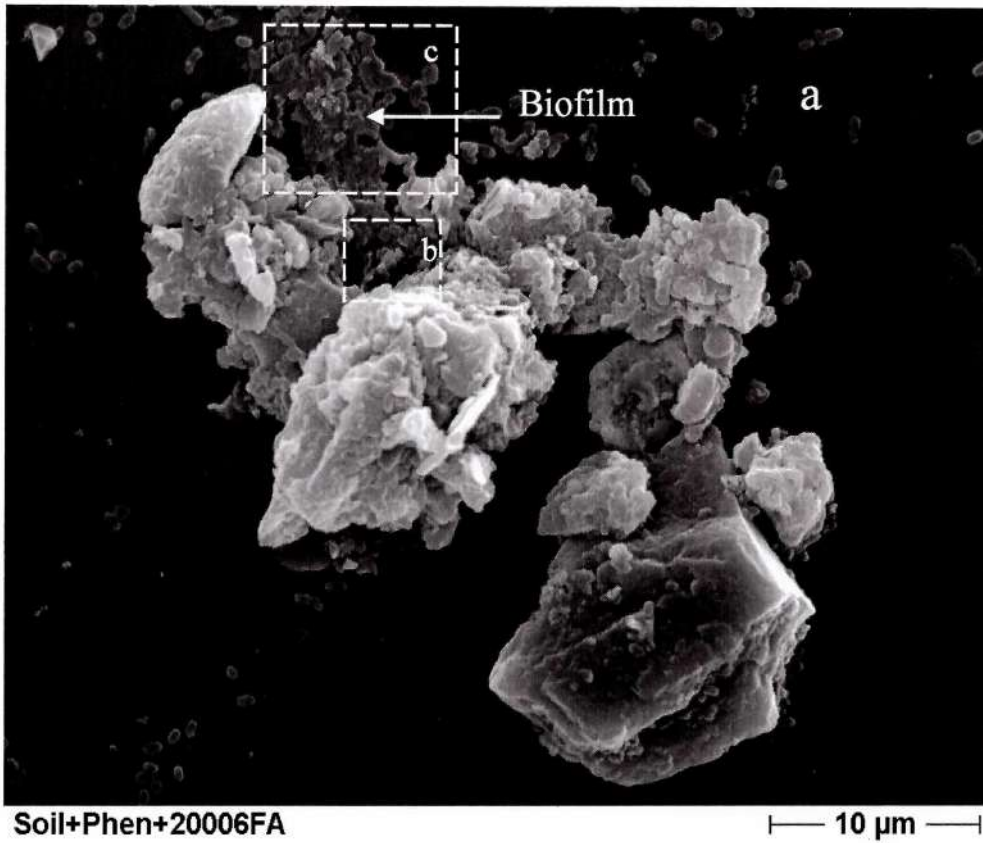
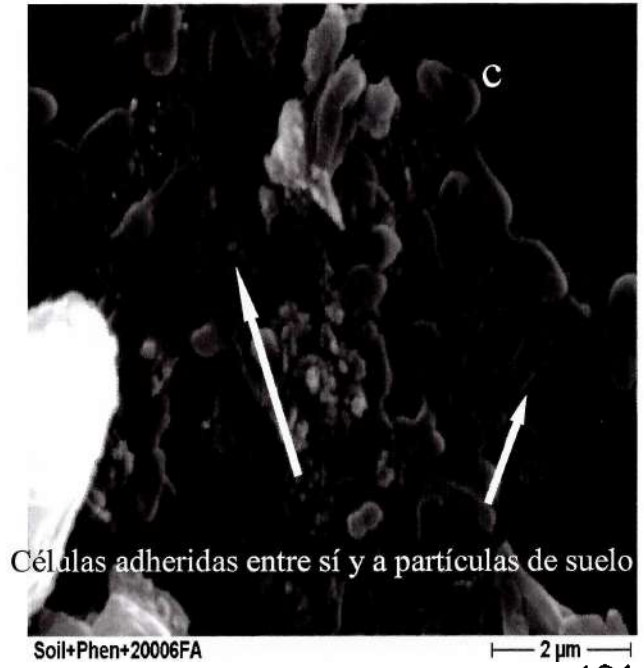
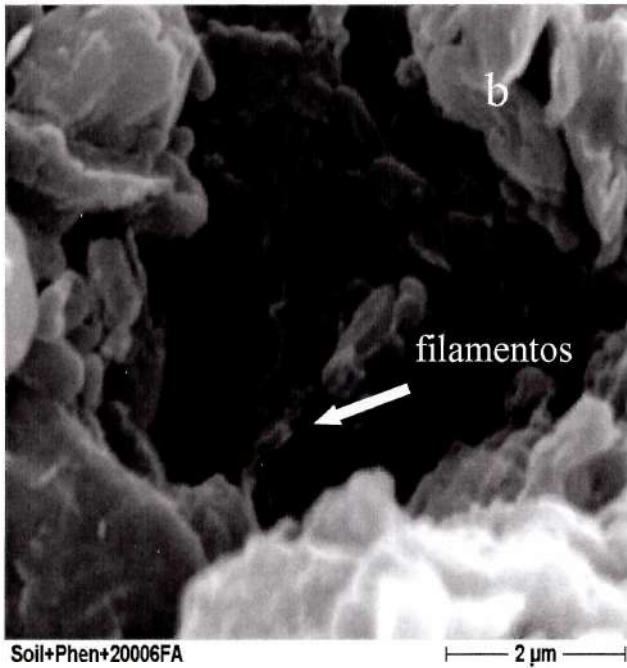


Foto V-22: imágenes de un cultivo de 19 días de *Spingomonas paucimobilis* 20006FA en MML+ suelo estéril (5% m/v) contaminado con fenantreno, obtenidas por microscopía electrónica de barrido



V.D. Discusión

Varios estudios han utilizado biorreactores de suelo en columnas para la biorremediación de suelos contaminados con PAH bajo condiciones aeróbicas (Baptista y col., 2005; Bordas y col., 2005; Kumada y col., 2005; Ohkuma y col., 2006), estos autores han medido el efecto de la variación de un parámetro, como la aireación, sobre la biorremediación de hidrocarburos. En este trabajo se han utilizado una combinación de métodos que han permitido utilizar los biorreactores de suelo para estudiar el efecto de la contaminación con fenantreno y de la inoculación con la cepa *S. paucimobilis* 20006FA sobre la eliminación de contaminante, la actividad biológica y la dinámica de la comunidad del suelo, el establecimiento del inóculo y su localización en suelo.

En el biorreactor contaminado sin inocular (I) la eliminación de fenantreno presentó una fase de latencia que coincidió con la fase de latencia en la producción de CO₂ (Fig. V-2a). Aunque este biorreactor no fue realizado por duplicado esta fase de latencia es típica para la eliminación de hidrocarburos (Del Panno y Morelli 2003), esto podría deberse a que la comunidad presente en el suelo investigado necesitó un tiempo para adaptarse y llevar a cabo la degradación del contaminante. La adaptación de las comunidades microbianas ocurre mediante la inducción de enzimas involucradas en la biodegradación del contaminante y/o mediante un incremento en el número de microorganismos degradadores (Aeolin y col., 1989; Lee y col., 2003).

La estrategia de única inoculación utilizada en este trabajo estimuló la eliminación de fenantreno durante los primeros 20 días del período de incubación (Fig. V-1). El nivel efectivo de densidad y actividad de los microorganismos introducidos en suelo depende de las condiciones ecológicas requeridas para su aplicación. Cuando los microorganismos introducidos están involucrados en un proceso que les da una ventaja (nutricional o espacial) en el suelo, solo es necesario la aplicación de un mínimo número de células activas para que sea efectiva (van Veen y col., 1997).

La inoculación con la cepa *S. paucimobilis* 20006FA produjo un incremento inicial en el número de bacterias heterótrofas cultivables (Fig.V-3) y de bacterias degradadoras de PAH (Fig. V-4). Adicionalmente la cepa utilizada como inoculante posee enzimas dioxigenasas (que inician la degradación de PAH) constitutivas (Cap IV, sección B.2). La inoculación produciría una rápida adaptación de la comunidad microbiana del suelo, observándose una mayor velocidad inicial de eliminación de fenantreno en los biorreactores inoculados (II y III) concordante con un incremento en la producción de CO₂ (Fig. V-2a).

En este estudio se ha realizado la detección y monitoreo de los microorganismos del género del inóculo introducido mediante microscopía de epifluorescencia. La hibridación fluorescente in situ (FISH) con sondas dirigidas contra el rRNA es una técnica que permite el monitoreo de una población metabólicamente activa (Giovannoni et al. 1988, De Long et al, 1989, Amann et al.1990) en un cultivo y ha sido utilizada para *Sphingomonas* por van Herwijnen y col. (2005). Se observó que a los 7 días de tratamiento las muestras de suelo de los biorreactores inoculados mostraban una mayor proporción de células hibridadas con la sonda específica para el género *Sphingomonas* (Fotos V-8 y V-9) que las muestras de suelo contaminado sin inocular.

Después de la eliminación del 90% del fenantreno (día 20) el número de bacterias heterótrofas cultivables (Fig. V-3) y de bacterias degradadoras de PAH (Fig. V-4) en los biorreactores inoculados (II y III), comenzó a disminuir lentamente, al igual que la producción de CO₂. Este comportamiento se observó previamente para *Burkholderia cepacia* en suelos contaminados con ácido 2,5,4 triclorofenoxiacético, el cual la cepa es capaz de degradar. En ese suelo se produjo un rápido crecimiento en la población concomitantemente con la degradación del compuesto, después de lo cual la densidad de la población cayó significativamente (Canway y col., 1990).

En principio, la persistencia y crecimiento de una cepa inoculada en cualquier suelo dependerá de su habilidad para utilizar recursos locales y también puede requerir desplazamiento de un componente de la comunidad indígena. Por lo tanto es crítico entender no solo la fisiología del inóculo, sino también como este afecta la estructura de la comunidad microbiana en el ambiente de suelo en el que esta siendo introducida. En la práctica, un inóculo capaz de degradar un contaminante particular sobrevive bien cuando este contaminante está presente, pero no es capaz de persistir en su ausencia. Este es claramente el caso de *Sphingomonas yanokuyae* B1, el cual sobrevive en compost contaminado con PAH, pero desaparece por debajo de los límites de detección a los 10 días en ausencia de PAH (Cunliffe y col. 2006).

Este resultado no es específico para ambientes contaminados con PAH. La sobrevivencia de *Sphingomonas chlorophenolica* RA2 degradadora de pentaclorofenol (PCP) era buena en suelos contaminados con PCP, mostrando diferentes respuestas microbianas dependientes de la cantidad de PCP utilizado en el microcosmo. En ausencia de PCP la cepa disminuía hasta debajo de los límites de detección utilizando un ensayo basado en la respiración y el método del NMP (Colores y Schmidt, 1999). Como esta, la *Pseudomonas putida* D8 degradadora de tolueno fue capaz de colonizar exitosamente un microcosmo de suelo conteniendo tolueno, pero desapareció dentro de las 24 hs de inoculación en ausencia del contaminante, esto fue medido por recuento en placa (Chao y Hsu, 2004).

En el biorreactor IV (Suelo+S. *paucimobilis* 20006FA), se observó una marcada disminución en los recuentos de bacterias heterótrofas (Fig. V-3) que luego de 15 días de incubación alcanzó los valores del biorreactor V (suelo control). Si cuando esta cepa es inoculada en suelo no contaminado todos los nichos están ya ocupados por las bacterias nativas, la cepa inoculada será incapaz de competir y por lo tanto no invadirá la comunidad. Por el contrario, cuando el suelo es adicionado con fenantreno el nicho de degradadores de PAH se establece de novo en la comunidad, permitiendo la directa competencia para tomar el lugar. Como resultado la cepa inoculada puede invadir la comunidad del suelo contaminado y aun reducir la actividad de los degradadores de PAH nativos (Cunliffe y col., 2006). A pesar de esto no podemos asegurar que la cepa *S. paucimobilis* 20006FA no puede colonizar suelo no contaminado con fenantreno ya que los recuentos de bacterias degradadoras de PAH (Fig. V-4) se mantienen superiores a los del suelo control a lo largo de todo el tratamiento y las fotos correspondientes al día 7 del biorreactor IV muestran una mayor proporción de células hibridizadas con la sonda SPH-120 (Foto V-9).

El Fantroussi y Agathos (2005) sostiene que el suelo estéril es un ambiente favorable para el establecimiento de una cepa porque no se encuentran presentes los factores bióticos que juegan contra el bioaumentación. Otros autores han demostrado que existen inoculantes que crecen y mantienen sus densidades al menos durante 70 días en sedimentos autoclavados, indicando que las cepas no son afectadas negativamente por factores abióticos (Rhaman y col., 2003; Blumenroth y col., 1997). Sin embargo se ha observado que la cepa en estudio no se detecta en suelo estéril inoculado (Biorreactores VI, VII y VIII), por lo que no tendría la capacidad de comportarse como un microorganismo pionero en suelo, independientemente de la presencia de fenantreno (en la concentración utilizada en este experimento). Podría también ocurrir que la cepa sea inhibida por algún/os componentes celulares de la flora indígena del suelo que podrían haber sido liberados durante el proceso de autoclavado. Por todo esto, las consideraciones de El Fantroussi y Agathos no podrían ser aplicables a todos los microorganismos.

Sin embargo al monitorear la distribución espacial de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA creciendo en MML + suelo estéril contaminado con fenantreno se determinó que la cepa sí es capaz de crecer y adherirse (Fotos V-18 y V-16), en estas condiciones, ya que se pudo observar gran cantidad de células adheridas a las partículas del suelo (planos focales inferior, medio y superior de la misma partícula) (Fotos V-10 A y B). En adición el estudio realizado mediante la técnica de FISH reveló una gran cantidad de células tanto adheridas a la superficie de las partículas de suelo como en el seno del líquido (Foto V-4 micrografías 1 y 2) lo que indica que las células se encontraban metabólicamente activas tanto en suspensión como adheridas a las partículas de suelo.

La naturaleza de los biofilms observados en medios porosos como el suelo, va desde las formaciones de tipo parche (microcolonias) a biofilms continuos, dependiendo de los rangos de carga de sustrato. Los biofilms continuos fueron encontrados como resultado de alta carga de sustratos, mientras que los biofilms discontinuos resultan de baja carga de sustratos (Rittman, 1993). Cuando se estudió la formación de biofilms por la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA en cultivos en suspensión de suelo estéril contaminado utilizando CSLM (foto V-12) se observaron partículas de suelo con agregados celulares, formando un tipo de biofilm discontinuo según ha sido descrito por Vandevivere y col. (1992) al igual que el observado sobre los cristales de fenantreno (Capítulo IV Foto IV-11). Por otra parte no se observó la formación de biofilm en suelo no contaminado.

Algunos investigadores sostienen que los microorganismos forman biofilms continuos sobre la superficie externa de los gránulos de suelo (Taylor y Jaffe, 1990). Otros sugieren que no se forman biofilms continuos, pero se desarrollan agregados bacterianos en los espacios entre las partículas de suelo (Vandevivere y Baveye, 1992a,b). En un estudio de una cepa de *Arthrobacter* sp. se identificaron grandes agregados bacterianos que se acumulaban y tapaban los espacios intra poro. Este hallazgo se basó en observaciones por microscopía de campo claro y microscopía de barrido electrónico. La cubierta de los gránulos de suelo era heterogénea y esparcida, con un muy limitado contenido de exopolímero (Ebihara y Bishop, 1999).

Se encontró que la cepa *S. paucimobilis* 20006FA es capaz de producir una sustancia extracelular en MML+ suelo (5%) contaminado con fenantreno 2000 mg/kg desde el primer día de incubación, la cual se ha observado en forma de finos filamentos en las Fotos V-16, V-17 y V-18. A tiempos cortos (2 y 9 hs) en los cultivos ya se observa la formación visible de productos extracelulares (Fotos V-16 y V-17), mientras que a tiempos mas largos (cultivos de 6 días) se observan células agregadas sobre las partículas de suelo y parecen estar formando una red de una sustancia polimérica extracelular que las liga a esas partículas (Fotos V-19). Se cree que esta sustancia extracelular dará lugar a la formación de un biofilm. Beech y col. (1999) observaron redes de filamentos similares en biofilms formados por bacterias sulfato-reductoras sobre la superficie de una lámina de acero.

En los sistemas de suelo contaminado con fenantreno en suspensión, la masa de células unidas a las partículas de suelo mediante una sustancia de textura presumiblemente viscosa observada en los cultivos de 15 días (Foto V-20c) podría ser un polisacárido o una lipoproteína. Se presumía que esta sustancia podría contener un grupo de residuos glucídicos característicos, pero el análisis preliminar utilizando lectinas indicó que los azúcares típicos de EPS de *Sphingomonas* descritos por Johnsen y col. (2000) no estaban presentes. La ausencia de estos azúcares pudo deberse a que los cultivos analizados con lectinas eran muy jóvenes (5 días). Aunque Venugolapan (2005) sugiere que en los biofilms producidos por

Sphingomonas sp., degradadora de PAH, se registra un importante aumento en la producción de EPS luego de 96 hs de incubación en un medio conteniendo glucosa como fuente de carbono, en este trabajo, en las observaciones por SEM de los cultivos en fenantreno se ha encontrado una masa viscosa que se podría corresponder con EPS acompañando la formación de un biofilm recién después de 19 días de incubación (Fotos V-21 y V-22). La glucosa favorecería la más rápida producción de EPS por lo que a diferencia en el tiempo de producción de EPS podría estar relacionado con la fuente de carbono utilizada en los dos experimentos.

La combinación de los métodos utilizados en este capítulo permitió encontrar evidencias del predominio del género *Sphingomonas* en los biorreactores de suelo inoculados. Adicionalmente se observó que la estrategia de inoculación estimuló la eliminación de fenantreno durante los primeros días del período de incubación y esto se produjo junto con el incremento en la actividad biológica y en el número de bacterias heterótrofas cultivables y de bacterias degradadoras de PAH.

Adicionalmente, en los sistemas de suelo contaminado en suspensión, se ha podido establecer que la cepa se encuentra metabolitamente activa y es capaz de adherirse y formar biofilms sobre partículas de suelo estéril contaminado con fenantreno.

A grayscale micrograph showing a dense population of soil microorganisms. The organisms are mostly rod-shaped, with some appearing as thin, filamentous structures and others as thicker, more rounded forms. The background is a complex, textured network of these microbial cells.

CAPITULO VI

RESULTADOS Y DISCUSION

Efectos del inoculante *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA sobre la comunidad microbiana de suelo y sobre la biodegradación en suelos contaminados con PAH

VI. Efectos del inoculante *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA sobre la comunidad microbiana de suelo y sobre la biodegradación en suelos contaminados con PAH

El bioaumentación exitosa requiere no solo un inóculo catabólicamente activo sino también una cepa microbiana o consorcio que pueda sobrevivir bien en el ambiente blanco (Singer et al. 2005).

Los cambios en la composición de la comunidad microbiana durante el bioaumentación pueden desestabilizar la integridad funcional del suelo (Lynch y col., 2004). El conocimiento sobre los cambios que tienen lugar en las comunidades microbianas durante el proceso de biorremediación es limitado y es difícil clarificar la contribución microbiana a tal proceso como también establecer el impacto del proceso de biorremediación sobre el ecosistema de suelo (Iwamoto y Nasu, 2001).

Teniendo en cuenta que muchos parámetros pueden afectar la estructura de las comunidades de suelo en ensayos de campo, tales como variaciones estacionales, humedad y concentración de nutrientes, se acepta que condiciones mejor controladas para establecer el impacto de la contaminación sobre las comunidades microbianas se establecen en los microcosmos de suelo.

Casi todos los estudios a escala de laboratorio que se realizaron hasta ahora, han encontrado que la contaminación con PAH produce enormes efectos sobre la estructura de la comunidad. (Morelli y col., 1999; Del Panno y col., 2005; Gentry y col., 2003; Viñas y col., 2005).

Se realizaron estudios de bioaumentación en microcosmos de suelo abiertos que fueron analizados por períodos de tiempo prolongado.

VI.A. Efecto del bioaumentación sobre la degradación de PAH y la comunidad microbiana de suelos contaminados con fenantreno

Se prepararon cuatro microcosmos: (i) suelo contaminado con fenantreno (F2000); (ii) suelo contaminado con fenantreno e inoculado con *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA (F2000+I); (iii) suelo limpio (Control), (iv) suelo contaminado con fenantreno y adicionado con HgCl_2 (Control abiótico).

