

**COMUNIDAD BACTERIANA DEGRADADORA DE GASOLINA  
EN UN BIORREACTOR DE LECHO FLUIDIZADO**

Por

Silvia Liliana Ara Rojas

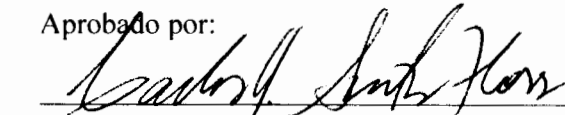
Tesis sometida en cumplimiento parcial  
de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en  
Biología

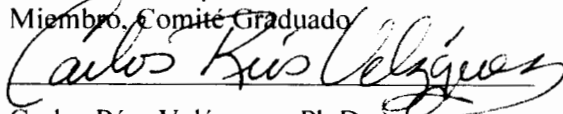
UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO  
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ  
2004

Aprobado por:



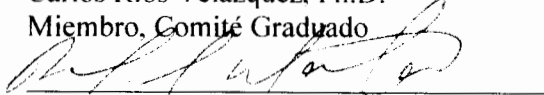
Carlos J. Santos, Ph.D.  
Miembro, Comité Graduado

28/junio/04  
Fecha



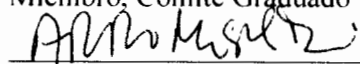
Carlos Ríos Velázquez, Ph.D.  
Miembro, Comité Graduado

29/junio/04  
Fecha



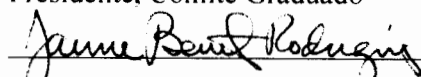
Rafael Montalvo Rodríguez, Ph.D.  
Miembro, Comité Graduado

28/jun/04  
Fecha



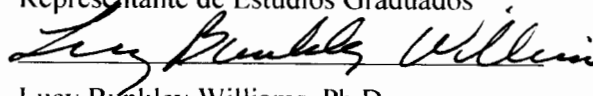
Arturo Massol Deyá, Ph.D.  
Presidente, Comité Graduado

8/07/04  
Fecha



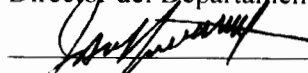
Jaime Benítez Rodríguez, Ph.D.  
Representante de Estudios Graduados

6/jul/04  
Fecha



Lucy Bunkley Williams, Ph.D.  
Director del Departamento

9 July 2004  
Fecha



José A. Mari Mutt, Ph.D.  
Director de Estudios Graduados

15 julio 2004  
Fecha

## Abstract

The bacterial diversity used to bioremediate gasoline contaminated groundwater in a fluidized bed reactor (FBR) was determined. Isolation and characterization of bacterial populations from the bioremediation system was performed in R<sub>2</sub>A media. Test included reaction to the Gram coloration, carbon utilization profiles (Biolog<sup>®</sup>), ability to use gasoline as the sole carbon source and molecular characterization by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA), Box-PCR and 16S rDNA sequence analysis. From a total of 162 distinctive isolates, 75% were gram negative bacilli, 19% gram positive bacilli, 5% gram negative cocci and 1% gram positive cocci. The 162 axenic cultures corresponded to 90 different genetics groups; 53% of which growth in gasoline as sole carbon source. The 86 strains capable of growing in gasoline corresponded to 52 different amplifications patterns in Box-PCR; which are not metabolically related (Biolog<sup>®</sup> system). In addition, the 16S rDNA of twenty strains were sequenced. The sequences were associated with 3 well-recognized divisions. Phylogenetically, 13 of the sequences are grouped with the alpha, beta and gamma subdivision of the Proteobacteria, one (BW2) with *Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides* group, and six with Firmicutes division (bacterial with High GC content of DNA and *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus* subdivision). The high degree of microbial diversity in the FBR promoted efficient and stable hydrocarbon removal (>99%), throughout the operation of the system. A better understanding of the biotic behavior will allow to improve and to optimize these units of treatment.

