

IMPLEMENTACIÓN DE DIFERENTES TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE BIOMASA BACTERIANA DE CEPAS *Pseudomonas putida* BIODEGRADORAS DE FENOL

L. NIÑO CAMACHO, R. TORRES SÁENZ*

Grupo de Investigación en Bioquímica e Ingeniería de Proteínas
Escuela de Química, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Industrial de Santander.

*rtorres@uis.edu.co

Fecha Recepción: 20 de Octubre de 2009

Fecha Aceptación: 18 de Noviembre de 2009

RESUMEN

El fenol es uno de los contaminantes que presenta mayor impacto ambiental, incluso a bajas concentraciones. Existen diferentes tecnologías para el tratamiento ambiental del fenol y sus derivados, siendo el tratamiento biológico con cepas como las *Pseudomonas putida*, una de las formas más prácticas para remediarlo. Este estudio tuvo por objeto la implementación de diversas metodologías, conducentes a la cuantificación de biomasa en unidad de concentración celular de cepas de un pool de *Pseudomonas putida*, empleadas en refinerías de petróleo en Colombia. Las técnicas utilizadas para dicho propósito fueron: densitometría, cuantificación de proteínas celulares, cuantificación de biomasa seca (peso seco) y ATP por bioluminiscencia, éstas fueron correlacionados entre si y con el método de unidades formadoras de colonias por mililitro. Como resultado, se encontró correlaciones superiores al 98% ($r > 0.98$), que comparadas con el método microbiológico, actualmente empleado en las refinerías de Barrancabermeja y Cartagena de Indias, muestra una eficiencia mayor.

Palabras claves: *Biomasa, Tratamiento biológico, crecimiento microbiano, Pseudomonas putida.*

ABSTRACT

Phenol is a pollutant that has led to severe environmental contamination, even at low concentrations. There are different technologies for environmental treatment of phenol and its derivatives, where, biological treatment with strains such as *Pseudomonas putida*, is the way most practical for its abatement this due of cost-efficient technologies. The aim of this study is to implement several methodologies concerning to the quantification of biomass in a pool of strains of *Pseudomonas putida*, used in oil refineries in Colombia. The techniques employed for such purposes were: densitometry quantification of cellular proteins, quantification of dry biomass (dry weight) and ATP bioluminescence. These were correlated with each other, and with the microbiological method of colony-forming units per milliliter (CFU/ml). As a result, found over 98% correlation ($r > 0.98$), which compared with the direct method, currently employed at the refinery Barrancabermeja and Cartagena de Indias, shows a higher efficiency.

Keywords: *Biomass, biological treatment, bacterial growth, Pseudomonas putida.*

INTRODUCCIÓN

Las aguas residuales de las refinerías de petróleo aportan gran cantidad de contaminantes al medio ambiente, siendo el fenol uno de las sustancias que presenta mayor impacto en ecosistemas acuáticos, debido a su efecto tóxico

aún a bajas concentraciones [1,2]. Por lo tanto, se hace necesaria su remoción para así mitigar su impacto en el medio ambiente, de tal forma que se disminuya su concentración a niveles aceptables antes que las aguas sean vertidas a cuerpos de agua naturales. Esta remoción se lleva a cabo mediante tratamiento biológico, con cepas

bacterianas de *Pseudomonas putida*, las cuales lo toman como sustrato y biodegradan mediante la oxidación metabólica hasta CO₂ [3].

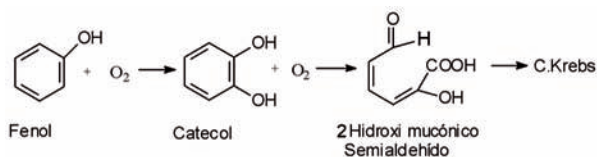


Figura 1. Biodegradación de la molécula de Fenol

La facilidad de crecer entre diferentes hidrocarburos aromáticos, benceno, tolueno, fenol, convierte a las *P. putida* en una especie fácilmente adaptable para la remoción de un compuesto en especial [4,5].