El proceso de biorremediación fue monitoreado durante 170 días. Durante este tiempo se analizó el efecto de las inoculaciones sucesivas y se estudió la cinética de eliminación del contaminante y su relación con la dinámica y actividad biológica de la comunidad microbiana del suelo, así como los cambios en la estructura de esa comunidad.

VI.A.1 Efecto de la inoculación sobre la biodegradación del contaminante

La concentración de fenantreno durante el tratamiento en ambos microcosmos se determinó por cromatografía gaseosa, los resultados se muestran en la Fig.VI-1.

Después de 100 días de tratamiento, ambos microcosmos mostraron una eliminación significativa de fenantreno, alcanzando concentraciones residuales por debajo de los estándares de limpieza para suelos (50 mg kg^{-1}), según la ley Argentina 24051 (Poder Ejecutivo Nacional,1992), lo cual corresponde a una eliminación de alrededor de 98% del fenantreno suplementado inicialmente. El microcosmo correspondiente al control abiótico mostró una eliminación del 12% indicando que el fenantreno es removido principalmente por degradación microbiana.

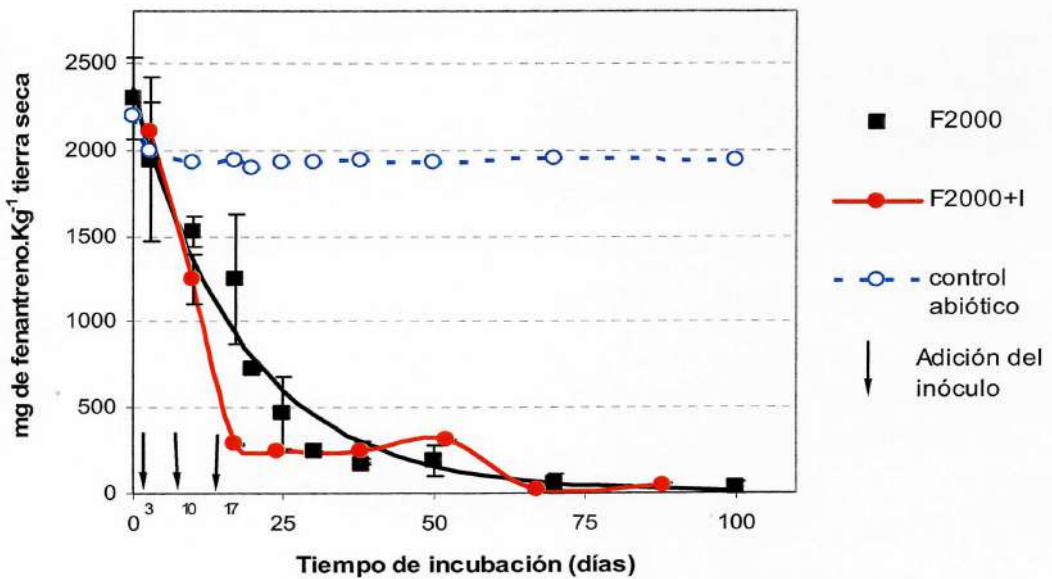


Figura VI.A-1: Concentración de Fenantreno en los microcosmos F2000, F2000+I y Control abiótico durante el proceso de biorremediación. Se grafican los valores promedio de dos ensayos independientes y las desviaciones estándar de dos replicas por microcosmo

Mientras el microcosmo F2000 mostró una típica cinética de eliminación de primer orden (Fig. VI.A-1), el microcosmo inoculado F2000+I se comportó en forma diferente, mostrando una curva de eliminación de fenantreno con una rápida eliminación durante el tiempo de inoculación (primeros 20 días de tratamiento). A lo largo de este período, la concentración residual de fenantreno fue significativamente mas baja en el microcosmo F2000+I ($P < 0.05$) que en el F2000. Cuando la inoculación cesó (día 17) y hasta el día 52, se observó una abrupta interrupción en la eliminación de fenantreno en el microcosmo F2000+I y como consecuencia se encontró una mayor concentración residual de fenantreno que en F2000. Luego el

microcosmo inoculado presentó una segunda fase de eliminación, alcanzando niveles de fenantreno residual no significativamente diferentes de los de F2000, el día 66 de tratamiento.

VI.A.2 Efecto de la inoculación sobre la dinámica y la actividad biológica de las comunidades microbianas durante el proceso de biorremediación

VI.A.2.i Efecto de la inoculación sobre la dinámica de las poblaciones microbianas cultivables

Se determinó el efecto producido por el contaminante y por la inoculación sobre la comunidad del suelo analizando observando los cambios en la densidad de las poblaciones bacterianas heterótrofas cultivables en R₂A, bacteriana degradadora de PAH y población fúngica (RB).

Las figuras VI.A-2 y V.A-3 muestran la evolución de las poblaciones bacterianas heterótrofas cultivables y degradadoras de PAH en los sistemas F2000, F2000+I y control.

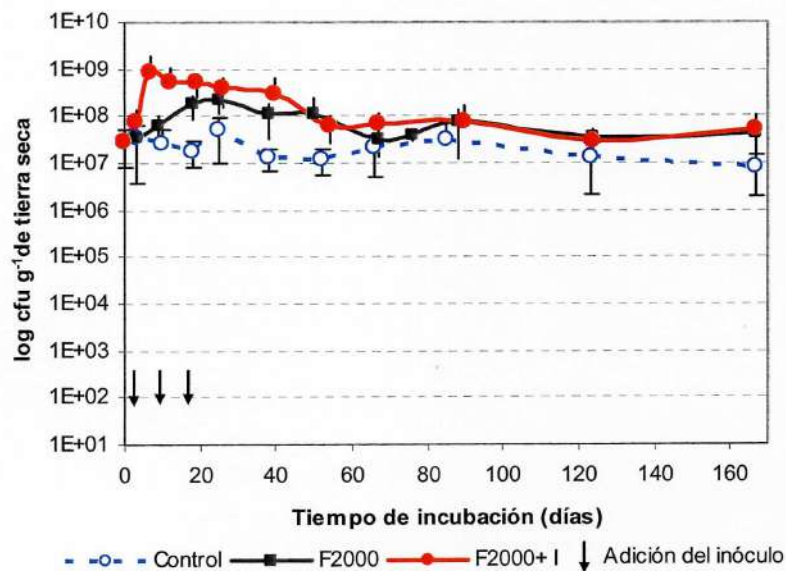


Figura VI.A-2: Evolución de la densidad de poblaciones heterótrofas cultivables en los microcosmos Control, F2000 y F2000+I, durante el proceso de biorremediación. Se grafican los valores promedio de dos ensayos independientes y las desviaciones estándar de dos replicas por microcosmo

La múltiple adición de fenantreno al suelo provocó un incremento en la densidad de bacterias heterótrofas y bacterias degradadoras de PAH en el microcosmo F2000 (Fig.VI.A-2 y VI.A-3). Fue posible observar que la adición de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA en el

microcosmo F2000+I produjo un incremento adicional de ambas poblaciones bacterianas. Durante los primeros 25 días del tratamiento (período de inoculación), el número de bacterias heterótrofas cultivables (Fig. VI.A-2) así como el número de bacterias degradadoras de PAH en el microcosmo F2000+I fueron significativamente mayores que en F2000 ($P < 0.05$). Al final del tratamiento, ambas poblaciones bacterianas declinaron hasta niveles similares a los de F2000.

Después de 60 días de tratamiento, los recuentos de bacterias heterótrofas cultivables en los microcosmos F2000 y F2000+I no mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) con el microcosmo control. Para ese momento, más del 96% del fenantreno había sido eliminado. Sin embargo, el número de bacterias cultivables degradadoras de PAH en los microcosmos contaminados permaneció más alto que en el microcosmo control a lo largo de todo el tratamiento (Fig. VI.A-3).

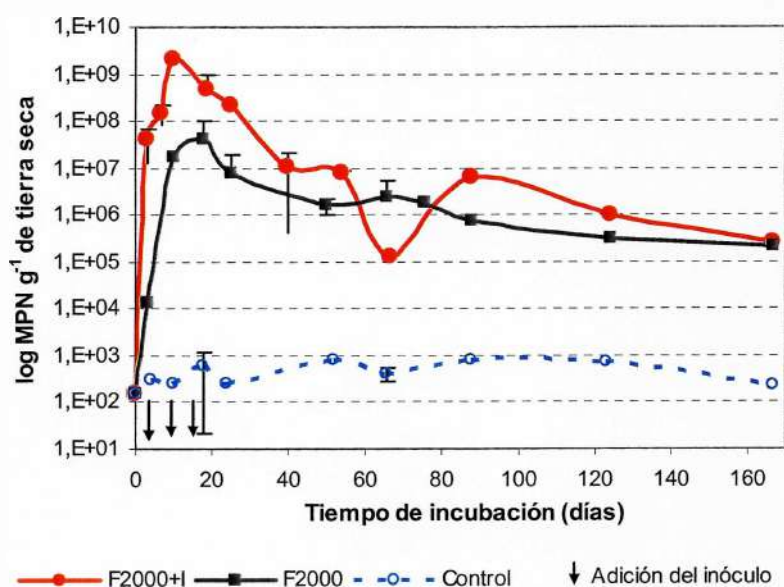


Figura VI.A-3: Evolución de la densidad de poblaciones cultivables degradadoras de PAH en los microcosmos Control, F2000 y F2000+I, durante el proceso de biorremediación. Se grafican los valores promedio de dos ensayos independientes y las desviaciones estándar de dos replicas por microcosmo

El microcosmo F2000+I mostró recuentos de hongos en RB inferiores a los del control y F2000 durante el período de inoculación. Estas diferencias desaparecieron hacia el día 60 de tratamiento. Más tarde, antes de finalizar la incubación, se registró un aumento significativo en el número de hongos del microcosmo F2000+I.

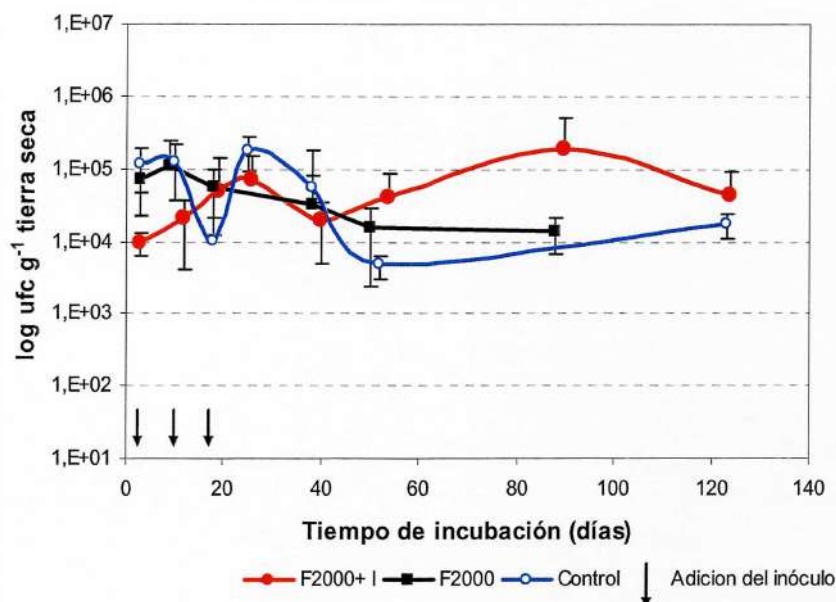


Figura VI.A-4: Evolución de la densidad de poblaciones fúngicas cultivables en los microcosmos Control, F2000 y F2000+I, durante el proceso de biorremediación. Se grafican los valores promedio de dos ensayos independientes y las desviaciones estándar de dos replicas por microcosmo

VI.A.2.ii Efecto de la inoculación sobre la actividad biológica de las comunidades microbianas

Las actividades metabólicas del suelo están mediadas por sistemas enzimáticos específicos, la mayoría de los cuales son producidos por la microbiota del suelo.

Las actividades enzimáticas de deshidrogenasas, amilasas, fosfatasas, arilsulfatasas y celulasas son todas indicativas de los principales procesos productivos del suelo (Barkay col., 1986)

Aquí se intenta determinar los cambios en la actividad microbiana del suelo ocurridos por efecto de la contaminación con fenantreno y de la presencia del inoculante *S. paucimobilis* 20006FA durante el proceso de biorremediación.

Con el objetivo de determinar tales cambios en una proporción relativamente grande de la comunidad microbiana (Atlas y Bartha 1998) se selecciona el ensayo que determina la actividad deshidrogenasa debida a un amplio grupo de enzimas microbianas que transfieren electrones a aceptores disponibles, como el O₂. Este grupo de enzimas es inactivada en la forma extracelular y por ello es frecuentemente utilizada como medida de la actividad microbiana en suelo (Morra, 2002).

VI.A.2.ii.a Actividad deshidrogenasa

La determinación de la actividad deshidrogenasa de la comunidad microbiana de los sistemas se realizó según el protocolo de Thalman (1968) que consiste en la incubación de una muestra del sistema de suelo con un aceptor artificial de electrones como el Cloruro de trifenil tetrazolium (TTC) en un buffer adecuado. Luego de la incubación se mide colorimetricamente el producto reducido Trifenil Formazan (TPF) a una longitud de onda de 580 nm.

La actividad deshidrogenasa fue determinada periódicamente durante el proceso de biorremediación en los sistemas contaminados y en el control.

La figura VI.A-5 muestra la actividad deshidrogenasa en los microcosmos control, F2000 y F2000+I. En todos los sistemas, aun si el PAH y el inóculo fueron agregados o no, la actividad deshidrogenasa aumentó durante los primeros 20 días del experimento y ese aumento fue seguido por una disminución que continuó hasta el final del tratamiento (Fig.VI.A-5).

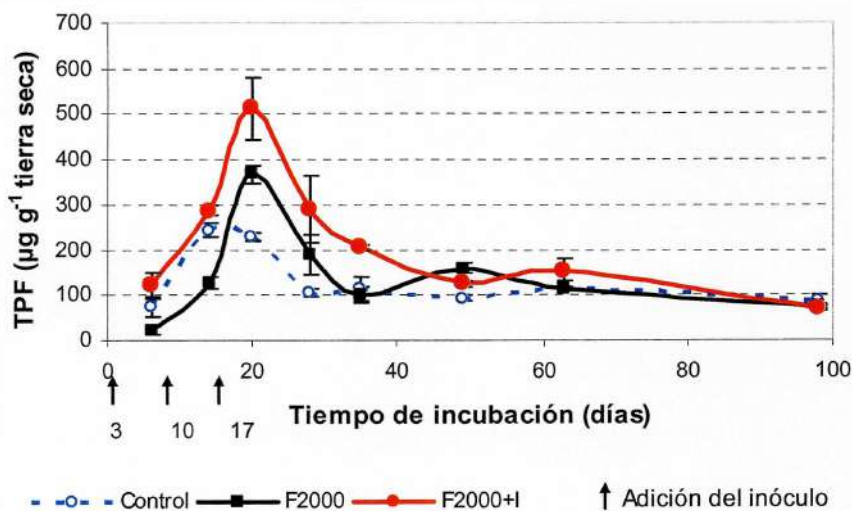


Figura VI.A-5: Actividad deshidrogenasa (μg de Trifenilformazán (TPF) por g de tierra seca) en los microcosmos Control, F2000 y F2000+I durante el proceso de biorremediación. Se grafican los valores promedio de dos ensayos independientes y las desviaciones estándar de tres replicas por microcosmo

El incremento temprano de la actividad deshidrogenasa observado en el microcosmo control pudo deberse a la manipulación del suelo (mezclado, ajuste de humedad y temperatura) (Degens y Harris, 1997). La incorporación de fenantreno en el microcosmo F2000 causó un inicial efecto inhibitorio sobre la actividad deshidrogenasa mostrando valores significativamente inferiores a los del control durante las primeras dos semanas de tratamiento. Observándose un efecto estimulador posterior hacia los 20 días de tratamiento que se relacionó con la actividad degradadora de fenantreno de los microorganismos indígenas (en el caso de F2000). La

inoculación con *S. paucimobilis* 20006FA causó un efecto estimulador adicional sobre la actividad deshidrogenasa en el microcosmo F2000+I, enmascarando el efecto inhibitorio inicial del fenantreno, la cual permaneció significativamente más alta que en el microcosmo F2000 aún después del final del período de inoculación ($P < 0.05$).

VI.A.2.ii.b Velocidad de producción de CO₂

La tasa respiratoria fue medida diariamente en biometers durante los primeros 46 días de tratamiento y expresada como producción de CO₂ por g de tierra seca (Fig. VI.A-6) por día.

La adición de fenantreno resultó en un significativo incremento de la tasa de respiración total de la microflora del suelo en los microcosmos F2000 y F2000+I después de 15 días de tratamiento. La inoculación con *S. paucimobilis* 20006FA causó un incremento mayor aún. Después de 45 días de tratamiento, la diferencia en la tasa de respiración de los microcosmos contaminados no fue significativamente diferente de la del microcosmo control.

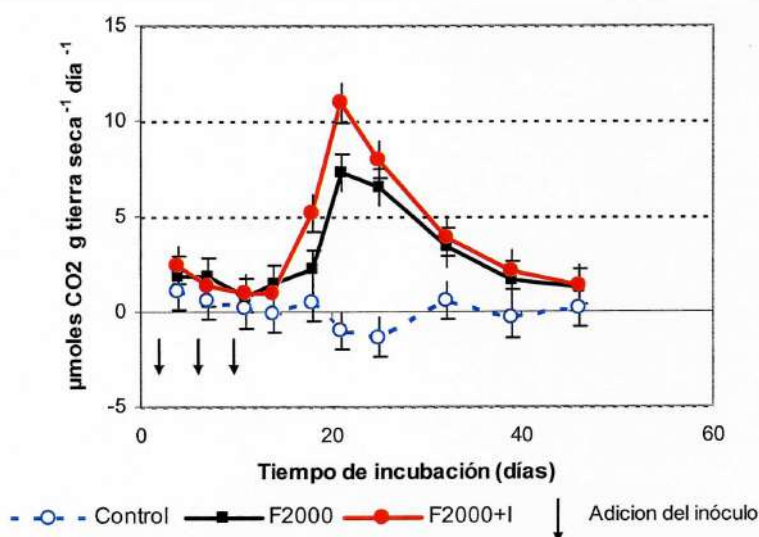


Figure VI.A-6: Tasa de producción de CO₂ (µmoles de CO₂ por g de tierra seca por día) de los microcosmos Control, F2000 y F2000+I durante los primeros 46 días de tratamiento. Se grafican los valores promedio de tres ensayos independientes y las desviaciones estándar de dos replicas por microcosmo

De este modo, los resultados de ambas, la actividad deshidrogenasa (Fig.VI.A-5) y la tasa respiratoria (Fig.VI.A-6) mostraron que la incorporación de fenantreno produjo un incremento en la actividad biológica después de una fase de latencia inicial. La inoculación con *S. paucimobilis* 20006FA no redujo la fase de latencia pero contribuyó con un incremento aún mayor de la actividad biológica del suelo.

VI.A.3 Efecto de la inoculación sobre la estructura de las comunidades microbianas durante el proceso de biorremediación

VI.A.3.i Diversidad funcional

Los perfiles fisiológicos de los microcosmos control, F2000 y F2000+I determinados por BIOLOG® ECOplate fueron analizados por el análisis de los componentes principales (PCA). La proyección de los componentes representativos para cada muestra en un gráfico bidimensional permite una más fácil visualización de los cambios en la comunidad microbiana de suelo causados por la contaminación con fenantreno y por la inoculación con la cepa *S. paucimobilis* 20006FA (Fig. VI.A-7). El análisis estadístico por PCA de los datos indicó que los primeros dos componentes principales explican el 42.55% de la variabilidad total. Las fuentes de carbono con altos coeficientes de correlación para los componentes principales 1 (PC1) y 2 (PC2) se listan en la tabla VI.A-1.