## Resumen

La diversidad bacteriana del proceso de biorremediación de agua contaminada con gasolina en un biorreactor de lecho fluidizado fue determinada. Se aislaron 162 cultivos que se caracterizaron mediante coloración Gram, sistema Biolog<sup>®</sup>, crecimiento en gasolina como única fuente de carbono (MMG) y molecularmente mediante análisis de restricción de amplificaciones del DNA ribosomal (ARDRA), Box-PCR y secuenciación del 16S rDNA. El 75% de los cultivos fueron bacilos gram-negativos, 19% bacilos gram-positivos, 5% cocos gram-negativos y 1% cocos gram-positivos. Los 162 cultivos se distribuyeron en 90 grupos genéticos; 53% de los cuales, incluyen cepas MMG positivas. Las 86 cepas positivas en MMG presentaron 52 patrones de amplificación por Box-PCR y su caracterización por el sistema Biolog<sup>®</sup> demostró que no están metabólicamente relacionadas. Adicionalmente, el 16S rDNA de veinte cultivos ha sido secuenciado y analizado. Las secuencias fueron asociadas a tres divisiones bacterianas. Filogenéticamente, 13 secuencias son agrupadas en las subdivisiones alfa, beta y gamma de las Proteobacteria, una secuencia (BW2) con la división *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* y seis secuencias con la división Firmicutes (subdivisiones de bacterias con alto contenido de GC y *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus*). El alto nivel de diversidad microbiana observada en el reactor ha permitido una eficiencia de remoción >99% del contaminante y parece ser importante para la operación estable y eficiente del sistema. Un mejor entendimiento del comportamiento biótico permitirá mejorar y optimizar estas unidades de tratamiento.

## **Dedicatoria**

Dedico este trabajo a mis dos grandes amores, mi esposo y mi hijo.

A mi esposo Eder por su amor, paciencia, esfuerzo y cooperación durante estos años, que me brindaron la fortaleza necesaria para lograr esta meta.

A mi hijo Eder Francisco por su amor y paciencia, y por todo ese tiempo que le pertenecía y que utilice en la realización de esta tesis.

## **Agradecimiento**

Al Sr. Roberto Torres por las facilidades brindadas durante la etapa de la toma de muestras y monitoreo del biorreactor a su cargo. Al Sr. Ricardo Álvarez y todo el personal de la empresa “On Site”, que fueron parte importante del proyecto de biorremediación en que estuvo enmarcado mi trabajo.

A la Dra. Mildred Zapata de la Facultad de Agricultura por permitirme el uso del sistema Biolog<sup>®</sup>, por su guía y ayuda en la obtención de datos en este sistema. Al Dr. Carlos Muñoz, la Dra. Vivian Navas y el MSc. José Almodóvar por su apoyo y cooperación en la obtención de imágenes microscópicas de la comunidad bacteriana del biorreactor.

A la MSc. Elba Díaz (Química) por su apoyo y guía en el manejo del Cromatógrafo de gases y demás equipos empleados para los análisis físicos y químicos del agua. A la MSc. Gladys Toro por su amistad, apoyo incondicional y consejos que me facilitaron una mejor ejecución de los diferentes métodos de biología molecular que forman parte de este trabajo.

A mi consejero el Dr. Arturo Massol por su guía y apoyo en la realización de mi trabajo y por la oportunidad de formar parte de su equipo de investigación. Al Dr. Rafael Montalvo por su auxilio cada vez que tuve problemas con mi trabajo, por sus consejos y la revisión de este manuscrito. A los Drs. Carlos Ríos, Carlos Santos y Jaime Benítez por sus consejos y la revisión de este manuscrito.