La medición de la concentración de biomasa es una variable importante en el monitoreo y validación del proceso de biorremediación de fenol [6]. Actualmente se mide con un método microbiológico que cuenta las Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL), sin embargo este método presenta algunas limitaciones como son los prolongados tiempos para la obtención de resultados, la necesidad de utilizar medios selectivos y las unidades no aplicables a las ecuaciones de modelos matemáticos. Por tanto, este estudio se basó en implementar una técnica para cuantificar la biomasa de forma práctica, aplicable en aguas residuales industriales, con mayor reproducibilidad, con resultados en menores tiempos de análisis y con unidades de masa que puedan ser incluidas en ecuaciones matemáticas.

Para la determinación del crecimiento de una población microbiana existen diferentes métodos. El recuento de unidades formadoras de colonias en placa (UFC/ml), es el más usado a nivel de laboratorio de microbiología, y por lo tanto escogido como método directo para desarrollar la comparación con los otros métodos ensayados [7]. Se determinó la turbidez del medio, la cual se debe a que las células presentes allí dispersan la luz que atraviesa la solución [8]. Se determinó también la concentración de proteínas, mediante el método colorimétrico de Bradford [9]. Además se ensayó la cuantificación específica del ATP por medio de la bioluminiscencia, siendo indicativo directo de la presencia de material biológico como el organismo de interés. Esta técnica se basa en la reacción del ATP con la luciferina en presencia

de la enzima luciferasa [10]. El peso seco es una medida directa de crecimiento microbiano, esta técnica es útil para grandes volúmenes de muestra, debido a que diferencias del orden de los miligramos representan el peso de un gran número de bacterias, es un método directo aunque poco sensible, pero tiene la ventaja de proporcionar unidades de masa útiles en las ecuaciones de los modelos matemáticos [7,11].

MATERIALES Y MÉTODOS

MICROORGANISMOS Y MEDIO DE CRECIMIENTO

Los estudios se realizaron sobre una mezcla de tres cepas diferentes de *P. putida*, adaptadas sin modificación genética, aportadas por el ICP-ECOPETROL. El medio de cultivo líquido utilizado para su crecimiento es un Medio Basal Salino (MBS), compuesto de la siguiente forma: NaCl, 0.3 g/l; (NH₄)₂SO₄, 0.6 g/l; K₂HPO₄, 0.75 g/l; KH₂PO₄, 0.25 g/l; MgSO₄, 0.15 g/l; KNO₃, 0.6 g/l, Fenol 0.1% (1mg/l), reactivos de Merck.

MÉTODOS ANALÍTICOS

Determinación de proteínas. Para la determinación de proteínas y peso seco, fue necesario realizar una concentración celular. La extracción de las proteínas celulares se realizó mediante hidrólisis básica con NaOH al 20% [12] y se cuantificaron las proteínas solubles mediante el método de Bradford [9].

Recuento de colonias en placa por gota. Se siguió el procedimiento realizado actualmente por el Instituto Colombiano de Petróleo. La siembra se realizó en agar Cetrimide selectivo para pseudomonas, por triplicado. Luego se incubaron a 32°C por 24 horas en una estufa de cultivo.

Cuantificación de ATP por bioluminiscencia. La cuantificación del ATP se mide directamente del equipo HY-LITE 2® de Merck en unidades relativas de luz (URL) [13].

Peso seco. Se determinó mediante la diferencia de pesos de cajas de aluminio calcinadas a 105°C por 12 horas.

Turbidez. La densidad óptica del medio se determinó en un espectrofotómetro Spectronic®

20 Genesys™ de Sigma-Aldrich a 600 nm, en la cinética con medio real se midió la absorbancia realizando previamente una extracción con hexano del hidrocarburo interferente.