Tabla VI.A-1: Sustratos con altos coeficientes de correlación para PC1 y PC2 en PCA de los perfiles de utilización de sustratos para los microcosmos F2000, F2000+I y Control

PC1	R	PC2	R
Glycyl-L-glutamic acid	0.805	Pyruvic acid methyl ester	-0.551
L-arginine	0.791		
D, L- α -glycerol phosphate	0.776		
γ -hydroxybutyric acid	0.706		
Phenylethylamine	0.706		
L-serine	0.704		
L-threonine	0.700		
L-asparagine	0.680		
α -cyclodextrin	0.659		
L-phenylalanine	0.643		
Putrescine	0.618		
N-acetyl-D-glucosamine	0.614		
D-malic acid	0.613		
β -methyl-D-glucoside	0.606		
L-erythritol	0.589		
D-xylose	0.582		
Itaconic acid	0.575		
D-galacturonic acid	0.570		
D-galactonic acid γ -lactone	0.561		

Luego de 21 días de tratamiento el microcosmo F2000 no mostró diferencias con el control, con valores en PC1 y PC2 que sugirieron una alta capacidad catabólica (Fig VI.A-7). Mientras que el microcosmo F2000+I mostró un corrimiento a valores negativos de PC1, revelando una capacidad catabólica disminuida. Conociendo que la cepa *S. paucimobilis* 20006FA no es capaz de crecer utilizando ninguno de los sustratos incluidos en el análisis ECOplate (Cap IV), la menor capacidad catabólica hallada en el microcosmo F2000+I podría ser explicada como una dominancia temporal de *S. paucimobilis* 20006FA, provocada por las sucesivas inoculaciones durante los primeros 17 días de tratamiento .

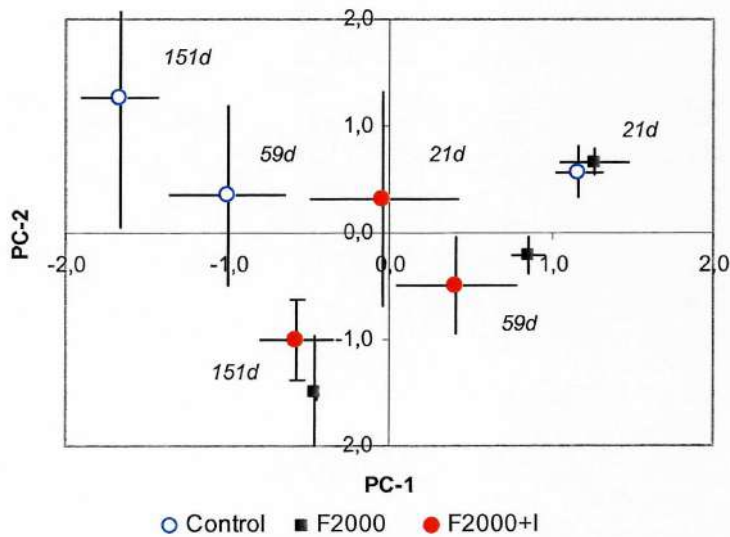


Figure VI.A-7: Valores del análisis de los componentes principales de datos de los patrones de utilización de sustratos de las comunidades microbianas de varios microcosmos (Ecoplate Biolog®). Los valores representan los promedios de tres replicas por microcosmo

Después de 59 días de tratamiento, mientras el microcosmo control se desplazó hacia valores que indican una pérdida de las capacidades catabólicas representadas en PC1 (Fig. VI.A-7 y Tabla VI.A-1), los microcosmos F2000 y F2000+I mantuvieron sus capacidades catabólicas relacionadas con PC1 pero perdieron aquellas relacionadas con PC2.

Al final del experimento los dos microcosmos contaminados no mostraron diferencias entre sí, pero permanecieron las diferencias significativas con el microcosmo control en PC1 y PC2. Este hecho muestra que la modificación en la diversidad catabólica de la comunidad microbiana producida por la contaminación con fenantreno persiste aún cuando el fenantreno ha sido eliminado completamente del sistema.

El estudio de las comunidades a través de los perfiles metabólicos de sus cultivos predominantes, ha indicado que el proceso de biorremediación en F2000 y F2000+I conduce al establecimiento de comunidades semejantes en cuanto a su diversidad catabólica pero diferentes de la comunidad dominante del suelo limpio.

VI.A.3.ii Diversidad genética

La pobre sobrevivencia de los microorganismos inoculados en el ambiente permanece como un desafío para las biotecnologías de biorremediación que cuentan con el bioaumentación (Singer et al., 2005)

Los cambios en la diversidad genética causados por la contaminación con fenantreno y la inoculación con la cepa *S. paucimobilis* 20006FA, se analizaron mediante los perfiles DGGE del microcosmo control (C), *S. paucimobilis* 20006FA (Sp) y los microcosmos F2000 y F2000+I, a diferentes tiempos de tratamiento.

El cambio observado entre los perfiles de bandas indica los cambios producidos en la comunidad del suelo en respuesta a la contaminación con fenantreno y a la inoculación con *S. paucimobilis* 20006FA.

Los patrones de DNA obtenidos de los productos PCR de las diluciones 1/100 del DNA total de la comunidad se presentan en la Fig VI.A-8a.

La dinámica de las comunidades durante el tratamiento se vio reflejada en la secuencia de aparición y desaparición de bandas de los perfiles obtenidos en cada punto de muestreo.

Una inspección visual del gel de DGGE mostró ausencia de bandas intensas en el perfil del microcosmo control, mientras que la contaminación con fenantreno y la inoculación con *S. paucimobilis* 20006FA provocaron dramáticos cambios en la diversidad genética de la comunidad bacteriana del suelo, con la aparición de bandas de gran intensidad (Figura VI.A-8a).

Bandas de alta intensidad son comúnmente encontradas en muestras donde se ha detectado una importante actividad microbiana y representan las poblaciones que son más competitivas en las condiciones selectivas establecidas (Nakatsu, 2005).

La comparación de los patrones de bandas del microcosmo F2000 mostró cambios en la estructura de la comunidad después de 24 días de tratamiento.

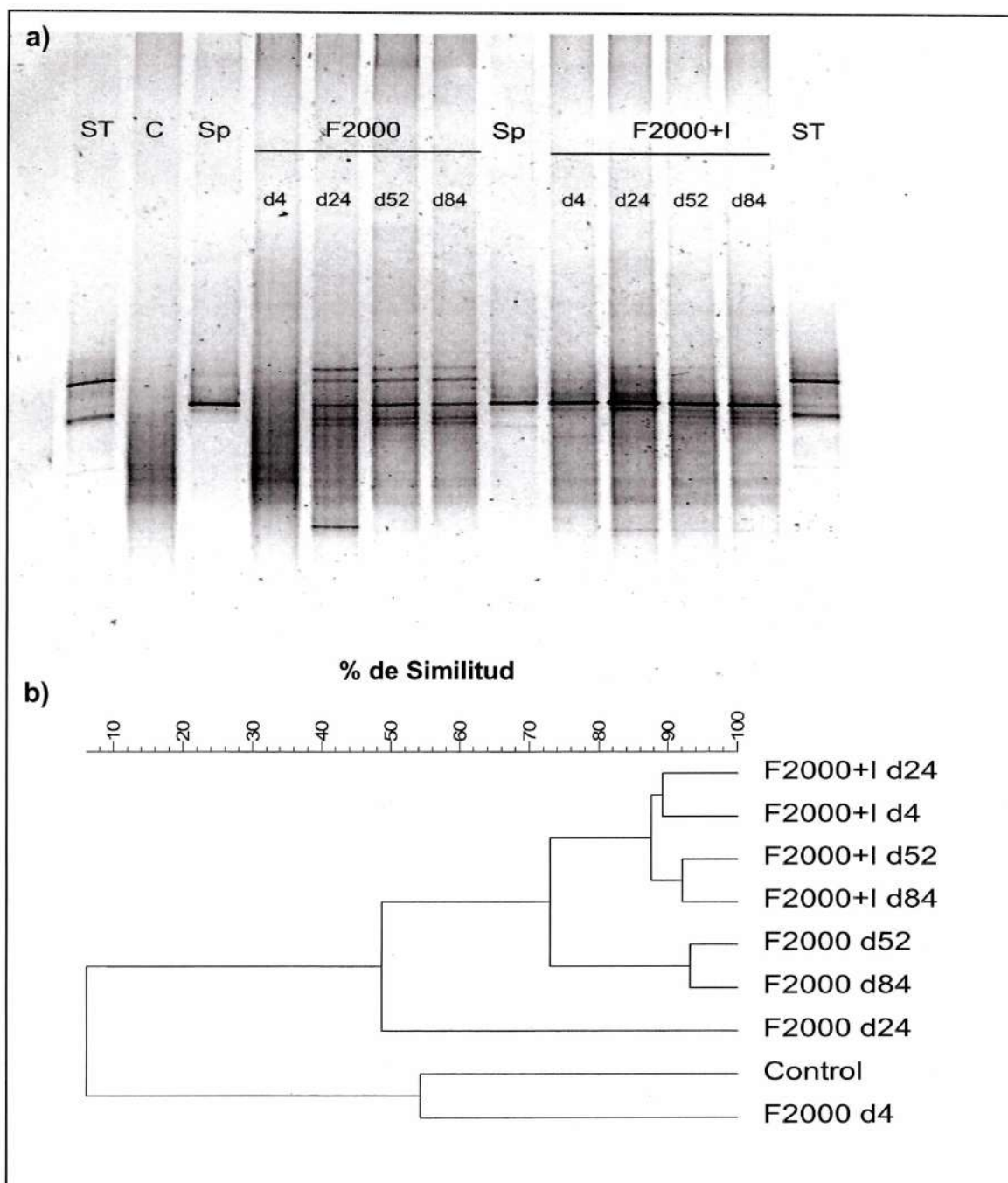


Figure VI.A-8: a) Análisis por PCR-DGGE de las poblaciones bacterianas de los microcosmos de suelo contaminado con fenantreno (F2000 y F2000+I) en el curso de 84 días de incubación, y el microcosmo control (C) después de 4 días de incubación.. ST: Standard bacteriano; Sp: *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA.

b) Dendrograma de los clusters basados en los patrones de bandas de la DGGE y calculados utilizando la correlación de Pearson y el análisis UPGMA. Las diferencias entre los perfiles se indican por porcentaje de similitud.

Se observaron diferencias claras entre los patrones de DGGE de los microcosmos F2000 y F2000+I. Los patrones del microcosmo F2000+I indicaron una dominancia marcada de *S. paucimobilis* 20006FA desde el comienzo del experimento (día 4, cuando se había realizado solo una inoculación) hasta el día 84 de tratamiento (2 meses después de la última

inoculación). Durante el período de inoculación (día 4 a 24), los patrones de DGGE del microcosmo F2000+I mostraron una significativa reducción en el número de bandas en comparación con el microcosmo F2000. Después de 52 días de tratamiento hubo una recuperación en el número de bandas en F2000+I.

Con la intención de realizar un análisis cuantitativo, se procede al digitalizado del gel y a la determinación de la posición e intensidad de cada banda. La curva densitométrica resultante fue utilizada como base de datos para calcular la matriz de similitud y el dendrograma correspondiente, que permite la comparación entre los perfiles de bandas.

La figura VI.A-8b muestra el dendrograma del análisis UPGMA de los perfiles DGGE, en ella se puede apreciar la formación de dos clusters marcadamente diferentes (menos de 10% de similitud). El mayor de estos clusters incluye los perfiles obtenidos con las muestras del microcosmo F2000 a partir del día 24 de tratamiento y del microcosmo F2000+I durante todo el tratamiento. El otro pequeño cluster incluye los perfiles de la comunidad microbiana del suelo el control y el microcosmo F2000 a los 4 días de tratamiento.

Los perfiles incluidos en el primer cluster describen la estructura de la comunidad microbiana durante el período de eliminación del contaminante coincidente con el establecimiento de una población bacteriana activamente degradadora de hidrocarburos (Fig. VI.A-3).

Por otra parte en la figura VI.A-8b se puede observar que dentro del primer cluster los perfiles de bandas de todas las muestras del microcosmo F2000+I formaron un subcluster con más del 89 % de similitud y que este subcluster se asemeja en un 72% (aproximadamente) a los perfiles obtenidos con las muestras del microcosmo F2000 luego de 52 y 84 días de tratamiento.

Mientras la contaminación con fenantreno causó cambios graduales y sucesivos en la estructura de la comunidad microbiana, la estrategia de inoculación utilizada en este experimento estimuló cambios inmediatos, significativos y estables en la estructura de la comunidad bacteriana predominante en el suelo.

La Fig.VI.A-9a muestra los resultados de la separación de los productos PCR en la DGGE cuando se utilizaron primers específicos para el género *Sphingomonas* (Leys y col., 2004) para amplificar las muestras extraídas de los microcosmos F2000 y F2000+I a diferentes intervalos de tiempo, el microcosmo control (C), y la cepa *S. paucimobilis* 20006FA (Sp).

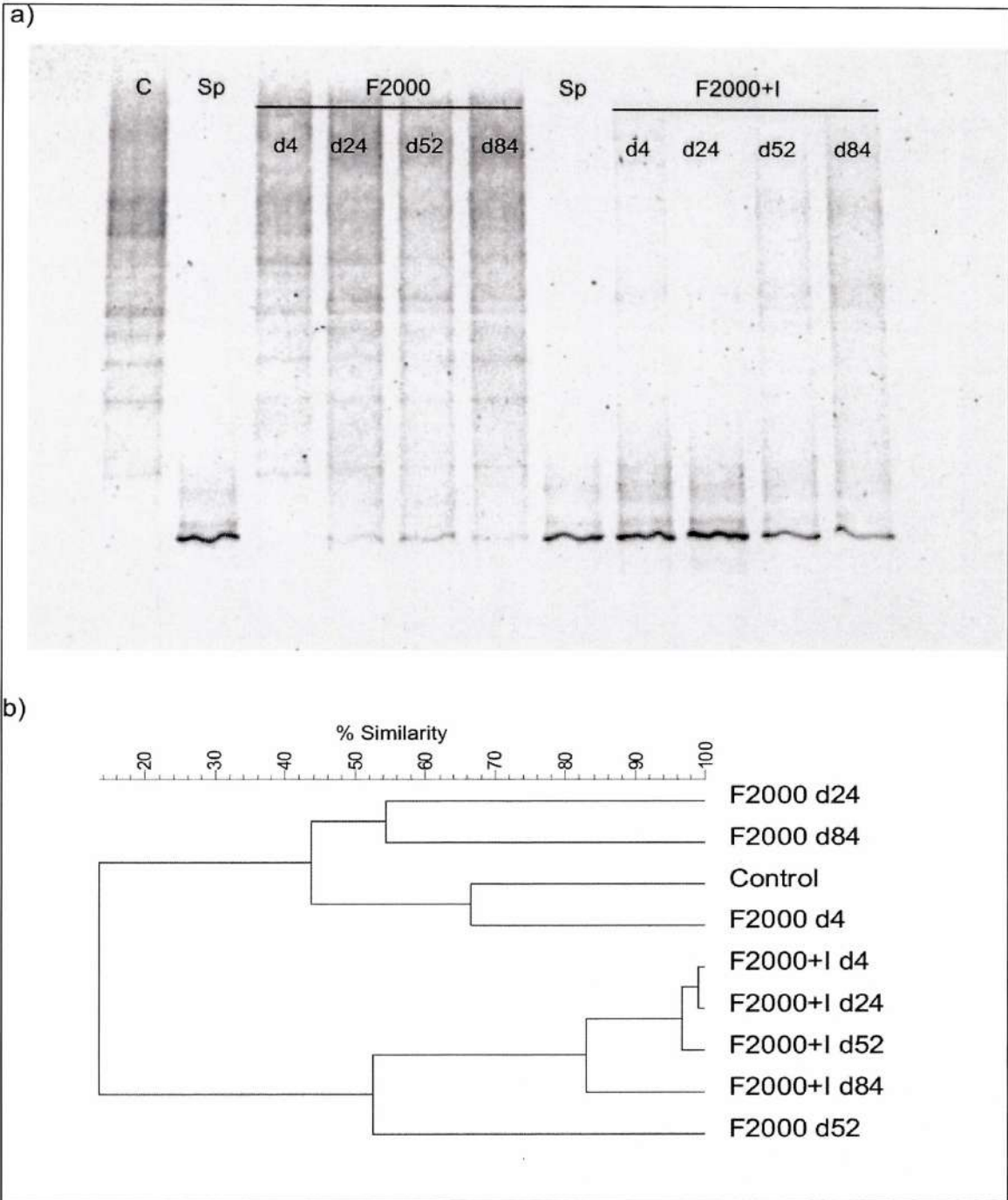


Figure VI.A-9: a) Análisis por PCR-DGGE de las poblaciones de Sphingomonads de los microcosmos de suelo contaminado con fenantreno (F2000 y F2000+I) en el curso de 84 días de incubación, y el microcosmo control (C) después de 4 días de incubación: Sp: *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA.

b) Dendrograma de los clusters basados en los patrones de bandas de la DGGE y calculados utilizando la correlación de Pearson y el análisis UPGMA. Las diferencias entre los perfiles se indican por porcentaje de similitud.

La contaminación con fenantreno produjo cambios tempranos en el patrón de bandas de las poblaciones bacterianas del suelo pertenecientes al grupo Sphingomonads, como se pudo observar en el perfil obtenido del microcosmo F2000 a los 4 días de tratamiento (Fig. VI.A-9 a).

Los patrones de DGGE del microcosmo F2000+I mostraron una reducida diversidad de *Sphingomonads* en comparación con la de los microcosmos F2000 y control observándose una alta predominancia del inóculo *S. paucimobilis* 20006FA desde el comienzo del tratamiento hasta el día 84 en el microcosmo F2000+I. La banda correspondiente al inóculo también fue observada en el microcosmo F2000 después de 24 días de tratamiento y hasta los 84 días. Sin embargo esta banda no es predominante en suelo limpio, lo que indicaría la selección de la cepa al producirse la contaminación con fenantreno.

El dendrograma del análisis UPGMA de los patrones de DGGE se representa en la Fig.VI.A-9b. En esta figura se puede observar que las muestras del microcosmo F2000+I comparten más del 82% de similitud y forma un cluster junto con el perfil de la muestra del microcosmo F2000 tomada a los 52 días de tratamiento. Este cluster fue marcadamente diferente (con menos del 15% de similitud) de los perfiles de las muestras de los microcosmos control y F2000 de los días 4, 24 y 84 de tratamiento. Esto demuestra que la inoculación ha producido cambios importantes en la diversidad y prevalencia de especies del género *Sphingomonas* en suelos contaminados con hidrocarburos.

VI.A.4 Discusión

La estrategia de inoculación semanal utilizada durante los primeros 17 días de tratamiento estimuló la eliminación de fenantreno solo durante el periodo de inoculación (Fig. VI.A-1). Este cambio en la velocidad de eliminación de fenantreno concuerda con el incremento del número de bacterias heterótrofas cultivables (Fig. VI.A-2) y de bacterias degradadoras de PAH (Fig. VI.A-3) en el microcosmo F2000+I comparado con el microcosmos F2000. El patrón de DGGE del microcosmo inoculado mostró una clara predominancia de la cepa inoculada desde la primera inoculación (Fig. VI.A-8a), asociada con un abrupto cambio en la composición de la comunidad bacteriana (Fig. VI.A-8b). Un resultado similar se obtuvo utilizando el primer específico para *Sphingomonas* (Fig. VI.A-9b). Si bien la alta abundancia del inoculante en el suelo puede disturbar el análisis de la composición de la comunidad bacteriana total utilizando el método de DGGE (Gomes y col., 2005), la menor diversidad funcional en el microcosmo F2000+I después de 21 días de tratamiento indicada por el análisis por PCA de los patrones de utilización de sustratos ECOplate (Fig. VI.A-7) confirmarían los resultados de la diversidad genética. Por lo tanto, estos resultados podrían ser interpretados como un rápido establecimiento de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA con los consecuentes cambios en la diversidad bacteriana en el microcosmo. Las cepas de *Sphingomonas* son aisladas frecuentemente de suelos contaminados con PAH, lo que sugiere que son miembros clave de

la microbiota degradadora de PAH (Del Panno y col., 2005; Déziél y col., 1996; Viñas y col., 2005).

La cepa *S. paucimobilis* 20006FA, aislada de un suelo contaminado con fenantreno, no representa una población dominante en el microcosmo control (Fig. VI.A-8a), pero fue naturalmente seleccionada en suelo contaminado con fenantreno (F2000) después de 24 días de tratamiento (Fig. VI.A-8a). Los resultados también demuestran que 20006FA es capaz de establecerse rápidamente cuando es inoculada (F2000+I) en presencia de fenantreno (Fig VI.A-8a). La predominancia de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA en suelo contaminado con fenantreno refuerza el hecho de que la comunidad de *Sphingomonas* puede estar jugando un rol desconocido en la colonización y biorremediación de suelos contaminados con fenantreno (Leys y col., 2005).

Después de la última inoculación (día 17 de tratamiento) la eliminación de fenantreno en el microcosmo inoculado se detuvo y su concentración permaneció constante hasta aproximadamente el día 50 de tratamiento. En paralelo, el número de bacterias heterótrofas cultivables (Fig. VI.A-2) y de bacterias degradadoras de PAH (Fig. VI.A-3) en el microcosmo F2000+I comenzó a disminuir lentamente, sin embargo la actividad biológica mostró sus valores más altos después de los 21 días de tratamiento. A diferencia de esto, en el microcosmo F2000 si bien el pico de actividad biológica también se observó luego de 21 días de tratamiento, en ese mismo momento se presentaron los mayores recuentos y eliminación de fenantreno. (Fig.VI.A-2 y VI-3).