## Tabla de contenido

Lista de tablas .....	vii
Lista de figuras .....	viii
Lista de apéndices .....	x
Introducción .....	1
Objetivos .....	4
Revisión de literatura .....	5
Materiales y Métodos	
Monitoreo de parámetros físicos y químicos .....	13
Monitoreo de concentración de TPH y BTX .....	16
Recuento y aislamiento microbiano .....	17
Caracterización de la comunidad microbiana .....	18
Tipificación genética .....	20
Identificación fenotípica .....	23
Resultados	
Tratamiento biológico .....	25
Comunidad microbiana .....	29
Discusión	
Tratamiento biológico .....	43
Comunidad microbiana .....	46
Conclusiones .....	57
Literatura citada .....	59
Apéndice .....	67

## **Lista de tablas**

Tabla 1. Recuento de la comunidad bacteriana (UFC/ml) presente en el proceso de biorremediación de agua contaminada con gasolina. ....	30
Tabla 2. Análisis de las secuencias del 16S rDNA de veinte cepas con crecimiento en gasolina como única fuente de carbono. ....	41

## Lista de figuras

Figura 1. Representación esquemática del biorreactor de lecho fluidizado de la UPR- Recinto de Mayagüez .....	14
Figura 2 Porcentaje de remoción de hidrocarburos totales del petróleo (TPH) en el biorreactor de lecho fluidizado, luego de una etapa de recirculación. ....	26
Figura 3. Concentración de benceno, tolueno y xileno durante el tratamiento de agua contaminada con gasolina en el biorreactor de lecho fluidizado .....	27
Figura 4. Turbidez (NTU/ml) en el afluente (AFL) y en el efluente (EFL) del biorreactor de lecho fluidizado. ....	28
Figura 5. Consumo de oxígeno en el BAC y cantidad de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) en el BCAR. ....	28
Figura 6. Microscopía electrónica de rastreo de la superficie del carbón activado usado como medio de soporte en el BAC del RUM. ....	31
Figura 7. Microscopía del “biofilm” flotante de la columna de agua del BCAR: (a) Fluorescencia con DAPI y (b) Microscopía electrónica de rastreo. ....	32
Figura 8. Distribución de las cepas aisladas del BAC por su (a) morfología y reacción a Gram y (b) crecimiento en medio mínimo con gasolina como única fuente de carbono .....	33
Figura 9. ARDRA del 16S rDNA de seis cepas cortado con <i>Hae</i> III (carriles 1 al 6), <i>Hinf</i> I (carriles 7 al 9 y 11 al 13) y <i>Rsa</i> I (carriles del 14 al 19). Carril 10, marcador (pGEM cortado con <i>Hae</i> III) y el carril 20 es el control (16S rDNA sin cortar). ....	33
Figura 10. Análisis de grupo de patrones ARDRA de 162 cultivos bacterianos aislados del biorreactor. ....	35
Figura 11. A1R Box-PCR del genoma de nueve cepas con crecimiento en medio mínimo suplementado con gasolina como única fuente de carbono. ....	36
Figura 12. Análisis de grupo de los patrones de Box-PCR de las cepas degradadoras de hidrocarburos aisladas del biorreactor. ....	38



Figura 13. Dendograma de cepas gram-negativas con crecimiento en gasolina basado en BIOLOG GN. ....	39
Figura 14. Dendograma de cepas gram-positivas con crecimiento en gasolina basado en BIOLOG GP. ....	39
Figura 15. Análisis filogenético de bacterias degradadoras de hidrocarburos aisladas del biorreactor. ....	42

## Lista de apéndices

Apéndice 1. Degradación de los hidrocarburos totales del petróleo (TPH) durante 160 días de operación del biorreactor de lecho fluidizado. ....	68
Apéndice 2. Concentración de benceno, tolueno y xileno en el sistema de biorremediación “on site” del Recinto Universitario de Mayagüez. ....	69
Apéndice 3. Diferencia de turbidez (NTU/ml) entre afluente y efluente del BCAR. ....	70
Apéndice 4. Consumo de oxígeno (mg/l) durante el proceso de biorremediación en el BCAR. ....	71
Apéndice 5. Caracterización morfológica de 162 cepas aisladas del proceso de biorremediación de agua contaminada con gasolina del RUM ....	72
Apéndice 6. Utilización de fuentes de carbono por las cepas bacterianas con crecimiento en gasolina como única fuente de carbono. ....	79
Apéndice 7. Crecimiento en anaerobiosis y reducción de nitrato por las 52 cepas que crecen en gasolina como única fuente de carbono. ....	91