Medición de Fenol: El consumo del sustrato fue medido con una técnica estándar para la determinación de fenoles, basado en la reacción de los compuestos fenólicos con 4-aminoantipirina a pH $7,9 \pm 0,1$ en presencia de ferrocianuro de potasio para formar un complejo naranjado de antipirina que absorbe a la longitud de onda de 500 nm [14].

CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y BIODEGRADACIÓN DE FENOL

Inicialmente se hicieron cinéticas de crecimiento en el medio de cultivo sintético. Seguidamente se aplicaron las técnicas escogidas para la determinación de biomasa en cinéticas de biodegradación de fenol realizadas con agua de la planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) de ECOPETROL-Barrancabermeja. Para el análisis de las aguas reales se realizó una previa extracción del hidrocarburo que permanece después de tratamientos primarios, con n-hexano el cual es un solvente que no afecta la cantidad de células viables.

Las cinéticas en medio sintético y medio real se realizaron en sistemas discontinuos (batch), a temperatura de 25 °C y un rango de pH entre 6,5 y 8,5. En la cinética en medio sintético, se trabajó con una concentración inicial de fenol de 50 ppm, inoculó al 10 % (v/v) de una solución de cepas *P. putida* (10^8 bacterias) y se trabajó con un flujo de oxígeno en exceso para asegurar la máxima biodegradación. Se tomaron medidas cada dos horas de los parámetros del proceso: concentración de fenol, pH, UFC y densidad óptica a 600nm, durante una corrida de 14 horas.

El muestreo se realizó al inicio del bio-reactor (BA-4008) PTAR Barrancabermeja Ecopetrol, las muestras fueron almacenadas con ácido sulfúrico a pH igual a 2. La cinética de biodegradación en medio real se realizó en un tiempo de corrida de 18 horas, inóculo inicial de 8% v/v, concentración inicial de fenol de 63 ppm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS PRELIMINARES

Determinación de ATP por bioluminiscencia: Se encontró que a concentraciones altas de bacterias el instrumento de bioluminiscencia marca sobrecarga de luz y a partir de una absorbancia de 0.043 ($4,6 \times 10^6$ ufc/ml) no es posible realizar la medida. Éste es un método generalmente usado como medida de control en la industria de alimentos y farmacéutica [15], pero no muestra ventajas como medida del crecimiento bacteriano en procesos de biodegradación.

CINÉTICA EN MEDIO SINTÉTICO

La cinética de formación de biomasa y desaparición de sustrato en medio sintético se muestra en la Figura 2. Las figuras 2a y 2b, muestran respectivamente la cinética de formación de Biomasa determinada con los métodos de densidad óptica y unidades formadores de colonias.