S. paucimobilis 20006FA es capaz de crecer utilizando fenantreno como única fuente de carbono y energía (fig IV-7, Cap.IV), y la aparición de color amarillo-rojizo sugiere la acumulación de productos de fisión de los anillos (Story y col., 2000). Posee una dioxigenasa constitutiva y es capaz de mineralizar fenantreno, en un $4,6 \pm 1,7$ % de lo que se elimina (Cap. IV). Por eso esta cepa podría ser un candidato potencial para ocupar un rol funcional relacionado con los primeros pasos en la cadena trófica de fenantreno en suelo.

La rápida eliminación de fenantreno observada en el microcosmo inoculado (Fig VI.A-1) sugiere la acumulación de metabolitos intermediarios no detectables por GC que son altamente tóxicos y reactivos (Sims, 1982), y pueden reducir la viabilidad de las bacterias degradadoras de PAH o causar inhibición de la degradación de PAH (Kanzuga y Aitken 2000). Por lo tanto, la pausa observada en la eliminación de fenantreno en el microcosmo inoculado podría ser consecuencia de la acumulación de metabolitos tóxicos del fenantreno causados por la actividad metabólica del inóculo establecido en una comunidad bacteriana con menor diversidad genética (Fig.VI.A-8a) y funcional (Fig.VI.A-7).

A diferencia del comportamiento observado en la eliminación de fenantreno en el microcosmo inoculado F2000+I (Fig. VI-1), cuando se estudió ese mismo sistema en biorreactores de suelo (Fig. V-2, Cap. V) no se observó una pausa en la degradación de

fenantreno lo que pudo deberse a las mejores condiciones de aireación de las columnas y a que se incorporó un menor número de microorganismos, (ya que se realizó una única inoculación) produciendo así un menor efecto sobre la diversidad genética de la comunidad indígena.

El incremento observado en la actividad deshidrogenasa (Fig.VI.A-4) y la producción de CO₂ (Fig.VI.A-5) después del período de inoculación podría estar indicando una contribución sintrófica o comensal de la *S. paucimobilis* 20006FA con otras especies de la comunidad del suelo. Esas otras especies, las cuales pueden ser capaces de completar la vía catabólica, tuvieron que ser seleccionadas dentro de una comunidad microbiana de suelo disturbada por la inoculación y por la presión selectiva de los metabolitos del fenantreno. En el microcosmo F2000 tal acumulación de metabolitos inhibitorios puede no haber ocurrido debido a una menor velocidad de degradación de fenantreno. Los cambios secuenciales observados en la comunidad bacteriana del microcosmo F2000 (Fig.VI.A-8b) podrían ser interpretados como la selección natural de bacterias con diferentes capacidades catabólicas en paralelo con la producción de metabolitos del fenantreno. Como resultado, la rápida fase de eliminación de fenantreno continuó por más de 21 días, resultando en concentraciones de fenantreno no significativamente diferentes con respecto al microcosmo inoculado.

Después de 50 días de tratamiento, cuando la producción de CO₂ (Fig.VI.A-6) y la actividad deshidrogenasa (Fig.VI.A-5) habían disminuido (lo que podría estar relacionado con la eliminación de metabolitos del fenantreno) y el microcosmo F2000+I había recuperado parcialmente su diversidad genética (Fig.VI-8a), se observó una segunda fase de la eliminación de fenantreno en el microcosmo inoculado. Este comportamiento sostendría la hipótesis de que la pausa observada en la eliminación de fenantreno en el microcosmo inoculado fue principalmente debida a la acumulación de metabolitos del fenantreno y no debida a la disminución en la biodisponibilidad de fenantreno como se sugiere para la degradación de naftaleno por *Pseudomonas putida* (Gomes y col.,2005).

En el mismo sentido, Schwartz and Scow (2001) encontraron que, después de la primera inoculación con la bacteria degradadora de PAH *Arthrobacter* sp. la inicial mineralización de fenantreno disminuía en un patrón bifásico exponencial, aun cuando una gran fracción de fenantreno no había sido mineralizada aun. Sin embargo, una re-inoculación incrementó la tasa de mineralización de fenantreno sugiriendo que el fenantreno permanecía biodisponible. Por otro lado, bacterias con potencial catabólico para degradar PAH sorbidos han sido descritas (Bastiaens y col., 2000; Dean y col., 2001; Friedrich y col.,2000; van Herwijnen y col., 2003) indicando que la biodisponibilidad de PAH puede ser especie-específica (Dean y col., 2001; Reid y col.,2000).

Como se ha mostrado en el capítulo IV la cepa *S. paucimobilis* 20006FA poseería alguno de los factores promotores de la biodisponibilidad de PAH como formación de biofilms y

producción de biosurfactantes, por esto, la biodisponibilidad de fenantreno no sería la principal causa que limitaría la actividad de este inóculo en suelo recientemente contaminado.

Después de 100 días de tratamiento, la concentración de fenantreno alcanzó valores que estaban dentro de los límites legales en Argentina en ambos microcosmos contaminados. Sin embargo, hasta el día 84, los perfiles de DGGE de la comunidad bacteriana mostraron que el suelo nunca retornó a su estado original, por otra parte también se mantienen las diferencias en la composición de la comunidad bacteriana de los microcosmos F-2000 y F-2000+I (Fig.VI.A-8b). Más aún, los microcosmos contaminados mostraron perfiles fisiológicos significativamente diferentes a los perfiles del microcosmo control después de 151 días de tratamiento (Fig.VI-6). Estos resultados están de acuerdo con los de Del Panno y col. (2005), quienes observaron que durante un proceso de biorremediación en suelo contaminado con residuo petroquímico (con altas concentraciones de PAH) se produce un impacto a largo plazo sobre la estructura de la comunidad bacteriana de suelo. Morelli y col. (2001) también reportaron una persistente actividad mutagénica en suelos después del agregado de residuo petroquímico, lo cual también fue interpretado como una acumulación de metabolitos tóxicos.

En este estudio se examinó la sobrevivencia de la cepa degradadora de PAH *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA en suelo a través de la presencia de la banda de DNA correspondiente a la cepa en el microcosmo inoculado. Encontramos que la cepa se establece y permanece como población mayoritaria dentro de la comunidad microbiana del suelo aún después de que el fenantreno fue eliminado en un 98% luego 60 días de tratamiento. Se piensa que luego de la eliminación del 98% la cepa viviría del fenantreno adsorbido al suelo gracias a sus propiedades promotoras de la disponibilidad.

Los resultados del presente estudio mostraron un impacto a largo plazo de la contaminación con fenantreno sobre la diversidad genética y funcional de las comunidades bacterianas de suelo que podría ser parcialmente atribuido a la presión selectiva ejercida por la todavía apreciable concentración de fenantreno y sus metabolitos. En este sentido, la estrategia de bioaumentación no podría revertir ese efecto tardío.

A pesar del establecimiento de la cepa inoculada a largo plazo, el bioaumentación no fue efectivo en incrementar dramáticamente la tasa o extensión de la remoción de PAH y no logró mejorar los efectos residuales del fenantreno sobre la comunidad microbiana de suelo.

VI.B. Efecto del bioaumentación sobre la degradación de PAH y la comunidad microbiana de suelos contaminados con fenantreno y pireno

El impacto de la co-contaminación con fenantreno y pireno y de la inoculación con la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA sobre la velocidad de eliminación de PAH y la respuesta de la comunidad microbiana del suelo se estudió en cinco microcosmos de suelo que fueron incubados por un período de 140 días en condiciones controladas de temperatura y humedad. Los microcosmos fueron preparados con: (i) suelo contaminado con fenantreno (F2000); (ii) suelo contaminado con fenantreno y pireno (F2000+P1000); (iii) suelo contaminado con pireno (P1000); (iii) suelo contaminado con fenantreno y pireno e inoculado con *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA (F2000+P1000+I); (iv) suelo sin contaminar (Control)

VI.B.1 Efecto de la inoculación sobre la biodegradación del contaminante

Se determinó la concentración de los contaminantes (fenantreno y pireno) a distintos tiempos durante el tratamiento de biorremediación por cromatografía gaseosa según la técnica descrita por Vecchioli y col (1997)

La Fig. VI.B-1 muestra la concentración de fenantreno y pireno en los microcosmos F2000, P1000, F2000+P1000 y F2000+P1000+I, durante el proceso de biorremediación. Después de 140 días de tratamiento todos los microcosmos mostraron una significativa eliminación de los PAH, alcanzando concentraciones por debajo de los estándares de limpieza para suelos (50 mg kg^{-1}), según la Ley Nacional Argentina 24051 (1992), a excepción del pireno en el sistema F2000+P1000+I.

Los microcosmos contaminados solo con un PAH (P1000 y F2000), mostraron una lenta eliminación de hidrocarburos en los primeros días de tratamiento. Mientras que el microcosmo F2000+P1000, mostró una mayor velocidad inicial de eliminación de PAH.

Sin embargo las concentraciones residuales de PAH después de 50 días de tratamiento son significativamente mayores en el microcosmo F2000+P1000 que a las encontradas en los microcosmos F2000 y P1000 (tabla VI.B-1).

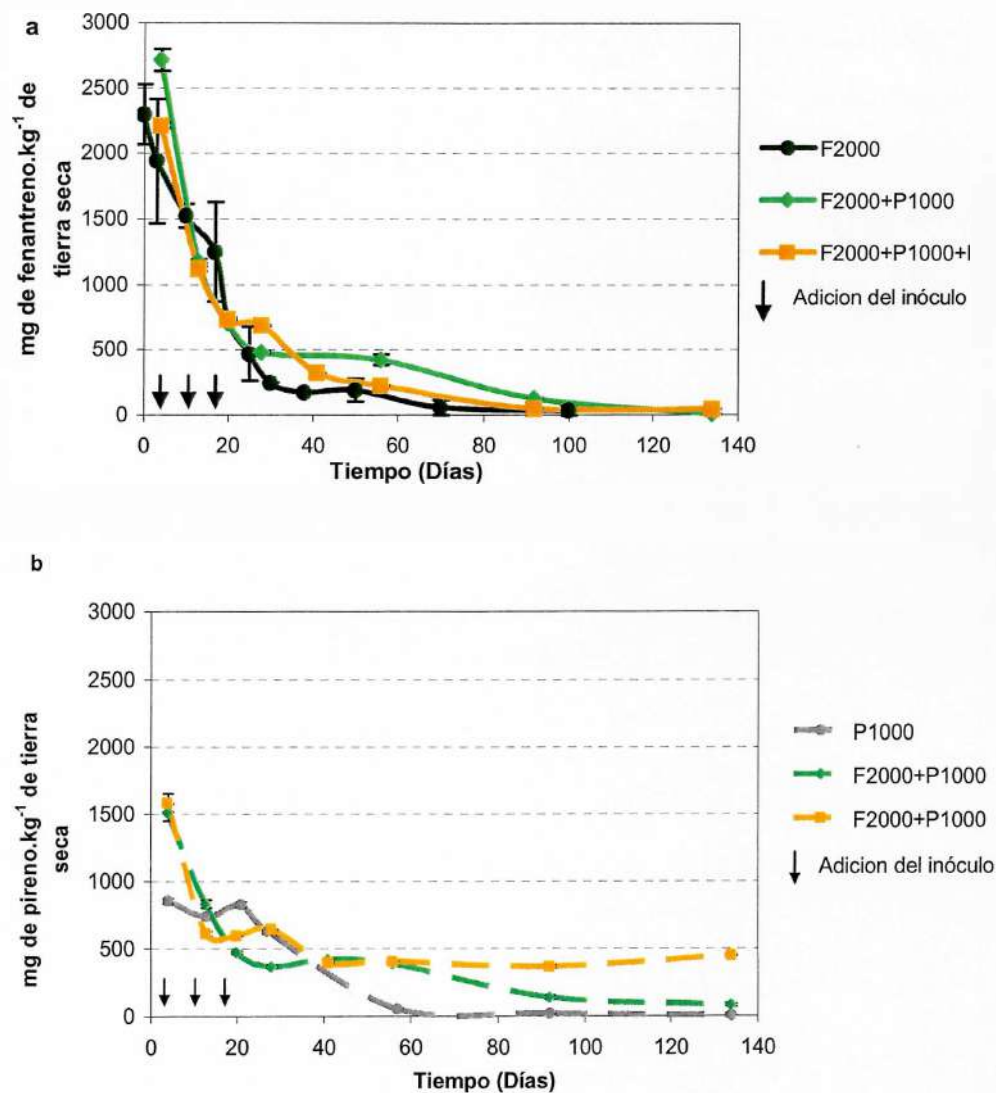


Figura VI.B-1: a) Concentración de Fenantreno en los microcosmos F2000, F2000+P1000 y F2000+P1000+I, durante el proceso de biorremediación
b) Concentración de Pireno en los microcosmos P1000, F2000+P1000 y F2000+P1000+I, durante el proceso de biorremediación. Se grafican los valores promedio de dos ensayos independientes y las desviaciones estándar de dos replicas por microcosmo

La inoculación no causó cambios significativos en la velocidad inicial de degradación de PAH, en relación al microcosmo F2000+P1000.

Microcosmo	Concentración de PAH a los 50 días de tratamiento	
	fenantreno (mg kg ⁻¹ de tierra seca)	pireno (mg kg ⁻¹ de tierra seca)
F2000	191 ± 88,6	--
P1000	--	55 ± 9,2
F2000+P1000	423 ± 41,2	399 ± 70,0
F2000+P1000+I	225 ± 61,5	406 ± 31,7

Tabla VI.B-1. Concentración de PAH en los microcosmos F2000, P1000, F2000+P1000 y F2000+P1000+I, luego de 50 días de tratamiento

Al igual que en el caso del sistema F2000+I (Sección VI.A), cuando la inoculación cesó (día 17) y hasta el día 30, se observó una interrupción en la eliminación de ambos hidrocarburos en el microcosmo F2000+P1000+I y como consecuencia se encontró una mayor concentración residual de fenantreno que en F2000+P1000. Luego el microcosmo inoculado presentó una segunda fase de eliminación de fenantreno, alcanzando niveles de fenantreno significativamente menores a los de F2000+P1000, el día 50 de tratamiento (Tabla VI.B-1).

Esta segunda fase de eliminación no fue observada en la degradación de pireno en F2000+P1000+I (Figura VI.B.1), encontrándose valores residuales superiores a los niveles estándares de limpieza para suelos al final del tratamiento, lo que estaría indicando que la inoculación afectó negativamente la degradación de pireno.

VI.B.2 Efecto de la inoculación sobre la dinámica y función de las comunidades microbianas durante el proceso de biorremediación

VI.B.2.i Efecto de la inoculación sobre la dinámica de las poblaciones microbianas cultivables

El efecto producido por el contaminante y por la inoculación sobre la comunidad del suelo se determinó analizando los cambios en la densidad de las poblaciones bacterianas heterótrofas cultivables en R2A, bacteriana degradadora de PAH y población fúngica (RB).

La figura VI.B-2 muestra la evolución de las poblaciones bacterianas heterótrofas cultivables determinadas por recuento en placas de R2A-agar, en los sistemas F2000, P1000, F2000+P1000 y F2000+P1000+I, y el control.

Los microcosmos contaminados mostraron recuentos de bacterias heterótrofas cultivables en R2A significativamente superiores a los del control durante todo el tratamiento no habiéndose observado diferencias significativas entre ellos, excepto con el microcosmo F2000+P1000+I que mostró recuentos de bacterias heterótrofas cultivables significativamente superiores a los encontrados en los microcosmos sin inocular durante los primeros 13 días de tratamiento.

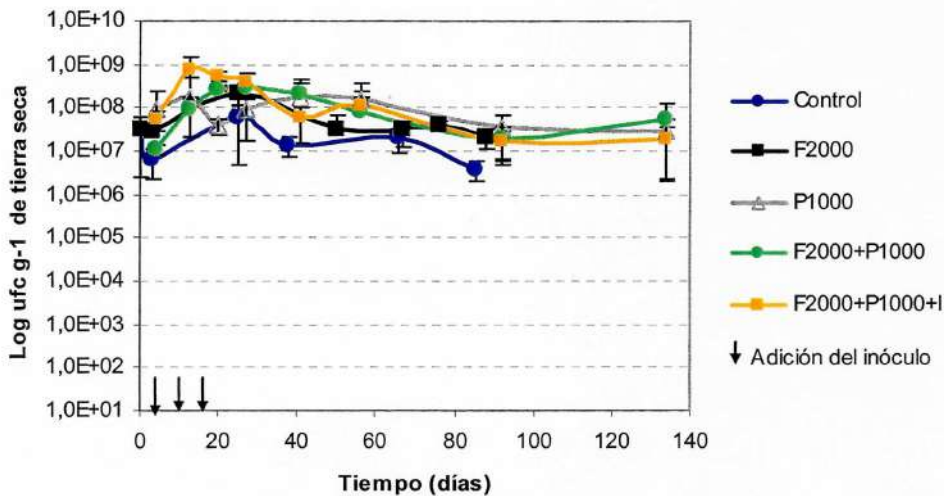


Figura VI.B-2: Recuento de poblaciones heterótrofas cultivables en los microcosmos Control, F2000, P1000, F2000+P1000 y F2000+P1000+I, durante el proceso de biorremediación. Se grafican los valores promedio de dos ensayos independientes y las desviaciones estándar de dos replicas por microcosmo

La evolución de las poblaciones degradadoras de PAH de cada microcosmo fue monitoreada durante todo el tratamiento utilizando el método del NMP. El número de poblaciones degradadoras de PAH en cada microcosmo se muestra en la figura VI.B-3.

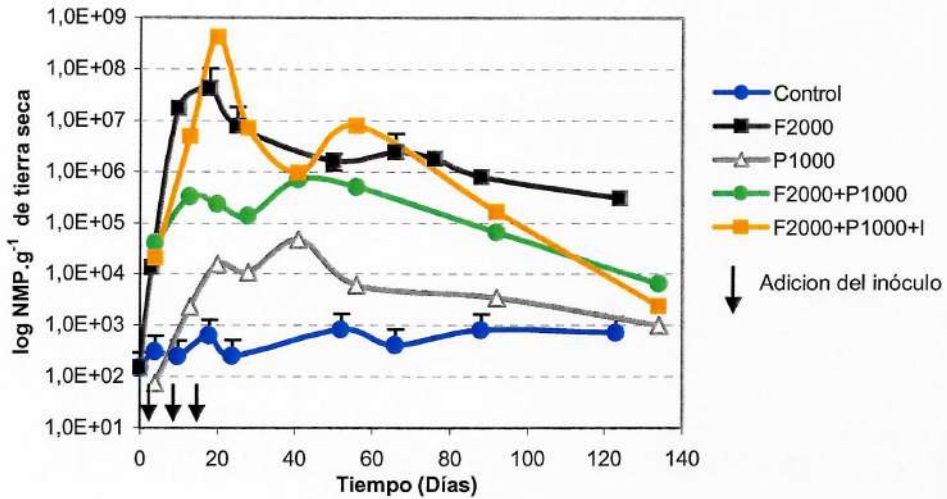


Figura VI.B-3: Recuento de poblaciones cultivables degradadoras de PAH en los microcosmos Control, F2000, P1000, F2000+P1000 y F2000+P1000+I, durante el proceso de biorremediación. Se grafican los valores promedio de dos ensayos independientes y las desviaciones estándar de dos réplicas por microcosmo

Puede observarse que en los microcosmos contaminados los recuentos de bacterias degradadoras de PAH fueron significativamente superiores a los encontrados en el microcosmo control durante todo tratamiento, con excepción del microcosmo P1000. La contaminación con pireno, en la concentración ensayada, causó un inicial efecto inhibitorio sobre las poblaciones degradadoras de PAH durante la primera semana de tratamiento (Fig. VI.B-3).

El efecto inhibitorio del pireno sobre las poblaciones degradadoras se observó también en el microcosmo F2000+P1000, que si bien mostró recuentos de poblaciones degradadoras de PAH mayores a los del microcosmo P1000, estos fueron significativamente menores a los del microcosmo F2000 (Fig. VI.B-3).

La inoculación con la cepa *S. paucimobilis* 20006FA logró aumentar significativamente el número de poblaciones degradadoras de PAH, con respecto al microcosmos F2000+P1000 (Fig. VI.B-3).