## Introducción

La contaminación de aguas subterráneas por productos del petróleo es ampliamente reconocida como un serio problema para la calidad del agua. En los Estados Unidos se estima que entre 100,000 a 400,000 tanques soterrados para almacenaje de gasolina sufrieron fisuras por donde fugó combustible al ambiente (Atlas y Cerniglia, 1995). A esto, se suman los frecuentes derrames de oleoductos en accidentes durante el transporte de hidrocarburos. En Puerto Rico existen sobre 12,000 tanques soterrados de los cuales se identificaron unos 800 o más con fisuras. Debido a la alta solubilidad en agua de los componentes de la gasolina y a su elevada toxicidad y genotoxicidad, estos hidrocarburos fueron clasificados como contaminantes primarios por la Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos (Tsao *et al.*, 1998).

La mayoría de los hidrocarburos de la gasolina son biodegradables en una gran variedad de ambientes. Las opciones de limpieza que dependen de una biodegradación natural, en términos generales, puede ser categorizada como: (1) biorremediación pasiva que requiere de monitoreo, pero ninguna intervención externa, y (2) soluciones ingenieriles que requieren de alteraciones físicas y/o químicas del lugar para aumentar o estimular el proceso natural de biodegradación (Chapelle, 1993).

La biorremediación activa es la tecnología que utiliza el potencial metabólico de los microorganismos para limpiar un ambiente contaminado. Una importante característica de esta tecnología es que se realiza en ambientes abiertos (no estériles)

que contienen una amplia diversidad de organismos. Las bacterias suelen ser los que tienen la mayor capacidad degradadora de contaminantes y usualmente tienen un rol central en la biorremediación; mientras que otros organismos, como los hongos y protozoos, suelen afectar o alterar este proceso (Watanabe, 2001).

La biorremediación eficiente de contaminantes hidrocarbonados por comunidades microbianas permanece como el mayor reto para los ecologistas microbianos y los ingenieros de procesos, esto debido a que las soluciones de biorremediación están basadas en la conjunción de la ingeniería mecánica con la diversidad biológica y su funcionalidad. Sin embargo, mientras que el diseño e implementación de soluciones por procesos ingenieriles están relativamente bien establecidos, se carece de una precisa descripción de la diversidad microbiana y su funcionalidad, lo cual limita la eficiencia de la biorremediación. Conocer la diversidad estructurada en un proceso de biorremediación, su estabilidad y duración durante el manejo del proceso son las llaves fundamentales para monitorear y predecir la eficiencia de la biorremediación (Whiteley y Bayley, 2000).

Aún cuando existe abundante literatura científica sobre procesos de biorremediación de ambientes contaminados con petróleo y sus derivados, la gran mayoría hace referencia a la optimización de procesos ingenieriles y a la estandarización del metabolismo de estos contaminantes por determinadas especies de bacterias, muy pocos hacen referencia a la diversidad bacteriana presente en procesos de biorremediación “*In situ*” u “*On site*” y ninguno de ellos constituye un reporte para el área del Caribe.

En marzo de 1999, el Recinto de Mayagüez de la Universidad de Puerto Rico (UPRM) inició un programa de remoción de tanques soterrados de almacenaje de gasolina del área de Planta Física (edificios y talleres de trabajo de maquinaria mecánica) que implicaba la ejecución de análisis de concentración de hidrocarburos del petróleo (TPH) y benceno en el suelo y agua del lugar. Los resultados analíticos mostraron concentraciones de TPH por encima de los niveles de regulación de la Junta de Calidad Ambiental (EQB, por sus siglas en inglés) para suelo y agua subterránea que son de 100 ppm y 50 ppm, respectivamente. Asimismo, las concentraciones de benceno en el agua subterránea también se encontraban por encima del nivel mínimo del EQB (0.05 ppm). Durante el programa de remoción, 370 yardas cúbicas de suelo y 3,000 galones de agua contaminados fueron removidos y dispuestos; y se cubrió el removida con suelo libre de hidrocarburos de gasolina.