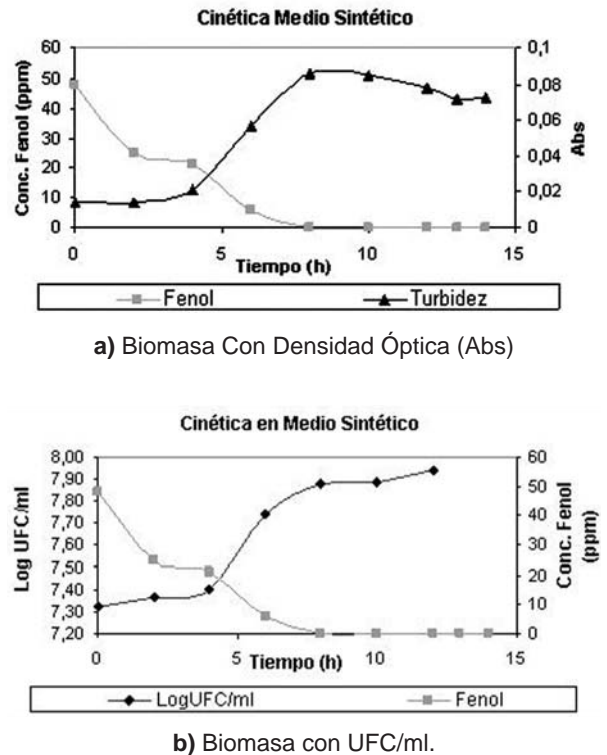


Figura 2. Cinética de crecimiento en medio sintético

La cinética de crecimiento bacteriano en medio sintético tiene un tiempo de latencia de cuatro horas, mientras que la fase de crecimiento exponencial se da entre la cuarta y octava hora, y a partir de las ocho horas se presenta la fase estacionaria. Se observa también la fase de muerte, debido al agotamiento de sustrato el cual se consume por completo a la octava hora.

A fin de poder utilizar la absorbancia como una medida rápida y sencilla de la concentración de biomasa, se elaboró una curva estándar que relacione las medidas indirectas de densidad óptica (absorbancia) con las medidas directas de recuento en placa (UFC/ml), obteniéndose una buena correlación entre ellas. (Figura 3).

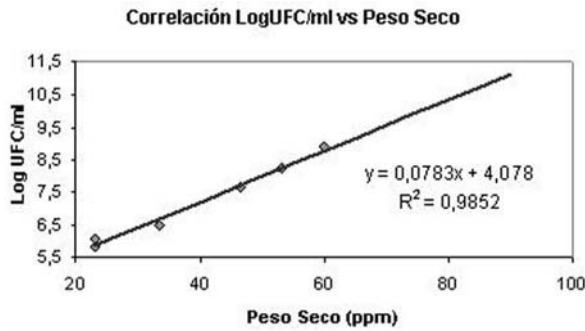
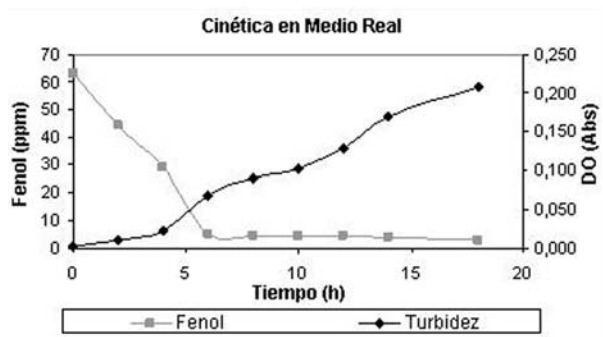


Figura 3. Curva estándar relación entre UFC/ml y Turbidez (Abs)

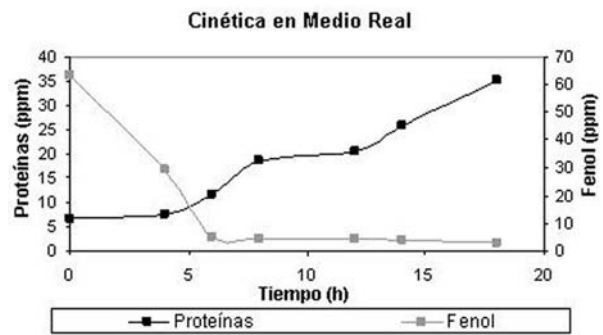
CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO Y BIODEGRADACIÓN DE FENOL EN MEDIO REAL

Las figuras 4a y 4b muestran la cinética de crecimiento de biomasa utilizando respectivamente la densidad óptica y el contenido de proteína.

Ambas técnicas funcionan y en menores tiempos, comparados a los tiempos necesarios para la determinación de biomasa con el método microbiológico entre 16 y 24 horas.



a) Turbidez OD



b) Concentración proteica

Figura 4. Cinética de crecimiento en medio real.