La evolución de las poblaciones fúngicas determinada por recuento placas de RB-agar, en los sistemas F2000, P1000, F2000+P1000 y F2000+P1000+I y el control a lo largo del tratamiento de biorremediación, se muestra en la a figura VI.B-4.

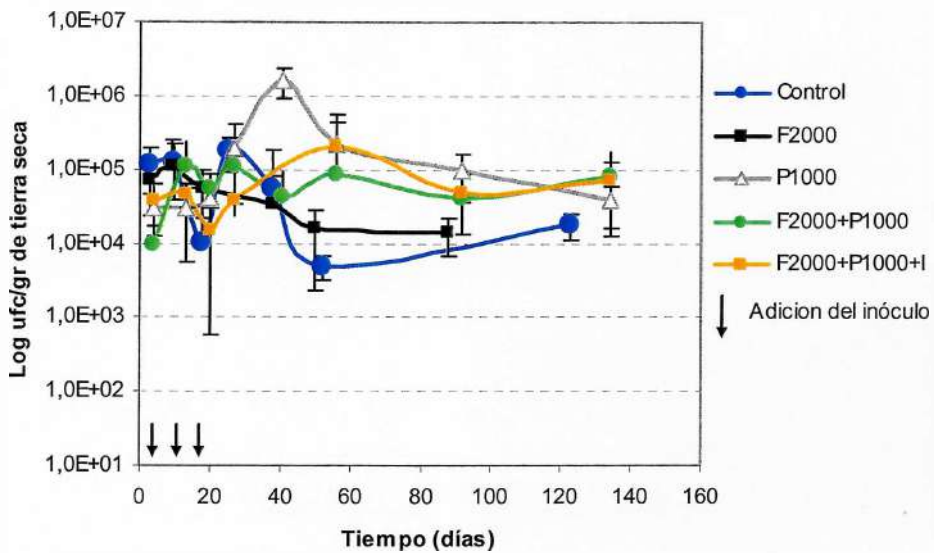


Figura VI.B-4: Evolución de la densidad de poblaciones fúngicas cultivables en los microcosmos Control, F2000, P1000, F2000+P1000 y F2000+P1000+I, durante el proceso de biorremediación. Se grafican los valores promedio de dos ensayos independientes y las desviaciones estándar de dos replicas por microcosmo

Las diferencias en el número de hongos en los microcosmos se hicieron evidentes solo después los 50 días de tratamiento, cuando los tres microcosmos contaminados con pireno mostraron recuentos de hongos superiores a los correspondientes al control y al microcosmo F2000. Estas diferencias desaparecieron al final del tratamiento

VI.B.2.ii Efecto de la inoculación sobre la actividad biológica de las comunidades microbianas

La actividad biológica de las comunidades microbianas presentes en cada microcosmo se determinó a través de la producción de CO₂ y de actividad deshidrogenasa que esta relacionada con la densidad de células viables y con su capacidad oxidativa.

VI.B.2.ii.a Actividad deshidrogenasa

La determinación de la actividad deshidrogenasa de la comunidad microbiana de los sistemas se realizó según el protocolo de Thalman (1968).

El día 20 de tratamiento todos los microcosmos contaminados mostraron un pico de actividad deshidrogenasa (Fig. VI.B-5). Nuevamente podemos observar un efecto inhibitorio en los microcosmos contaminados con pireno (P1000 y F2000+P1000), que mostraron valores de actividad deshidrogenasa significativamente menores a los encontrados en el microcosmo contaminado solo con fenantreno (F2000) (Fig. VI.B-5).

La inoculación (microcosmo F2000+P1000+I) logró aumentar significativamente la actividad deshidrogenasa, en comparación con el microcosmo F2000+P1000 (Fig. VI.B-5).

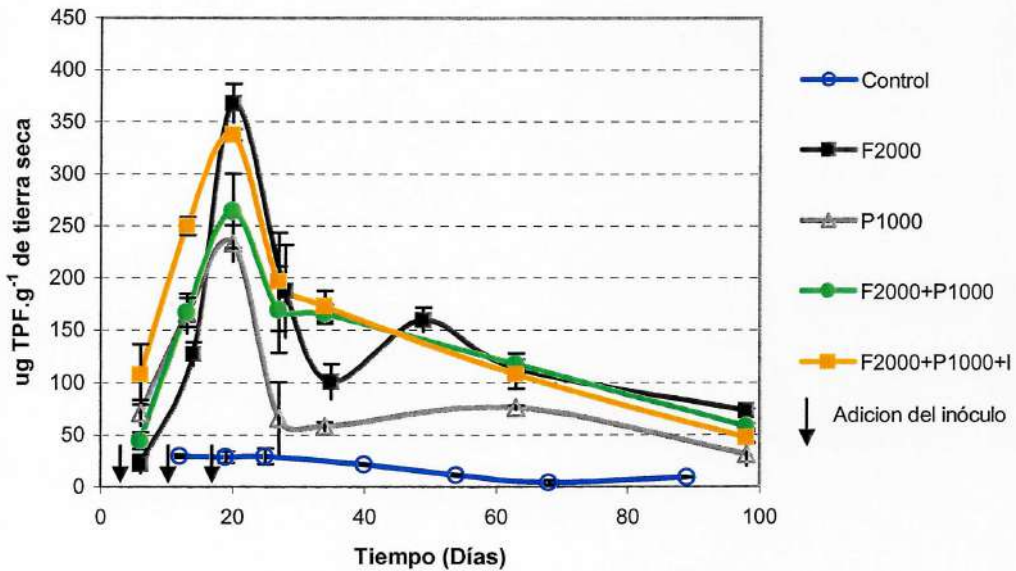


Figura VI.B-5: Actividad deshidrogenasa (μg de Trifenilformazán (TPF) por g de tierra seca) de los microcosmos Control, F2000, P1000, F2000+P1000 y F2000+P1000+I, durante el proceso de biorremediación. Se grafican los valores promedio de dos ensayos independientes y las desviaciones estándar de tres replicas por microcosmo

VI.B.2.ii.b Velocidad de producción de CO_2

La tasa respiratoria fue medida diariamente en biometers durante los primeros 48 días de tratamiento y expresada como producción de CO_2 por g de tierra seca por día (Fig. VI.B-6).

La mayoría de los sistemas mostraron la mayor producción diaria de CO_2 hacia el día 23 de tratamiento. Solo la adición conjunta de fenantreno y pireno resultó en un significativo incremento de la tasa de respiración total de la microflora del suelo en los microcosmos F2000+P1000 y F2000+P1000+I con respecto al control

El microcosmo P1000 mostró dos momentos de alta producción de CO_2 , alrededor de los 15 y de los 40 días de incubación.

Después de los 45 días la diferencia en la tasa de respiración de los microcosmos contaminados no fue significativamente diferente de la del microcosmo control.

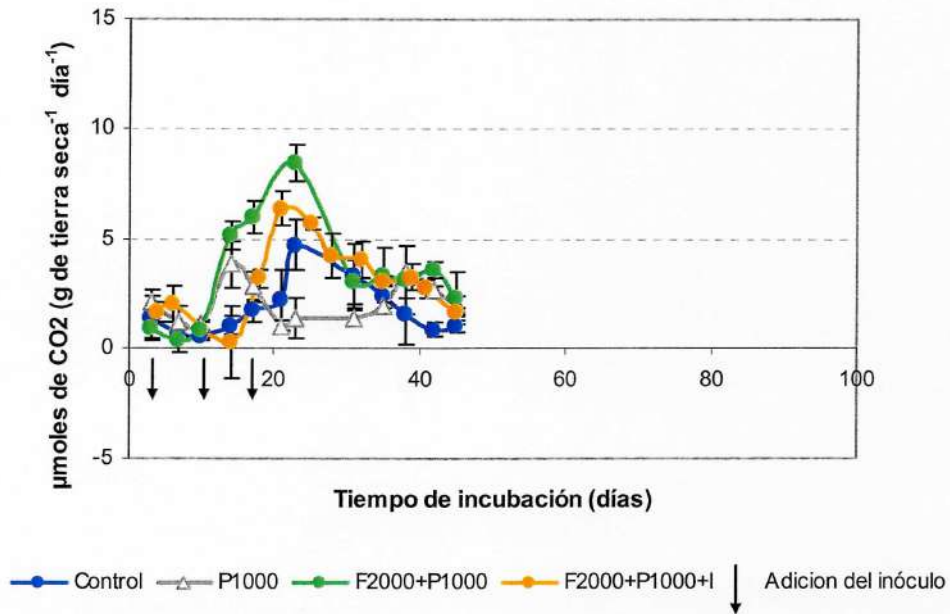


Figure VI.B- 6: Tasa de producción de CO₂ (µmoles de CO₂ por g de tierra seca por día) de los microcosmos Control, F2000, P1000, F2000+P1000 y F2000+P1000+I durante los primeros 48 días de tratamiento. Se grafican los valores promedio de tres ensayos independientes y las desviaciones estándar de dos replicas por microcosmo

VI.B.3 Efecto de la inoculación sobre la estructura de las comunidades microbianas durante el proceso de biorremediación

VI.B.3.i Diversidad funcional

Los perfiles fisiológicos de los microcosmos F2000, P1000, F2000+P1000, F2000+P1000+I y Control determinados por BIOLOG[®] ECOplate fueron analizados por el análisis de los componentes principales (PCA). La proyección de los componentes representativos para cada muestra en un grafico bidimensional permite la visualización de los cambios en la comunidad microbiana de suelo causados por la contaminación con fenantreno y pireno y por la inoculación con la cepa *S. paucimobilis* 20006FA (Fig. VI.B-7). El análisis estadístico por PCA de los datos indicó que los primeros dos componentes principales explican el 43.91% de la variabilidad total. Las fuentes de carbono con altos coeficientes de correlación para los componentes principales 1 (PC1) y 2 (PC2) se listan en la tabla VI.B-2.

Tabla VI.B-2: Sustratos con altos coeficientes de correlación para PC1 y PC2 en PCA de los perfiles de utilización de sustratos para los microcosmos F2000, P1000, F2000+P1000, F2000+P1000+I y Control

PC1 (31,97%)	R	PC2 (11,94%)	R
γ -hydroxybutyric acid	0.806	4-Hydroxy Benzoic Acid	0.611
Putrescine	0.768	Pyruvic acid methyl ester	-0.588
D, L- α -glycerol phosphate	0.742	Glycogen	-0.555
β -methyl-D-glucoside	0.724		
Glycyl-L-glutamic acid	0.700		
L-threonine	0.684		
L-erythritol	0.658		
L-arginine	0.633		
Pyruvic Acid Methyl Ester	0.633		
Phenylethylamine	0.632		
L-phenylalanine	0.630		
L-serine	0.595		
D-galacturonic acid	0.572		
D-Cellobiose	0.568		
L-asparagine	0.564		
Glucose-1-phosphate	0.564		
N-acetyl-D-glucosamine	0.563		

Luego de 13 días de tratamiento los microcosmos contaminados no mostraron diferencias significativas con el control, en los valores en PC1 y PC2, mostrando una alta capacidad catabólica (Fig VI.A-7). Mientras que el microcosmo F2000+P1000+I mostró un corrimiento a valores negativos de PC1, revelando una capacidad catabólica mas baja (el mismo efecto fue observado en el sistema F2000+I (Sección VI.A)). Esto podría deberse, como se dijo mas arriba, a la dominancia temporal de *S. paucimobilis* 20006FA, provocada por las sucesivas inoculaciones durante los primeros 17 días de tratamiento.

Hacia el final del experimento, a los 127 días, todos los microcosmos contaminados, incluido el inoculado, no mostraron diferencias entre sí, pero permanecieron las diferencias significativas con el microcosmo control en PC1 y PC2. De modo que la modificación en la diversidad catabólica de la comunidad microbiana producida por la contaminación con los PAH persiste aún cuando los niveles de hidrocarburos se reducen significativamente.

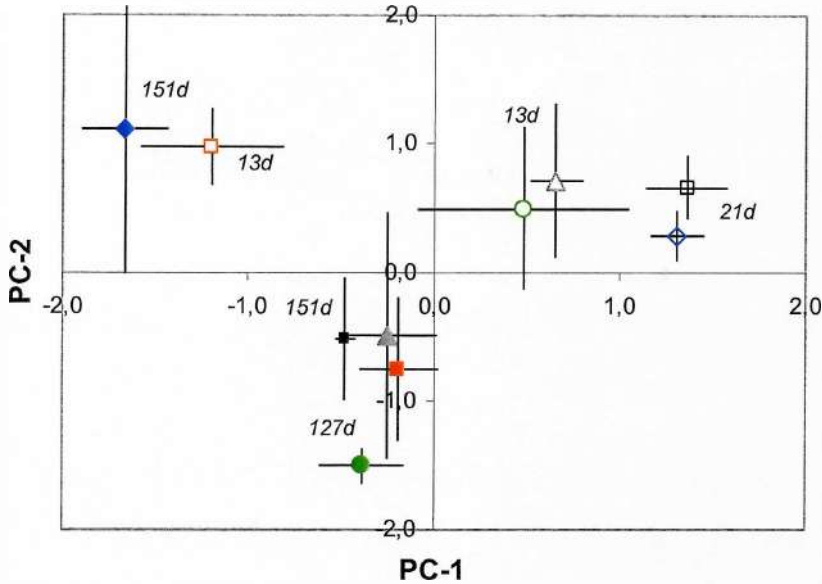


Figura VI.B-7: Valores del análisis de los componentes principales de datos de los patrones de utilización de sustratos de las comunidades microbianas de varios microcosmos F2000, P1000, F2000+P1000, F2000+P1000+I y Control (Ecoplate Biolog®). Los valores representan los promedios de tres replicas por microcosmo

El estudio de las comunidades a través de los perfiles metabólicos de sus cultivos predominantes, ha indicado que el proceso de biorremediación conduce al establecimiento de comunidades semejantes en cuanto a sus diversidades catabólicas pero diferentes de la comunidad dominante del suelo limpio.

VI.B.3.ii Diversidad genética

El análisis de la estructura de las comunidades bacterianas de los distintos microcosmos se realizó por PCR-DGGE. Esta metodología se aplicó sobre los extractos purificados de DNA total obtenidos directamente de los microcosmos de suelo, en distintos momentos durante el proceso de biorremediación.

Los cambios en los patrones de DNA obtenidos por DGGE de los productos PCR del DNA total de la comunidad de cada microcosmo se muestran en la figura VI.B-8.

Se pueden observar claras diferencias entre los patrones de bandas de los distintos microcosmos (Fig.VI.B-8), demostrando que las distintas contaminaciones originaron comunidades bacterianas diferentes. Sin embargo fue posible observar bandas comunes entre algunos microcosmos (la banda A en los microcosmos F2000 y F2000+P1000).

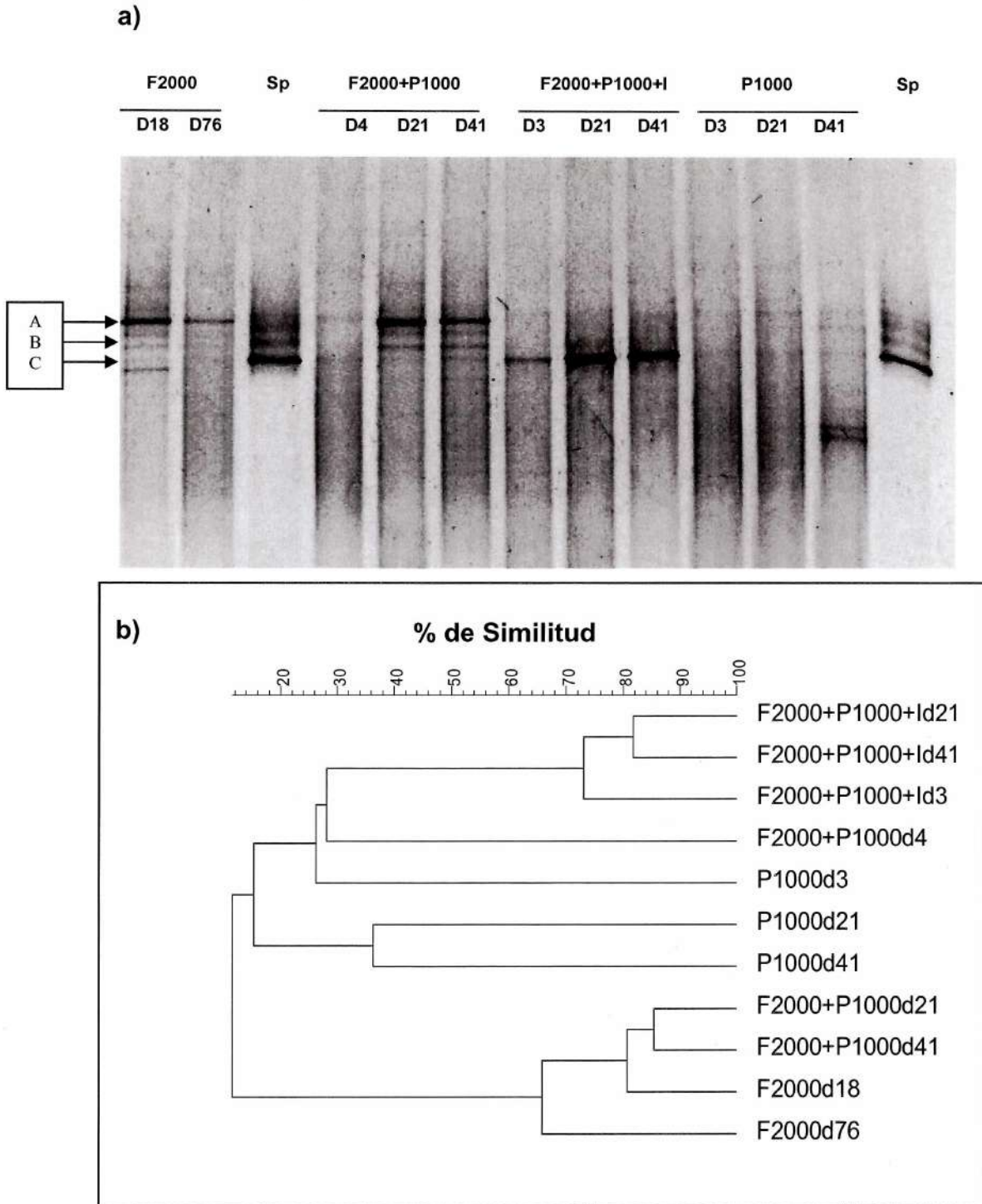


Figura VI.B-8: a) Análisis por PCR-DGGE de las poblaciones bacterianas de los microcosmos F2000, P1000, F2000+P1000 y F2000+P1000+I, durante 41 días del proceso de biorremediación Sp: *S. paucimobilis* 20006FA.

b) Dendrograma de los clusters basados en los patrones de bandas de la DGGE y calculados utilizando la correlación de Pearson y el análisis UPGMA. Las diferencias entre los perfiles se indican por porcentaje de similitud.

El patrón de bandas del microcosmo F2000+P1000+I mostró una marcada dominancia de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA desde el comienzo del experimento (día 3) con una significativa reducción en el número de bandas, en comparación con el perfil obtenido con el microcosmo F2000+P1000, esto también fue observado en el microcosmo inoculado y contaminado con fenantreno (Sección VI.A).

También aquí pudo observarse el efecto inhibitorio del pireno sobre la comunidad, especialmente en el microcosmo P1000, donde se puede ver que la aparición de bandas definidas, típicas de sistemas con alta actividad microbiana (Nakatsu, 2005) ocurrió hacia el día 41 de incubación (esto coincide con la fase de mayor velocidad de eliminación de pireno), mucho más tarde que en los otros microcosmos.

La figura VI.B-8b muestra el dendrograma del análisis UPGMA de los perfiles DGGE, en ella se puede apreciar la formación de dos clusters con menos de 10% de similitud. El mayor de estos clusters incluye los perfiles obtenidos con las muestras del microcosmo P1000 y del microcosmo F2000+P1000+I durante todo el tratamiento. El otro pequeño cluster incluye los perfiles de la comunidad microbiana del microcosmo F2000 y el microcosmo F2000+P1000.

Dentro del primer cluster los perfiles de bandas de todas las muestras del microcosmo F2000+P1000+I formaron un subcluster con más del 70 % de similitud entre ellas.

El cluster más pequeño incluye a los sistemas que contienen fenantreno (con o sin pireno) y no han sido inoculados. Fundamentalmente estos sistemas parecieran compartir una banda de gran intensidad (Banda A) que es seleccionada por la presencia de fenantreno.

La estrategia de inoculación utilizada en este experimento redujo significativamente el número de bandas presentes en la DGGE obteniéndose una banda predominante y prácticamente única que se correspondió con la de la cepa inoculada y que dio lugar al alto porcentaje de similitud entre los sistemas inoculados.

VI.B.4 Discusión

En la mayoría de los casos los suelos son contaminados con mezclas de PAH. En esos casos la biodisponibilidad y la biodegradación claramente depende de los co-contaminantes (Berthe-Corti y col., 2007).

El cometabolismo y los fenómenos competencia metabólica han sido estudiados con cepas puras y en consorcios bacterianos (Bouchez y col., 1995). La coordinación de los metabolismos bacterianos produce interacciones comensales y permite actividades metabólicas que no son posibles a través del metabolismo de una sola especie. Las interacciones microbianas parecen no solo producir efectos positivos. Hay evidencias de que

ciertos hidrocarburos de hasta tres anillos tienen efecto inhibitorio sobre la degradación de los PAH de alto peso molecular (Leahy y col., 1990; Bouchez y col., 1995).

Uno de los objetivos del presente trabajo fue estudiar el efecto de la contaminación con una mezcla de un PAH de bajo peso molecular (fenantreno) y otro PAH de alto peso molecular y por lo tanto más recalcitrante (pireno), sobre la estructura de la comunidad microbiana del suelo y sobre la biodegradación de los mismos, comparativamente con los resultados obtenidos en microcosmos contaminados con un solo PAH.

Los dos PAH mostraron una significativa eliminación en 140 días de tratamiento, cuando fueron incorporados separadamente. Sin embargo, la contaminación con fenantreno indujo una mayor respuesta de la comunidad microbiana, tanto a nivel de cultivables (Fig. VI.B.3) como de no cultivables (actividad biológica) (Fig. VI.B-5). A si mismo fue posible observar un inicial efecto inhibitorio sobre la comunidad causado por la contaminación con pireno (Fig. VI.B-3).

Los resultados del microcosmo F2000+P1000 permitieron observar que, a pesar de producirse una respuesta menor de la comunidad microbiana (Fig.VI.B- 3 y VI.B-5), en comparación con el microcosmo F2000, las curvas de eliminación de PAH del microcosmo F2000+P1000 mostraron una mayor pendiente inicial (Fig. VI.B-1). Esto podría explicarse a través de reacciones cometabólicas, ya que todos los sustratos fueron degradados mas rápido en mezclas que cuando fueron adicionados separadamente. El mismo efecto fue observado cuando se estudió la mineralización de la mezcla fenantreno-pireno en biorreactores líquidos (Cap. IV), donde se obtuvo mayor producción de CO₂ en el biorreactor que contenía la mezcla con respecto a los biorreactores que contenían solo un PAH (Fig. IV-7).

El aumento en los valores residuales de PAH encontrado en el microcosmo F2000+P1000 (Tabla VI.B-1), en comparación con los microcosmos contaminados sólo con un PAH podría explicarse por el impacto sobre la comunidad microbiana, no solo a nivel cuantitativo (Fig. VI.B-3 y VI.B-5) sino cualitativo (Fig. VI.B-7), causado por la contaminación con ambos PAH, el enriquecimiento relativo en el PAH más recalcitrante (Tabla VI.B-1) y la posible acumulación de productos de degradación.

La fácil degradación de un PAH mas soluble podría reprimir enzimas para PAH de mayor PM produciendo una fase de latencia, o removiendo metabolitos tales como el salicilato que induce otras vías, produciendo cometabolismo.

Todos los análisis estuvieron basados en la desaparición de los PAH, por lo tanto, no se determino mineralización de los diferentes compuestos.

Se conoce que cambios en la biodisponibilidad de los PAH, enriquecimiento en PAH más recalcitrantes y el turnover de metabolitos que ocurre durante el envejecimiento de suelos contaminados ejerce una presión selectiva sobre la comunidad microbiana del suelo. Esto causa una pronunciada dinámica en la composición de la comunidad (Del Panno y col., 2005; Viñas y col., 2005).

Los hallazgos de Kazunga (2000) sugieren que los productos derivados de la transformación de pireno tienen el potencial de acumularse en los sistemas contaminados con PAH y tales productos pueden influenciar significativamente la remoción de otros PAH. Sin embargo, esos productos podrían ser susceptibles de una degradación subsiguiente por organismos capaces de metabolizar pireno más extensivamente si esos microorganismos estuvieran presentes en el sistema.

En suelo limpio adicionado solo con pireno (P1000), la degradación de pireno mostró una fase de latencia de 20 días (Fig. VI-B.1,b). Como fue descrito por Johnsen y Karlson (2005) la más lenta degradación de pireno en el microcosmo P1000 comparada con la de fenantreno en el sistema F2000 (Fig. V.B-1 a y b) fue probablemente debida a el menor número inicial de microorganismos degradadores de pireno (Fig. VI.B-3) en combinación con la menor bioaccesibilidad del pireno. Como el log de Kow (coef de partición fase org-acuosa) es más alto que el de fenantreno (5.18 vs 4.57 (Miller y col., 1985), se espera que una mayor fracción del pireno se adsorba en a la materia orgánica del suelo. También, la solubilidad del pireno es menor (0.135 vs 1.18 mg L⁻¹), retardando así el transporte difusivo del pireno en suelo con bajo contenido en materia orgánica. Entonces, una fuerte sorción y bajas tasas de difusión limitan el flujo del pireno a las células degradadoras de pireno, conduciendo a menos células degradadoras, más lentas en crecimiento y con menores tasas de mineralización. Otra razón de la lenta biodegradación del pireno podría ser la lenta inducción de enzimas para su metabolismo (Lotfabad 2002).

Molina (1999) observó que la presencia de fenantreno puede afectar la degradación de pireno, sugiriendo que el pireno puede ser degradado por una vía común o por una misma cepa en un cultivo. Esto explicaría la mayor velocidad de deg de pireno cuando el fenantreno esta presente, ya que el fenantreno podría estar induciendo más rápidamente ciertas enzimas que permiten el metabolismo de ambos compuestos.

La inoculación con la cepa de *S. paucimobilis* 20006FA, degradadora de fenantreno, en un microcosmo contaminado con ambos PAH (F2000+P1000+I), produjo una recuperación parcial de las poblaciones microbianas degradadoras de hidrocarburos y la actividad dehidrogenasa y una disminución significativa de la concentración residual de fenantreno (Tabla VI.B-1), con respecto al microcosmo F2000+P1000.

Interesantemente la degradación de pireno fue menor en el microcosmo que había sido inoculado con la cepa, posiblemente sugiriendo que *S. paucimobilis* 20006FA puede estar desplazando o inhibiendo degradadores nativos de PAH. De modo que el fuerte impacto negativo sobre la degradación de pireno producido por la inoculación (Fig. VI.B-1 y Tabla VI.B-1) podría atribuirse a la pérdida de la diversidad microbiana observada en el patrón de bandas de DNA correspondiente al microcosmo F2000+P1000+I (Fig. VI.B-7).

La comunidad del sistema inoculado mostró preferencia por los PAH de 3 anillos en comparación a los de 4 anillos, menos solubles, lo que es consistente con estudios de aislados bacterianos en mezclas (Stringfellow y Aitken 1995).

La composición y actividad de las comunidades microbianas degradadoras de PAH dependen no solo de la composición inicial de la comunidad y las condiciones ambientales, sino también de la mezcla de PAH (Leahy y col., 1990; Bouchez y col., 1995).

El efecto inhibitorio del pireno observado sobre la estructura (Fig. VI.B-8) y función (Fig. VI.B-5) de la comunidad microbiana de suelo en P1000 y F2000+P1000 puede deberse a la producción de metabolitos que resultan tóxicos para las cepas presentes en suelo o a que estas no son capaces de producir la subsiguiente degradación.

La incompleta degradación y acumulación de metabolitos es frecuente en PAH de alto peso molecular (Berte-Corti y col., 2007).

La oxidación aeróbica bacteriana es el principal proceso involucrado en la remoción de PAH (Cerniglia 1992). La tasa y grado de biodegradación depende de la presencia de microorganismos capaces de metabolizar o biotransformar estos compuestos orgánicos y del número de anillos bencenos condensados que tenga el contaminante (Gilewicz y col., 1997).

En este capítulo se demostró que la cepa en estudio se establece en suelo contaminado sin embargo no pudo observarse el favorecimiento de la degradación de fenantreno y pireno.

A grayscale micrograph showing a dense field of biological cells. The cells are mostly oval or elongated in shape, with some showing internal structures like nuclei. The background is dark, and the cells are lighter, creating a textured appearance.

CAPITULO VII

CONCLUSIONES

VII. Conclusiones

En los últimos tiempos con el objetivo de estudiar el modo de mejorar la degradación de los PAH en ambientes naturales, se están haciendo considerables esfuerzos enfocados en el aislamiento de microorganismos capaces de degradarlos. La biorremediación, basada en ciertas especies de microorganismos, es un modo económico y efectivo de decontaminar suelos contaminados con hidrocarburos (Zhao y col., 2007).

Retomando las cuestiones planteadas en la introducción de este trabajo respecto de las consideraciones a tener en cuenta en la selección y aplicación de inoculantes en suelos contaminados con PAH, fue planteado un estudio polifásico, donde fueron aplicadas una gran diversidad de técnicas para estudiar las propiedades metabólicas y ecológicas de la bacteria seleccionada para ser utilizada como inoculante. Así mismo se estudió la efectividad de la cepa seleccionada sobre la biodegradación y el impacto de la inoculación sobre la comunidad microbiana del suelo, sobre suelos contaminados con PAH puros y mezclas en distintos sistemas: biorreactores y microcosmos.

Durante la selección de bacterias degradadoras de PAH y el estudio de sus propiedades metabólicas y ecológicas:

- ❖ Se logró aislar a partir de suelos contaminados con fenantreno la cepa de *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA, la cual posee un amplio espectro degradador de PAH (antraceno, dibenzotiofeno y fenantreno).
- ❖ Se demostró que la cepa es capaz de crecer utilizando fenantreno como única fuente de carbono y energía, produciendo la mineralización parcial del mismo. Se encontró que la capacidad degradadora de fenantreno es estable en el tiempo y que la cepa posee enzimas dioxigenasas constitutivas. Adicionalmente durante el crecimiento en fenantreno se observaron productos coloreados que corresponden a la producción y transitoria acumulación de productos de degradación de fenantreno.

- ❖ La cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA no es capaz de crecer utilizando ninguno de los sustratos incluidos en el análisis ECOplate, que contiene distintas fuentes de carbono consideradas ambientalmente relevantes, sin embargo es capaz de crecer utilizando fenantreno, pireno y salicilato como única fuente de carbono y energía lo que demuestra que se trata de una cepa PAH-especialista.
- ❖ Se ha demostrado que la cepa aislada posee alta similitud con otras seis cepas degradadoras de PAH, pertenecientes al género *Sphingomonas*, ninguna de las cuales ha sido profundamente caracterizadas hasta el momento.
- ❖ Se demostró que la cepa de *S. paucimobilis* 20006FA exhibe dos mecanismos claramente diferentes para favorecer la biodisponibilidad del fenantreno: la excreción de biosurfactantes y la adhesión de fenantreno a los cristales. Hasta ahora si bien se había demostrado que las cepas de *Sphingomonas* degradan PAH a una velocidad mayor que la explicable por desorción de la matriz orgánica del suelo y por su velocidad de disolución, no había sido hallado el mecanismo por el cual se favorecería la biodisponibilidad de los PAH (Uytterbroek y col., 2006). Este es el primer trabajo que ha demostrado que una cepa de *Sphingomonas* aislada a partir de suelo (*S. paucimobilis* 20006FA) exhibe un mecanismo para favorecer la biodisponibilidad de los PAH mediante la producción de biosurfactantes.
- ❖ Se demostró que las células de *S. paucimobilis* 20006FA en cultivos jóvenes en fenantreno se adhieren a la superficie de los cristales mediante delgados filamentos, los cuales conectan las células muy cercanamente al sustrato. Con el aumento del tiempo de incubación, esos filamentos forman una red conectando más células entre sí y a la superficie de los cristales. Este es el primer trabajo que ha demostrado que una cepa de *Sphingomonas* (*S. paucimobilis* 20006FA) es capaz de adherirse a cristales de fenantreno, es capaz de proliferar sobre la superficie de los cristales y finalmente producir biofilms en forma de parches. Algunos autores han estudiado la formación de biofilms por *Sphingomonas* (Venugopalan y col., 2005; Cunliffe y Kertesz, 2006a) pero ninguno pudo observar la adhesión de células individuales a los cristales.

Durante la evaluación de la efectividad de las estrategias de bioaumentación de suelos contaminados con PAH:

❖ Se ha observado que las diferentes estrategias de inoculación utilizadas (en biorreactores y microcosmos de suelo) estimularon la eliminación de fenantreno durante los primeros días del período de incubación.

❖ Se logró determinar la capacidad de la cepa de establecerse en suelos recientemente contaminados con hidrocarburos. Utilizando FISH fue posible determinar que la estrategia de única inoculación utilizada en los biorreactores de suelo estableció un predominio del género *Sphingomonas* en los biorreactores inoculados. Por otra parte el estudio del perfil de la comunidad microbiana de los microcosmos inoculados con la cepa *S. paucimobilis* 20006FA, realizado mediante PCR-DGGE, permitió observar una clara predominancia de la cepa inoculada desde la primera inoculación. La clara predominancia de la cepa junto a la menor diversidad funcional indicó que se produjo un rápido establecimiento de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA asociada con un abrupto cambio en la composición de la comunidad bacteriana del suelo.

❖ Se ha demostrado que la cepa inoculada se mantiene metabólicamente activa durante el período de mayor velocidad de eliminación de PAH. Esto fue demostrado mediante la hibridación por FISH y mediante la observación de que la mayor eliminación de PAH concuerda, en los sistemas inoculados (biorreactores y microcosmos), con el incremento en la actividad biológica y en el número de bacterias heterótrofas cultivables y de bacterias degradadoras de PAH.

❖ Durante el estudio de los mecanismos de adhesión de la cepa en MML + suelo autoclavado contaminado con fenantreno se ha logrado demostrar que la cepa *S. paucimobilis* 20006FA es capaz de producir una sustancia extracelular desde las 2 h de incubación, en forma de finos filamentos, que permite la adhesión de las células a las partículas de suelo contaminado y a tiempos de incubación más largos las células se agregan sobre las partículas de suelo dando lugar a la formación de un biofilm.

❖ El estudio de la comunidad de suelo contaminado con fenantreno sin inocular permitió observar la aparición de una banda de DNA que podría corresponder a la cepa *S. paucimobilis* 20006FA, esto refuerza el hecho de que esta cepa podría estar jugando un rol importante en la colonización y biorremediación de suelos contaminados con fenantreno.

❖ La estrategia de múltiples inoculaciones produjo un fuerte impacto sobre la diversidad genética (PCR-DGGE) y funcional (Biolog Ecoplate) de la comunidad del suelo. La incorporación del inóculo redujo notablemente la diversidad microbiana del suelo y el estudio de la actividad biológica permitió observar que en los microcosmos inoculados existió un disturbio de la comunidad bacteriana del suelo que produjo la detención en la eliminación de fenantreno probablemente porque los microorganismos capaces de completar la vía catabólica del fenantreno no fueron seleccionadas oportunamente.

❖ Se han encontrado indicios, a través de la presencia de la banda de DNA correspondiente a la cepa en los perfiles PCR-DGGE del microcosmo inoculado, que la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA se establece y permanece como población mayoritaria dentro de la comunidad microbiana del suelo aún después de que el fenantreno fue eliminado,

❖ Se observó un impacto a largo plazo de la contaminación con fenantreno sobre la diversidad genética y funcional de las comunidades bacterianas de suelo que podría ser atribuido a la presión selectiva ejercida por el fenantreno residual y sus metabolitos. Se determinó que la estrategia de bioaumento no logró revertir el efecto tardío sobre los cambios sobre la estructura de la comunidad microbiana de suelo producidos por el contaminante.

❖ En los sistemas contaminados con fenantreno y pireno se demostró que la inoculación con la cepa de *S. paucimobilis* 20006FA logró producir la recuperación parcial de las poblaciones microbianas degradadoras de hidrocarburos y de la actividad deshidrogenada así como una disminución significativa de la concentración residual de fenantreno. Así mismo se produjo un fuerte impacto negativo sobre la degradación de pireno producido por la inoculación que podría atribuirse a la pérdida de la diversidad microbiana observada en el patrón de bandas de DNA del gel de DGGE.

CAPITULO VIII

BIBLIOGRAFIA

VIII. Bibliografía

- Abbondanzi F, Bruzzi L, Campisi T, Frezzati A, Guerra R, Iancodini A (2006) Biotreatability of polycyclic aromatic hydrocarbons in brackish sediments: preliminary studies of an integrated monitoring. *International Biodeterioration & Biodegradation* 57: 214-221.
- Adachi K, Iwabuchi T, Sano H, Harayama S (1999) Structure of the ring cleavage product of 1-hydroxy-2-naphthoate, an intermediate of the phenanthrene-degradative pathway of *Nocardioides* sp. strain KP7. *J Bacteriol* 181:757-763
- Ahimou F, Jacques P, Deleu M (2000) Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme Microb Technol* 27:749-754
- Alexander M (2000) Aging, Bioavailability, and Overestimation of Risk from Environmental Pollutants. *J Environ. Sci. Technol* 34: 4259-4265
- Allard AS, Remberger M, Neilson AH (2000) The negative impact of aging on the loss of PAH components in a creosote-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation* 46: 43-49
- Amann RI, Krumholz L, Stahl DA (1990) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J Bacteriol* 172:762-770
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59:143-169
- Andreoni V, Cavalca L, Rao MA, Nocerino G, Bernasconi S, Dell'Amico E, Colombo M, Gianfreda L (2004) Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. *Chemosphere* 57:401-412
- Atagana H I (2006) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soil by biostimulation and bioaugmentation in the presence of copper(II) ions. *World J. Microbiol Biotechnol* 22:1145-1153
- Atlas R, Batha R (1998) *Microbial Ecology: Fundamental and Applications*. Ed: Atlas and Bartha. Benjamin/Cummings Publishing Company Inc California
- Azeredo J, Oliveira R (2000) The role of exopolymers produced by *Sphingomonas paucimobilis* in biofilm formation and composition. *Biofouling* 16: 17-27
- Balashova NV, Stolz A, Knackmuss HJ, Kosheleva IA, Naumov AV, Boronin AM (2001) Purification and characterization of a salicylate hydroxylase involved in 1-hydroxy-2-naphthoic acid hydroxylation from the naphthalene and phenanthrene-degrading bacterial strain *Pseudomonas putida* BS202-P1. *Biodegradation* 12:179-188
- Balkwill DL et al. (1997) Taxonomic study of aromatic-degrading bacteria from deep-terrestrial-subsurface sediments and description of *Sphingomonas aromaticivorans* sp. nov., *Sphingomonas subterranea* sp. nov., and *Sphingomonas stygia* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 47:191-201
- Baptista JS, Cammarota MC, Freire D (2005) Production of CO₂ in crude oil bioremediation in clay soil. *Brazilian archives of biology and technology* 48:249-225
- Baran S, Bielińska J, Oleszczuk P (2004) Enzymatic activity in an airfield soil polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Geoderma* 118:221-232
- Barkay T, Shearer DF, Olson BH (1986) Toxicity testing in soil using microorganisms. 147 En: *Toxicity testing using microorganisms Vol II* Ed Dutka and Bitton CRC Press, Inc Florida
- Bartha R, Pramer D (1965) Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticide in soil. *Soil Sci* 100:68-70