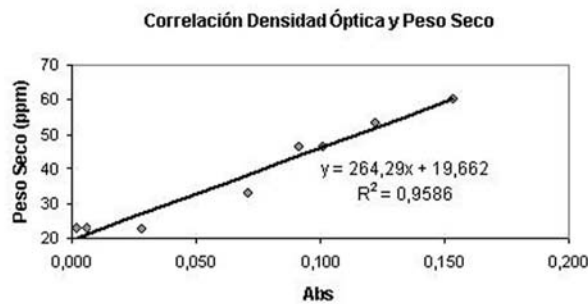
El crecimiento bacteriano tiene una fase de latencia de cuatro horas y una fase exponencial que inicia en la cuarta hora. La fase estacionaria no se observó aunque se hubiese consumido el fenol a las seis horas, esto es debido a que en este tipo de aguas existen otro tipo de hidrocarburos aromáticos que pueden servir como sustrato para las *Pseudomonas putida*, a diferencia de la cinética en medio sintético donde el crecimiento está delimitado sólo por el fenol reactivo agregado al medio. Los parámetros de crecimiento evaluados para el medio real se resumen en la Tabla 1. La diferencia observada en la biomasa final se debe a que el contenido de proteínas corresponde aproximadamente al 30% en peso seco.

Tabla 1. Parámetros de crecimiento bacteriano del pool de *Pseudomonas putida* en el medio real con fenol

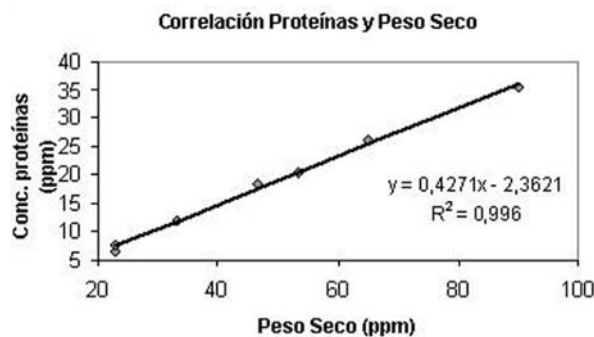
Técnica	Velocidad de Crecimiento (μ) x h ⁻¹	Tiempo de duplicación (t _d) h	Biomasa final (X _t) ppm
Peso Seco	0,093	7,45	90,0
Proteínas	0,099	7,00	35,4

Evaluación de los diferentes métodos para determinación de biomasa

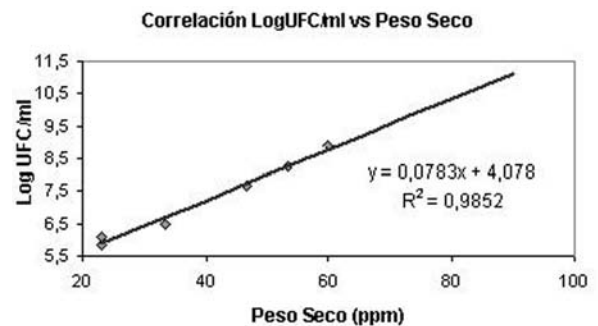
Se realizaron comparaciones y se encontraron diferentes factores de conversión con buenas correlaciones entre los métodos ensayados como medida de biomasa. La absorbancia se correlacionó con el peso seco como se muestra en la Figura 5.

**Figura 5.** Correlación lineal entre Turbidez y Peso Seco

Teniendo en cuenta que el contenido de proteína no corresponde al total de biomasa, es necesario realizar una correlación entre la concentración de proteínas y el peso seco de un volumen conocido de muestra. En la Figura 6 se muestra la correlación lineal que presentan.

**Figura 6.** Curva relación entre concentración de proteínas y peso seco

Uno de los propósitos de este trabajo fue encontrar un método que reemplace el método de recuento en placa por un método más práctico. Para esto, se determinaron las UFC/ml en cada punto con el fin de correlacionarlos con una medida directa que indique las células viables. La correlación entre Log UFC/ml y Peso Seco (Figura 7), permite convertir los datos del método microbiológico, en unidades de masa del cultivo que pueden incluirse en ecuaciones cinéticas que describen el proceso.