- Basta T, Keck A, Klein J, Stolz A (2004) Detection and characterization of conjugative degradative plasmids in xenobiotic-degrading *Sphingomonas* strains. *J Bacteriol* 186:3862-3872
- Bastiaens L, Springael D, Wattiau P, Harms H, deWachter R, Verachtert H, Diels L (2000) Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. *Appl Environ Microbiol* 66:1834-1843
- Beal R, Betts WB (2000) Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol* 89:158-168
- Beech IB, Zinkevich V, Tapper R, Gubner R, Avci R (1999) Study of the interaction of sulphate-reducing bacteria exopolymers with iron using X-ray photoelectron spectroscopy and time-of-flight secondary ionisation mass spectrometry. *J Microbiol Methods* 36:3-10
- Belotte D, Curien JB, Maclean RC, Bell G (2003) An experimental test of local adaptation in soil bacteria. *Evolution Int J Org Evolution* 57:27-36
- Berthe-Corti L, Hulsch R, Del Panno MT, Morelli IS (2007) Bioremediation and bioaugmentation of soils contaminated with polyaromatic hydrocarbons. *Current trends in Microbiology En prensa*
- Betancur-Galvis LA, Alvarez-Bernal D, Ramos-Valdivia AC, Dendooven L (2006) Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated saline-alkaline soils of the former Lake Texcoco. *Chemosphere* 62:1749-1760
- Blumenroth P, Wagner-Döbler I (1997) Survival of inoculants in polluted sediments: Effect of strain origin and carbon source competition. *Microbial Ecology* 35: 279-288
- Blumer M (1976) Polycyclic aromatic compounds in nature. *Sci Am* 234:35-45
- Bodour AA, Wang JM, Brusseau ML, Maier RM (2003) Temporal change in culturable phenanthrene degraders in response to long-term exposure to phenanthrene in a soil column system. *Environ Microbiol* 5:888-895
- Bogan BW, Lamar RT, Burgos WD, Tien M (1999) Extent of humification on anthracene, fluoranthene, and benzo[α]pyrene by *Pleurotus ostreatus* during growth in PAH-contaminated soils. *Letters in Applied Microbiology* 28: 250-254
- Bogardt AH, Hemmingsen BB (1992) Enumeration of phenanthrene-degrading bacteria by an overlayer technique and its use in evaluation of petroleum-contaminated sites. *Appl Environ Microbiol* 58:2579-2582
- Boonchan S, Britz ML, Stanley GA (2000) Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Appl Environ Microbiol* 66:1007-1019
- Bordas F, Lafrance P, Villemur R (2005) Conditions for effective removal of pyrene from an artificially contaminated soil using *Pseudomonas aeruginosa* 57SJ rhamnolipids. *Environ Pollut* 138:69-76
- Bos RP, Hulshof CT, Theuvs JL, Henderson PT (1983) Mutagenicity of creosote in the Salmonella/microsome assay. *Mutat Res* 119:21-25
- Bouchez M, Blanchet D, Bardin V, Haeseler F, Vandecasteele JP (1999) Efficiency of defined strains and of soil consortia in the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) mixtures. *Biodegradation* 10:429-435
- Bouchez M, Blanchet D, Vandecasteele JP (1995) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. *Appl Microbiol Biotechnol* 43:156-164
- Brandt CA, Becker JM, Porta A (2002) Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils and terrestrial biota after a spill of crude oil in Trecate, Italy. *Environ Toxicol Chem* 21:1638-1643
- Bruns A, Berthe-Corti L (1998) In situ detection of bacteria in continuous-flow cultures of seawater sediment suspensions with fluorescently labelled rRNA-directed oligonucleotide probes. *Microbiology* 144 (Pt 10):2783-2790

- Canway CP, Nelson LM (1990) Field and laboratory studies of *Triticum aestivum* L inoculated with co-existent growth-promoting *Bacillus* strains. *Soil Biol. Biochem* 22:789-795
- Cavalca L, Colombo M, Larcher S, Gigliotti C, Collina E, Andreoni V (2002) Survival and naphthalene-degrading activity of *Rhodococcus* sp. strain 1BN in soil microcosm. *Journal of Applied Microbiology* 92: 1058-1065
- Cerniglia CE, Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon. *Biodegradation* 3:351-368
- Chao WL, Hsu SF (2004) Response of the soil bacterial community to the addition of toluene and toluene-degrading bacteria. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 479-487
- Chiou CT, McGroddy SE, Kile DE (1998) Partition Characteristics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Soils and Sediments. *J Environ. Sci. Technol* 32:264-269
- Churchill SA, Harper JP, Churchill PF (1999) Isolation and characterization of a *Mycobacterium* species capable of degrading three- and four-ring aromatic and aliphatic hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol* 65:549-552
- Colores GM, Schmidt SK (1999) Colonization of contaminated soil by an introduced bacterium: effects of initial pentachlorophenol levels on the survival of *Sphingomonas chlorophenolica* strain RA2. *J Ind Microbiol Biotechnol* 23:326-331
- Copley J (2000) Ecology goes underground. *Nature* 406:452-454
- Crawford R et al. (2002) Measurement of microbial activity in soil by colorimetric observation of in situ dye reduction: an approach to detection of extraterrestrial life. *BMC Microbiol* 2:22
- Cunliffe M, Kertesz MA (2006a) Autecological properties of soil sphingomonads involved in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Microbiol Biotechnol* 72:1083-1089
- Cunliffe M, Kertesz MA (2006b) Effect of *Sphingobium yanoikuyae* B1 inoculation on bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in aged and freshly PAH-contaminated soils. *Environ Pollut* 144:228-237
- Cuypers C, Pancras T, Grotenhuis T, Rulkens W (2002) The estimation of PAH bioavailability in contaminated sediments using hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and Triton X-100 extraction techniques. *Chemosphere* 46:1235-1245
- Dabert P, Delgenes JP, Godon JJ (2005) Monitoring the impact of bioaugmentation on the start up of biological phosphorus removal in a laboratory scale activated sludge ecosystem. *Appl Microbiol Biotechnol* 66:575-588
- Dandie CE, Bentham RH, Thomas SM (2006) Use of reporter transposons for tagging and detection of *Mycobacterium* sp. strain 1B in PAH-contaminated soil. *Appl Microbiol Biotechnol* 71:59-66
- Dean SM, Jin Y, Cha DK, Wilson SV, Radosevich M (2001). Phenanthrene degradation in soils co-inoculated with phenanthrene-degrading and biosurfactant-producing bacteria. *J Environ Qual* 30:1126-1133
- Dean-Ross D (2003). Use of PAH-degrading bacteria in bioremediation of PAH-contaminated sediments. 2nd International Symposium on Contaminated Sediments pp.252-256. May 26-28 2003. Canada.
- Degens BP, Harris JA (1997) Development of a physiological approach to measuring the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biol Biochem* 29:1309-1320
- Dejonghe W, Boon N, Seghers D, Top EM, Verstraete W (2001) Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness: missing links. *Environ Microbiol* 3:649-657

- Del Panno MT (2003) Estudio de la estructura y dinámica de las comunidades microbianas del suelo durante un proceso de biorremediación. Trabajo de tesis. Facultad de Ciencias Exactas. UNLP
- Del Panno MT, Morelli IS (2003) Aplicación de modelos matemáticos al estudio de la dinámica de poblaciones durante la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Libro SETAC: Salud Ambiental y Humana: Una Visión Holística. Jorge Herkovits (eds). SETAC Press. ISBN: 987-05-1959-8 Buenos Aires, Argentina.
- Del Panno MT, Morelli IS, Engelen B, Berthe-Corti L (2005) Effect of petrochemical sludge concentrations on microbial communities during soil bioremediation. *FEMS Microbiol Ecol* 53:305-316
- DeLong EF, Wickham GS, Pace NR (1989) Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* 243:1360-1363
- Denger K, Schink B (1995) New halo- and thermotolerant fermenting bacteria producing surface-active compounds. *Appl Microbiol Biotechnol* 44:161-166
- Deziel E, Paquette G, Villemur R, Lepine F, Bisailon J (1996) Biosurfactant Production by a Soil *Pseudomonas* Strain Growing on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol* 62:1908-1912
- Dias R, (2006) Aislamiento y estudio de bacterias degradadoras de PAH bajo distintas condiciones de disponibilidad de sustrato. Seminario de Investigación. Universidad Nacional de Quilmes
- Ebihara T, Bishop PL (1999) Biofilm structural forms utilized in bioremediation of organic compounds *Wat Sci Tech* 39:203-210
- Ebihara T, Bishop PL (2002) Effect of Acetate on Biofilms Utilized in PAH Bioremediation. *Environmental Engineering Science* 19: 305-319.
- Ederer MM, Crawford RL, Herwig RP, Orser CS (1997) PCP degradation is mediated by closely related strains of the genus *Sphingomonas*. *Mol Ecol* 6:39-49
- Edwards U, Rogall T, Blocker H, Emde M, Bottger EC (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research* 17:7843-7853
- El Fantroussi S, Agathos SN (2005) Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr Opin Microbiol* 8:268-275
- England LS, Lee H, Trevors JT, (1993) Bacterial survival in soil-effect of clays and protozoa. *Soil Biol Biochem* 25: 525-531
- Fernandez-Linares L, Acquiviva M, Bertrand JC, Gauthier M (1996) Effect of sodium chloride concentration on growth and degradation of eicosane by the marine halotolerant bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. *Syst. appl. microbiol.* 19: 113-121
- Fredrickson JK, Balkwill DL, Drake GR, Romine MF, Ringelberg DB, White DC (1995) Aromatic-degrading *Sphingomonas* isolates from the deep subsurface. *Appl Environ Microbiol* 61:1917-1922
- Freeman DJ, Cattell F (1990) Woodburning as a source of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Sci Technol* 24:1581-1585
- Friedrich M, Grosser RJ, CERN EA, Inskeep WP, Ward DM (2000) Effect of model sorptive on phenanthrene biodegradation: molecular analysis of enrichments and isolates suggest selection based on bioavailability. *Appl Environ Microbiol* 66:2703-2710
- Friedrich M, Grosser RJ, Kern EA, Inskeep WP, Ward DM (2000) Effect of model sorptive phases on phenanthrene biodegradation: molecular analysis of enrichments and isolates suggests selection based on bioavailability. *Appl Environ Microbiol* 66:2703-2710

- Garcia JM, Wick LY, Harms H (2001) Influence of the nonionic surfactant Brij 35 on the bioavailability of solid and sorbed dibenzofuran. *Environ Sci Technol* 35:2033-2039
- Garcia-Junco M, Gomez-Lahoz C, Niqui-Arroyo JL, Ortega-Calvo JJ (2003) Biosurfactant- and biodegradation-enhanced partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons from nonaqueous-phase liquids. *Environ Sci Technol* 37:2988-2996
- Garland JL, Mills AL (1991) Classification and Characterization of Heterotrophic Microbial Communities on the Basis of Patterns of Community-Level Sole-Carbon-Source Utilization. *Appl Environ Microbiol* 57:2351-2359
- Gentry TJ, Resing C, Pepper IL (2004). New Approaches for bioaugmentation as a remediation technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 34: 447-494
- Gibson DT, Resnick SM, Lee K, Brand JM, Torok DS, Wackett LP, Schocken MJ, Haigler BE (1995) Desaturation, dioxygenation, and monooxygenation reactions catalyzed by naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain 9816-4. *J Bacteriol* 177: 2615-2621.
- Gibson DT, Subramanian V (1994) Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. Edited by Gibson, D.T. Marcel Dekker, Inc. New York (USA), 535, 1994.
- Gilewicz M et al. (1997) Isolation and characterization of a marine bacterium capable of utilizing 2-methylphenanthrene. *Appl Microbiol Biotechnol* 48:528-533
- Giovannoni SJ, DeLong EF, Olsen GJ, Pace NR (1988) Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J Bacteriol* 170:720-726
- Gomes NC, Kosheleva IA, Abraham WR, Smalla K (2005) Effects of the inoculant strain *Pseudomonas putida* KT2442 (pNF142) and of naphthalene contamination on the soil bacterial community. *FEMS Microbiol Ecol* 54:21-33
- Gómez-Suárez C, Pasma J, van der Borden AJ, Wingender J, Flemming HC, Busscher HJ, van der Mei HC (2002) Influence of extracellular polymeric substances on deposition and redeposition of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces. *Microbiology* 148: 1161-1169.
- Grifoll M, Selifonov SA, Gatlin CV, Chapman PJ (1995) Actions of a versatile fluorene-degrading bacterial isolate on polycyclic aromatic compounds. *Appl Environ Microbiol* 61:3711-3723
- Halden RU, Tepp SM, Halden BG, Dwyer DF (1999) Degradation of 3-phenoxybenzoic acid in soil by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* POB310(pPOB) and two modified *Pseudomonas* strains. *Appl Environ Microbiol* 65:3354-3359
- Hansen LD, Nestler C, Ringelberg D, Bajpai R (2004) Extended bioremediation of PAH/PCP contaminated soils from the POPILE wood treatment facility. *Chemosphere* 54:1481-1493
- Harms H, Bosma TNP (1997) Mass transfer limitation of microbial growth and pollutant degradation. *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology* 18: 97-105
- Ho Y, Jackson M, Yang Y, Mueller JG, Pritchard PH (2000) Characterization of fluoranthene- and pyrene-degrading bacteria isolated from PAH-contaminated soils and sediments. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 24: 100-112
- Hulsch R., Berthe-Corti L (1994) Methoden zur Prozesskontrolle bei geringer Sauerstoffzehrung im mikroaeroben Milieu. *BioEngineering* 1: 11-14
- Husain A, Naeemi E, Dashti B, al-Omirah H, al-Zenki S (1997) Polycyclic aromatic hydrocarbons in food products originating from locally reared animals in Kuwait. *Food Addit Contam* 14:295-299
- Hwang S, Cutright TJ (2002) Biodegradability of aged pyrene and phenanthrene in a natural soil. *Chemosphere* 47:891-899

- Ibarrolaza A, Coppotelli BM, Allegretti P, Donati ER, Morelli IS (2007) Estudio de la ruta de degradación de fenantreno de *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA. XI Congreso Argentino de Microbiología -10 al 12 de Octubre de 2007, Córdoba, Argentina. Libro de Resúmenes:159.
- in der Wiesche C, Martens R, Zadrazil F (2003) The effect of interaction between white-rot fungi and indigenous microorganisms on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Water, Air and Soil Pollution: Focus* 3: 73-79
- Ishii S, Koki J, Unno H, Hori K (2004) Two morphological types of cell appendages on a strongly adhesive bacterium, *Acinetobacter* sp. strain Tol 5. *Appl Environ Microbiol* 70:5026-5029
- Iwabuchi T, Harayama S (1998) Biochemical and molecular characterization of 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase from *Nocardioides* sp. KP7. *J Biol Chem* 273:8332-8336
- Iwamoto T, Nasu M (2001) Current bioremediation practice and perspective. *J Biosci Bioeng* 92:1-8
- Jain DK, Collins Thompson DL, Lee H, Trevors JT (1991) A drop collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *J Microbiol Methods* 13:271-279
- Jansson JK (2003) Marker and reporter genes: illuminating tools for environmental microbiologists. *Curr Op Microbiol* 6: 310-316
- Johnsen AR, Hausner M, Schnell A, Wuertz S (2000) Evaluation of fluorescently labeled lectins for noninvasive localization of extracellular polymeric substances in *Sphingomonas* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 66:3487-3491
- Johnsen AR, Karlson U (2004) Evaluation of bacterial strategies to promote the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Microbiol Biotechnol* 63:452-459
- Johnsen AR, Karlson U (2005) PAH degradation capacity of soil microbial communities--does it depend on PAH exposure? *Microb Ecol* 50:488-495
- Johnsen AR, Winding A, Karlson U, Roslev P (2002) Linking of microorganisms to phenanthrene metabolism in soil by analysis of (13)C-labeled cell lipids. *Appl Environ Microbiol* 68:6106-6113
- Johnson DL, Maguire KL, Anderson DR, McGrath SP (2004) Enhanced dissipation of chrysene in planted soil: the impact of a rhizobial inoculum. *Soil Biology & Biochemistry* 36: 33-38
- Jones KC, Stratford JA, Tidridge P, Waterhouse KS, Johnston AE (1989) Polynuclear aromatic hydrocarbons in an agricultural soil: long-term changes in profile distribution. *Environ Pollut* 56:337-351
- Jouanneau Y et al. (2005) Stimulation of pyrene mineralization in freshwater sediments by bacterial and plant bioaugmentation. *Environ Sci Technol* 39:5729-5735
- Juhasz AL, Naidu R (2000) Enrichment and isolation of non-specific aromatic degraders from unique uncontaminated (plant and faecal material) sources and contaminated soils. *J Appl Microbiol* 89:642-650
- Juhasz AL, Stanley GA, Britz ML (2000) Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* strain VUN 10,003. *Lett Appl Microbiol* 30:396-401
- Kanaly RA, Harayama S (2000) Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J Bacteriol* 182:2059-2067
- Kanaly RA, Harayama S, Watanabe K (2002) *Rhodanobacter* sp. strain BPC1 in a benzo[a]pyrene-mineralizing bacterial consortium. *Appl Environ Microbiol* 68:5826-5833

- Kastner M, Mahro B (1996) Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils affected by the organic matrix of compost. *Appl Microbiol Biotechnol* 44:668-675
- Kazunga C, Aitken M (2000) Products from the incomplete metabolism of pyrene by polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Appl Environ Microbiol* 66:1917-1922
- Kazunga C, Aitken MD, Gold A, Sangaiah R (2001) Fluoranthene-2,3- and -1,5-diones are novel products from the bacterial transformation of fluoranthene. *Environ Sci Technol* 35:917-922
- Kim E, Aversano PJ, Romine MF, Schneider RP, Zylstra GJ (1996) Homology between genes for aromatic hydrocarbon degradation in surface and deep-subsurface *Sphingomonas* strains. *Appl Environ Microbiol* 62:1467-1470
- Kim E, Zylstra GJ (1999) Functional analysis of genes involved in biphenyl, naphthalene, phenanthrene, and m-xylene degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* B1. *J Ind Microbiol Biotechnol* 23:294-302
- Kim YH, Freeman JP, Moody JD, Engesser KH, Cerniglia CE (2005) Effects of pH on the degradation of phenanthrene and pyrene by *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Appl Microbiol Biotechnol* 67:275-285
- Kozdroj J, van Elsas JD (2001) Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. *J Microbiol Methods* 43:197-212
- Krivobok S, Kuony S, Meyer C, Louwagie M, Willison JC, Jouanneau Y (2003) Identification of pyrene-induced proteins in *Mycobacterium* sp. strain 6PY1: evidence for two ring-hydroxylating dioxygenases. *J Bacteriol* 185:3828-3841
- Kumada Y, Kisa T, Kuwano Y, Koshikawa H, Tashiro, Yasukagawa E, Shimizu Y (2005) Microbial community analysis of PAHs degradation in soil. Proc 5th Korea-Japan joint seminar on geo-environmental engineering. Seoul –National University, Seoul
- Kuske CR, Barns SM, Busch JD (1997) Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions. *Appl Environ Microbiol* 63:3614-3621
- Lanthier M, Tartakovsky B, Villemur R, DeLuca G, Guiot SR (2002) Microstructure of anaerobic granules bioaugmented with *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. *Appl Environ Microbiol* 68:4035-4043
- Launen AL, Buggs VH, Eastep ME, Enriquez RC, Leonard JW, Blaylock MJ, Huang J, Häggblom MM (2002) Bioremediation of polyaromatic hydrocarbon-contaminated sediments in aerated bioslurry reactors. *Bioremediation Journal* 6: 125-141
- Leahy JG, Colwell RR (1990) Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol Rev* 54:305-315
- Lee PH, Doick KJ, Semple KT, (2003) The development of phenanthrene catabolism in soil amended with transformer oil. *FEMS Microbiol Letters* 228: 217-223
- Leys NM, Ryngaert A, Bastiaens L, Top EM, Verstraete W, Springael D (2005) Culture independent detection of *Sphingomonas* sp. EPA 505 related strains in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) *Microb Ecol* 49:443-450
- Leys NM, Ryngaert A, Bastiaens L, Top EM, Verstraete W, Springael D (2005) Culture independent detection of *Sphingomonas* sp. EPA 505 related strains in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Microb Ecol* 49:443-450
- Leys NM, Ryngaert A, Bastiaens L, Verstraete W, Top EM, Springael D (2004) Occurrence and phylogenetic diversity of *Sphingomonas* strains in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol* 70:1944-1955

- Lin TC et al. (2005) Characterization of floating activity of indigenous diesel-assimilating bacterial isolates. *J Biosci Bioeng* 99:466-472
- Lors C, Tiffreau C, Laboudigue A (2004) Effects of bacterial activities on the release of heavy metals from contaminated dredged sediments. *Chemosphere* 56:619-630
- Lotfabad SK, Gray MR (2002) Kinetics of biodegradation of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:361-366
- Luning Prak DJ, Pritchard PH (2002) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons dissolved in Tween 80 surfactant solutions by *Sphingomonas paucimobilis* EPA 505. *Can. J. Microbiol.* 48: 151–158
- Lynch JM, Benedetti A, Insam H, Nuti MP, Smalla K, Torsvik V, Nannipieri P (2004) Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms. *Biology and fertility of soils* 40:363-385
- Mackay D, Calcott D (1998) Partitioning and physical chemical properties of PAHs. In *The Handbook of Environmental Chemistry*. Ed AN Neison, Springer-Verlag Berlin pp325-346
- Maliszewska-Kordybach B, Smreczak B (2003) Habitat function of agricultural soils as affected by heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons contamination. *Environ Int* 28:719-728
- Margesin R, Schinner F (2001) Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:650-663
- Martin JP (1950) Use of acid rose Bengal and Streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Sci Plant Anal* 7:31-37
- Massa V, Radice F, Orlandi V, Babieri P. GenBank
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankSearch.html>
- Meyers JA, Sanchez D, Elwell LP, Falkow S (1976) Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* 127:1529-1537
- Miller MM, Wasik SP, Huang GL, Shiu WY, Mackay S (1985) Relationships between octanol water partition-coefficient and aqueous solubility. *Environ Sci Technol* 19: 522-529
- Mohan SV, Kisa T, Ohkuma T, Kanaly RA, Shimizu Y (2006) Bioremediation technologies for treatment of PAH-contaminated soil and strategies to enhance process efficiency. *Rev Environ Sci Biotechnol* 5:347-374
- Molina M, Araujo R, Hodson RE (1999) Cross-induction of pyrene and phenanthrene in a *Mycobacterium* sp. isolated from polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated river sediments. *Can J Microbiol* 45:520-529
- Moody JD, Freeman JP, Doerge DR, Cerniglia CE (2001) Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. *Appl Environ Microbiol* 67:1476-1483
- Morelli I, Vecchioli G, Del Panno MT, Panceira MT (2001) Effect of petrochemical sludge concentrations on changes in mutagenic activity during soil bioremediation process. *Environ Toxicol Chem* 20:2179-2183
- Morelli IS (2001) Caracterización de la Toxicidad de Residuos con Hidrocarburos. Importancia de la Aplicación de Bioensayos en Procesos de Biorremediación en Suelos. Trabajo de tesis. Facultad de Ciencias Exactas. UNLP.
- Morelli IS, Vecchioli GI, Costanza OR, Schäfeer R, Berthe-Corti L, Panceira MT (1999) "Effect of storage on the toxic potential of hydrocarbon containing sludges". *Environmental Toxicology* 14 : 227-233
- Morra MJ (2002) Assesment of extracellular enzymatic activity in soil. *Manual of environmental Microbiology*. Hurst C, Crawford R, Knudsen G, McInerney M, Stetzenbach (eds) ASM Press, Washington

- Mueller JG, Chapman PJ, Blattmann BO, Pritchard PH (1990) Isolation and characterization of a fluoranthene-utilizing strain of *Pseudomonas paucimobilis*. *Appl Environ Microbiol* 56:1079-1086
- Mueller JG, Devereux R, Santavy DL, Lantz SE, Willis SG, Pritchard PH (1997) Phylogenetic and physiological comparisons of PAH-degrading bacteria from geographically diverse soils. *Antonie Van Leeuwenhoek* 71:329-343
- Mulder H, Breure AM, Van Andel JG, Grotenhuis JT, Rulkens WH (1998) Influence of hydrodynamic conditions on naphthalene dissolution and subsequent biodegradation. *Biotechnol Bioeng* 57:145-154
- Muyzer G, Brinkhoff T, Nübel U, Santegoedes C, Schäfer H, Wawer C (1998) Denaturing gradient electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. In: Akkermans ADL, van Elsas JD, de Bruijn F (eds.) *Molecular Microbial Ecology Manual*, Kluwer Academic Press, Dordrecht, pp1-27
- Muyzer G, Smalla K (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73:127-141
- Muyzer G, Ramsing NB (1995) Molecular methods to study the organization of microbial communities. *Water Science and Technology* 32:1-9
- Nakatsu CH, Carmosini N, Baldwin B, Beasley F, Kourtev P, Konopka A (2005) Soil microbial community responses to additions of organic carbon substrates and heavy metals (Pb and Cr). *Appl Environ Microbiol* 71:7679-7689
- Neef A, Witzemberger R, Kampfer P (1999) Detection of sphingomonads and in situ identification in activated sludge using 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *J Ind Microbiol Biotechnol* 23:261-267
- Neu TR (1992) Microbial 'footprints' and the general ability of micro-organisms to label interfaces. *Can J Microbiol* 38:1005-1008
- Neu TR (1996) Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol Rev* 60: 151-166.
- Neu TR, Marshall KC (1991) Microbial 'footprints' – a new approach to adhesive polymers. *Biofouling* 3:101-112.
- Neu TR, Swerhone GDW, Lawrence JR (2001) Assessment of lectin-binding analysis for in situ detection of glycoconjugates in biofilm systems. *Microbiol* 147:299-313
- Nishioka M, Campbell RM, Lee ML, Castle R N (1986) Isolation of sulphur heterocycles from petroleum- and coal-derived materials by ligand exchange chromatography. *Fuel* 65: 270-273
- Nohynek LJ, Nurmiäho-Lassila EL, Suhonen EL, Busse HJ, Mohammadi M, Hantula J, Rainey F, Salkinoja-Salonen MS (1996) Description of chlorophenol-degrading *Pseudomonas* sp. strains KF1T, KF3, and NKF1 as a new species of the genus *Sphingomonas*, *Sphingomonas subarctica* sp. nov. *Int J Sys Bacteriol* 46: 1042-1055
- Noordman WH, Janssen DB (2002) Rhamnolipid Stimulates Uptake of Hydrophobic Compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*. 68: 4502-4508
- Noordman WH, Ji W, Brusseau ML, Janssen DB (1998) Effects of Rhamnolipid Biosurfactants on Removal of Phenanthrene from Soil. *Environ. Sci. Technol.*, 32:1806 -1812
- Ohkuma T, Kisa T, Kumada Y, Kuwano Y, Venkata Mohan S, Takana H, Shimizu Y (2006) surfactant enhanced bioremediation of the soil contaminated by coal derived hydrocarbons *Proc Geo-environmental Engineering 2006* (sixth

Japanese-Korean-France joint seminar on geoenvironmental engineering). Kyoto University

- Olivera NL, Commendatore MG, Delgado O, Esteves JL (2003) Microbial characterization and hydrocarbon biodegradation potential of natural bilge waste microflora. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30:542-548
- Pearson K (1926) On the coefficient of racial likeliness. *Biotmerika* 18:105-117
- Perlow RA, Broyde S (2003) Extending the understanding of mutagenicity: structural insights into primer-extension past a benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adduct. *J Mol Biol* 327:797-818
- Pinyakong O et al. (2000) Identification of novel metabolites in the degradation of phenanthrene by *Sphingomonas* sp. strain P2. *FEMS Microbiol Lett* 191:115-121
- Pinyakong O, Habe H, Omori T (2003) The unique aromatic catabolic genes in sphingomonads degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *J Gen Appl Microbiol* 49:1-19
- Pirt SJ (1965) The maintenance energy of bacteria in growing cultures. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 163:224-231
- Piskonen R, Nyssonen M, Rajamaki T, Itavaara M (2005) Monitoring of accelerated naphthalene-biodegradation in a bioaugmented soil slurry. *Biodegradation* 16:127-134
- Poder Ejecutivo Nacional (1992) Ley Nacional 24051 Residuos Peligrosos, generación, manipulación, transporte y tratamiento. Decreto Reglamentario 831. Boletín Oficial 03/01/1993.
- Potin O, Veignie E, Rafin C (2004) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium sphaerospermum* isolated from an aged PAH contaminated soil. *FEMS Microbiol Ecol* 51:71-78
- Prabhu Y, Phale PS (2003) Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. strain PP2: novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation. *Appl Microbiol Biotechnol* 61:342-351
- Prakash O, Lal R (2006) Description of *Sphingobium fuliginis* sp. nov., a phenanthrene-degrading bacterium from a fly ash dumping site, and reclassification of *Sphingomonas cloacae* as *Sphingobium cloacae* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:2147-2152
- Reasoner D, Geldreich E (1985) A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microbiol* 49:1-7
- Recorbet G, Steinberg C, Faurie G (1992) Survival in soil of genetically engineered *Escherichia coli* as related to inoculum density, predation and competition *FEMS Microbiology Letters* 101: 251-260.
- Reddy PG, Singh HD, Roy PK, Baruah JN (1982) Predominant role of hydrocarbon solubilization in the microbial uptake of hydrocarbons. *Biotechnology and Bioengineering* 24: 1241-1269
- Reid BJ, Jones KC, Semple KT (2000) Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments--a perspective on mechanisms, consequences and assessment. *Environ Pollut* 108:103-112
- Rentz JA, Alvarez PJ, Schnoor JL (2007) Benzo[a]pyrene degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* JAR02. *Environ Pollut*
- Rhaman KSM, Thahira J, Rahman Y, Kourkoutas I, Petsas R, Marchant IM, Banat IM (2003) Enhanced bioremediation of *n*-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresource Technology* 90:159-168
- Rhemann K, Noll HP, Steinberg CEW, Ketrup AA (1998) Pyrene degradation by *Mycobacterium* sp. Strain KR2. *Chemosphere* 36:2977-2992

- Rijnaarts HM, Bachmann A, Jumelet JC, Zehnder AJB (1990) Effect of desorption and intraparticle mass transfer on the aerobic biomineralization of hexachlorocyclohexane in a contaminated calcareous soil. *Environ Sci Technol* 24:1349-1354
- Ringelberg DB et al. (2001) Succession of phenotypic, genotypic, and metabolic community characteristics during in vitro bioslurry treatment of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated sediments. *Appl Environ Microbiol* 67:1542-1550
- Rittman BE (1993) The significance of biofilms in porous media. *Water Resour Res* 29:2195-2202
- Roling WF et al. (2002) Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Appl Environ Microbiol* 68:5537-5548
- Romine MF, Fredrickson JK, Li SM (1999) Induction of aromatic catabolic activity in *Sphingomonas aromaticivorans* strain F199. *J Ind Microbiol Biotechnol* 23:303-313
- Ron EZ, Rosenberg E (2001) Natural roles of biosurfactants. *Environ Microbiol* 3:229-236
- Rosenberg E, Ron EZ (1999) High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* 52: 154-162
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular cloning; a laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Saterbak A, Toy RJ, McMains BJ, Patty Williams M, Dorn PB (2000) Ecotoxicological and analytical assessment of effects of bioremediation on hydrocarbon-containing soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19:2643-2652
- Schwartz E, Scow KM (2001) Repeated inoculation as a strategy for the remediation of low concentrations of phenanthrene in soil. *Biodegradation* 12:201-207
- Schwartz E, Trinh SV, Scow KM (2000) Measuring growth of a phenanthrene-degrading bacterial inoculum in soil with a quantitative competitive polymerase chain reaction method. *FEMS Microbiol Ecol* 34:1-7
- Seo JS, Keum YS, Hu Y, Lee SE, Li QX (2006) Phenanthrene degradation in *Arthrobacter* sp. P1-1: initial 1,2-, 3,4- and 9,10-dioxygenation, and meta- and ortho-cleavages of naphthalene-1,2-diol after its formation from naphthalene-1,2-dicarboxylic acid and hydroxyl naphthoic acids. *Chemosphere* 65:2388-2394
- Sims R (1982) Land treatment of polynuclear aromatic compounds. PhD thesis, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA.
- Singer AC, van der Gast CJ, Thompson IP (2005) Perspectives and vision for strain selection in bioaugmentation. *Trends Biotechnol* 23:74-77
- Song HG, Wang X, Bartha R (1990) Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. *Appl Environ Microbiol* 56:652-656
- Story SP, Parker SH, Kline JD, Tzeng TRJ, Mueller JG, Kline EL (2000) Identification of four structural genes and two putative promoters necessary for utilization of naphthalene, phenanthrene, and fluoranthene by *Sphingomonas paucimobillis* var. EPA505. *Gene* 260:155-169.
- Streger SH, Vainberg S, Dong H, Hatzinger PB (2002) Enhancing transport of hydrogenophaga flava ENV735 for bioaugmentation of aquifers contaminated with methyl tert-butyl ether. *Appl Environ Microbiol* 68:5571-5579
- Stringfellow WT, Aitken MD (1995) Competitive metabolism of naphthalene, methyl naphthalenes, and fluorene by phenanthrene-degrading pseudomonads. *Appl Environ Microbiol* 61:357-362
- Stuart-Keil KG, Hohnstock AM, Drees KP, Herrick JB, Madsen EL (1998) Plasmids responsible for horizontal transfer of naphthalene catabolism genes between bacteria at a coal tar-contaminated site are homologous to pDTG1 from *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4. *Appl Environ Microbiol* 64:3633-3640

- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Taylor SW, Jaffe PR (1990) Biofilm growth and the related changes in physical properties of a porous medium. *Water Resour Res* 26: 2153-2159
- Thalman A (1968) Zur Methodik der bestimmung der dehydrogenaseaktivität im boden mittels triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). *Landwirtsch Forsch.* 21:249-258
- Thompson IP, van der Gast CJ, Ciric L, Singer AC (2005) Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environ Microbiol* 7:909-915
- Upham BL, Deocampo ND, Wurl B, Trosko JE (1998) Inhibition of gap junctional intercellular communication by perfluorinated fatty acids is dependent on the chain length of the fluorinated tail. *Int J Cancer* 78:491-495
- Uyttebroek M, Ortega-Calvo JJ, Breugelmans P, Springael D (2006) Comparison of mineralization of solid-sorbed phenanthrene by polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading *Mycobacterium* spp. and *Sphingomonas* spp. *Appl Microbiol Biotechnol* 72:829-836
- Vacca D J, Blean WF, Hickey WJ (2005) Isolation of Soil Bacteria Adapted To Degrade Humic Acid-Sorbed Phenanthrene. *Appl Environ Microbiol.* 71: 3797–3805
- van der Gast CJ, Whiteley AS, Starkey M, Knowles CJ, Thompson IP (2003) Bioaugmentation strategies for remediating mixed chemical effluents. *Biotechnol Prog* 19:1156-1161
- van Herwijnen R et al. (2003) Elucidation of the metabolic pathway of fluorene and cometabolic pathways of phenanthrene, fluoranthene, anthracene and dibenzothiophene by *Sphingomonas* sp. LB126. *Res Microbiol* 154:199-206
- Van Herwijnen R, Joffe B, Ryngaert A, Hausner M, Springael D, Govers HAJ, Wuertz S, Parsons J (2005) Effect of bioaugmentation and supplementary carbon sources on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a soil-derived culture. *FEMS Microbiol Ecol*
- van Herwijnen R, Wattiau P, Bastiaens L, Springael D, Daal L, Jonker L, Govers HAJ, Parsons JR (2003) Elucidation of the metabolic pathway of fluorene and cometabolic pathways of phenanthrene, fluoranthene, anthracene and dibenzothiophene by *Sphingomonas* sp. LB126. *Res Microbiol* 154:199-206
- van Loosdrecht MC, Lyklema J, Norde W, Zehnder AJ (1990) Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiol Rev* 54:75-87
- van Veen JA, van Overbeek LS, van Elsas JD (1997) Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:121-135
- Vandevivere P, Baveye P (1992) Effect of bacterial extracellular polymers on the saturated hydraulic conductivity of sand columns. *Appl Environ Microbiol* 58:1690-1698
- Vandevivere P, Baveye P, (1992) Saturated hydraulic conductivity reduction caused by aerobic bacteria in sand columns. *Soil Sci Soc Am J* 56:1-13
- Vecchioli G, Constanza O, Giorgieri S, Remmler M (1997) Extend of cleaning achievable for bioremediation of soil contaminated with petrochemical sludges. *J Chem Tech Biotechnol* 70:331-336
- Vecchioli GI, (1998) Degradación de mezclas complejas de hidrocarburos en suelo. Trabajo de tesis. Facultad de Ciencias Exactas. UNLP
- Vecchioli GI, Constanza OR, Morelli IS, del Panno MT, Panceira MT, Benavidez HM (2000) Bio-remediación como alternativa a la incineración de residuos con hidrocarburos aromáticos polinucleares. *Ingeniería Sanitaria y ambiental Parte1*, 50: pp. 50-54. *Parte 2*, 51: 34-38
- Velraeds MM, van de Belt-Gritter B, van der Mei HC, Reid G, Busscher HJ (1998) Interference in initial adhesion of uropathogenic bacteria and yeasts to silicone rubber by a *Lactobacillus acidophilus* biosurfactant. *J Med Microbiol* 47:1081-1085

- Venosa AD, Suidan MT, Wrenn BA, Strohmeier KL, Haines JR, Loye Eberhart B, King D, Holder E (1996) Bioremediation of an experimental oil spill on the shoreline of Delaware Bay. *Environ Sci Technol* 30: 1764-1775
- Venugopalan VP, Kuehn M, Hausner M, Springael D, Wilderer PA, Wuertz S (2005) Architecture of a nascent *Sphingomonas* sp. biofilm under varied hydrodynamic conditions. *Appl Environ Microbiol* 71:2677-2686
- Vila J, Lopez Z, Sabate J, Minguillon C, Solanas AM, Grifoll M (2001) Identification of a novel metabolite in the degradation of pyrene by *Mycobacterium* sp. strain AP1: actions of the isolate on two- and three-ring polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol* 67:5497-5505
- Vinas M, Sabate J, Espuny MJ, Solanas AM (2005) Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil. *Appl Environ Microbiol* 71:7008-7018
- Vogel TM, Walter MV (2001) Bioaugmentation. *Manual of environmental Microbiology*. Hurst C, Crawford R, Knudsen G, McInerney M, Stetzenbach (eds) ASM Press, Washington DC, USA. American Society for Microbiology Press, pp 952-959
- Volkering F, Breure A M, Rulkens WH (1998) Microbial aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation* 8: 401-417
- Volkering F, Breure A M, van An del JG (1993) Effect of micro-organisms on the bioavailability and biodegradation of crystalline naphthalene. *Appl Microbiol Biotechnol* 40: 535-540
- Wackett LP, Gibson DT (1988) Degradation of trichloroethylene by toluene dioxygenase in whole-cell studies with *Pseudomonas putida* F1. *Appl Environ Microbiol* 54:1703-1708
- Watanabe K, Hamamura N (2003) Molecular and physiological approaches to understanding the ecology of pollutant degradation. *Curr Opin Biotechnol* 14:289-295
- Wattiau P, Springael D, Agathos SN, Wuertz S (2002) Use of the pAL5000 replicon in PAH-degrading mycobacteria: application for strain labelling and promoter probing. *Appl Microbiol Biotechnol* 59:700-705
- Whitman BE, Lueking DR, Mihelcic JR (1998) Naphthalene uptake by a *Pseudomonas fluorescens* isolate. *Can J Microbiol* 44:1086-1093
- Wick LJ, Mattle PA, Wattiau P, Harás H (2004) Electrokinetic transport of PAH-degrading bacteria in model aquifers and soil. *Environ Sci Technol* 38: 4596-4602
- Wick LY, Colangelo T, Harms H (2001) Kinetics of mass transfer-limited bacterial growth on solid PAHs. *Environ Sci Technol* 35:354-361
- Wick LY, Ruiz de Munain A, Springael D, Harms H, de MA (2002) Responses of *Mycobacterium* sp. LB501T to the low bioavailability of solid anthracene. *Appl Microbiol Biotechnol* 58:378-385
- Wild SR, Berrow ML, Jones KC (1991) The persistence of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) in sewage sludge amended agricultural soils. *Environ Pollut* 72:141-157
- Wild SR, Jones KC (1995) Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget. *Environ Pollut* 88:91-108
- Willumsen PA, Karlson U (1996) Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation* 7:415-423
- Wilson SC, Jones KC (1993) Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environ Pollut* 81:229-249
- Wrenn BA, Venosa AD (1996) Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon-degrading bacteria by a most probable number procedure. *Can J Microbiol* 42:252-258

- Xia Y et al. (2005) Isolation and characterization of phenanthrene-degrading *Sphingomonas paucimobilis* strain ZX4. *Biodegradation* 16:393-402
- Yabuuchi E et al. (2002) Emendation of the genus *Sphingomonas* Yabuuchi et al. 1990 and junior objective synonymy of the species of three genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, in conjunction with *Blastomonas ursincola*. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:1485-1496
- Yabuuchi E, Yano I, Oyaizu H, Hashimoto Y, Ezaki T, Yamamoto H (1990) Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. and comb. nov., *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov., *Sphingomonas yanoikuyae* sp. nov., *Sphingomonas adhaesiva* sp. nov., *Sphingomonas capsulata* comb. nov., and two genospecies of the genus *Sphingomonas*. *Microbiol Immunol* 34:99-119
- Yakimov MM et al. (1998) *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 48 Pt 2:339-348
- Yu KS, Wong AH, Yau KW, Wong YS, Tam NF (2005) Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. *Mar Pollut Bull* 51:1071-1077
- Zinjarde SS, Pant A (2002) Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *J Basic Microbiol* 42:67-73