**Figura 7.** Correlación LogUFC/ml vs Peso Seco (ppm)

CONCLUSIONES

Se implementaron técnicas alternativas al método de recuento de colonias, aplicables en ambientes hostiles como las aguas residuales de industrias petroleras. Lo cual se realizó mediante la previa extracción con hexano el cual no altera la viabilidad de las bacterias presentes en el medio.

Teniendo en cuenta el costo, el tiempo y la simplicidad del método, se determinó que la densidad óptica es el método mas adecuado para la cuantificación de biomasa en aguas residuales provenientes de la actividad petrolera.

El ensayo de bioluminiscencia no es adecuado para la determinación de biomasa en muestras altamente contaminadas debido a la sensibilidad del método.

REFERENCIAS

- [1] Martínez, M.A., Barajas C., Torres, R., Ramirez, N. Simulación computacional del proceso global de biotransformación de fenol en aguas residuales industriales de refinerías de petróleo. XI Seminario Internacional del medio ambiente y desarrollo sostenible, Universidad Industrial de Santander, Publicaciones UIS. 2008.
- [2] Monteiro, Á., Boaventura, R., Rodrigues, A. E. Phenol biodegradation by *Pseudomonas putida* DSM 548 in a batch reactor, *Biochemical Engineering Journal* N° 6, 2000, pgs. 45–49.
- [3] Sahar, Z. Detection of meta- and ortho-cleavage dioxygenases in bacterial phenol degraders, *Journal of Applied Sciences & Environmental Management*, Vol. 10, No. 3, 2006, pgs. 75-81.
- [4] Reardon, K. F., Mosteller, D. C., Bull, J. D. Biodegradation Kinetics of Benzene, Toluene, and Phenol as Single and Mixed Substrates for *Pseudomonas putida* F1. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 69 N° 4, 2000, pgs. 385-400.
- [5] Loh Kai- Chee, Cao Bin. Paradigm in biodegradation using *Pseudomonas putida*- A review of proteomics studies, *Enzyme and Microbial Technology*. 2008.
- [6] Rigola Lapeña, M. Tratamiento de aguas industriales: Aguas de proceso y residuales, Illustrated, Marcombo, 1989, pgs. 142-143.
- [7] Madigan, M.T, J.M., Martinko, J., Brock, P. *Biología de los Microorganismos*, 10ª edición, Prentice-Hall Iberia, Madrid, 2003, pgs. 138-158.
- [8] Agatángelo, J. Estudio del comportamiento cinético de microorganismos de interés en seguridad alimentaria con modelos matemáticos, Universidad autónoma de Barcelona, Facultad de Veterinaria, Barcelona, España. 2007.
- [9] Bradford M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry* N° 72, 1976, pgs. 248-254.
- [10] Román Rivera E.U. The Effectiveness of the firefly rapid method in determining sanitation procedures at a tuna processing plant, University of Puerto Rico, Mayagüez campus. 2006.
- [11] Bratbak, G., Dundas I. Bacterial Dry Matter Content and Biomass Estimations, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 48, N° 4, 1984, pgs. 755-757.
- [12] Stickland Lh, J. *Gen Microbiol.* 5(4), 1951, pgs. 698-703.
- [13] Manual Hy-Lite 2 Procedimiento para el uso, manejo y monitoreo de limpieza por el sistema Hy Lite 2 , Merck, Bogotá. 2004.
- [14] Apha Standard methods for the examination of water and wastewater, 16th ed. Washington, ED, USA: American Public Health Association/ American Water Works Association. 1995.
- [15] Costa, P.D; Andrade, N.J.; Cardoso S.C; Vieira, F.J.; Ferreira, N.F. ATP-bioluminescence assay as an alternative for hygiene-monitoring procedures of stainless steel milk contact surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology*. Vol. 37, 2006, pgs. 345-349.