Dos años después, en el 2001, durante excavaciones para mejoras en esta área, se detectó la presencia de vapor de gasolina. Análisis de suelo y agua permitieron establecer que las concentraciones de TPH y benceno en el área seguían por encima de los niveles permitidos por el EQB; por lo cual, la UPRM inició un proyecto para la remediación de éstos ambientes contaminados con gasolina. Como parte de este proyecto, en el área de Planta Física del Recinto, se instaló un proceso “On Site” para biorremediación de agua consistente en un reactor de lecho fluidizado cuyo material de soporte o fijación microbiana fue carbón activado. A través de este reactor se biorremedió el acuífero de este lugar contaminado por derrame de gasolina.

## Objetivos

Para un mejor monitoreo y una mayor eficiencia del proceso de biorremediación “on site” de agua contaminada con gasolina en el Recinto Universitario de Mayagüez, y sentar un precedente para el Caribe, esta investigación se fijó como propósito:

- describir la composición y dinámica de la comunidad bacteriana (cultivable) degradadora de gasolina presente en el biorreactor de lecho fluidizado que forma parte del proceso de biorremediación del Recinto.
- determinar la eficiencia de operación de la unidad de tratamiento a través de los parámetros de hidrocarburos totales del petróleo (TPH), concentración de benceno, tolueno y xileno (BTX), crecimiento microbiano y consumo de oxígeno.
- aislar e identificar cepas bacterianas degradadoras de gasolina que puedan usarse para bioaumentar otros procesos de biorremediación de hidrocarburos en esta área u otras áreas geográficas con condiciones ambientales similares.

## **Revisión de Literatura**

Muchos contaminantes ambientales orgánicos son biodegradables bajo condiciones aerobias y/o anaerobias. La biodegradación de estos contaminantes en aguas subterráneas es un proceso complejo que puede estar limitado por la toxicidad del contaminante o de otras sustancias inhibitorias, la disponibilidad del contaminante o de los nutrientes (nitrógeno y fósforo), las condiciones físicas (temperatura, salinidad, pH) o por la competencia microbiana (Atlas y Cerniglia, 1995). Asimismo, los contaminantes pueden servir como donadores o como aceptores de electrones en las reacciones bioquímicas de tipo redox donde pueden ser parcialmente transformados o mineralizados a productos finales inocuos. Los procesos oxidadores usan los oxidantes disponibles en el acuífero (oxígeno, nitratos, sulfatos, manganeso o hierro) para generar los productos finales que pueden ser metabolitos intermediarios de menor toxicidad y/o mayor solubilidad o en el caso de la mineralización el dióxido de carbono y el agua (Langwaldt y Puhakka, 2000).

La biodegradación en sistemas naturales del petróleo y sus derivados ocurre a través de la acción de poblaciones microbianas mixtas y bajo condiciones que limitan la presencia o efectividad del consorcio degradador natural. Por ejemplo, ambientes que carecen de hidrocarburos del petróleo soportan bajos niveles de microbios degradadores de hidrocarburos, mientras que en ambientes contaminados con éstos podrían ser las condiciones físicas (como una baja temperatura) o las químicas (como poco oxígeno o bajos niveles de nitrógeno) las que limiten la habilidad de su consorcio degradador para biodegradar el petróleo. En estos casos, la práctica de la bioaumentación o la bioestimulación pueden ser efectivas. El primer término hace

referencia a la adición de organismos exógenos (por ejemplo fenotipos que degradan petróleo) al medio ambiente para aumentar la flora natural, el otro término se refiere a la adición de químicos, ya sean nutrientes (nitrógeno, fosfato y/o oxígeno) o surfactantes, para estimular la flora natural (Atlas y Cerniglia, 1995).

La biorremediación artificial de ambientes contaminados con hidrocarburos incluye el uso de biorreactores; los cuales han sido utilizados para el tratamiento de agua servida desde hace unos 100 años y sus procesos pueden ser diferenciados en base al mecanismo de crecimiento de la biomasa que puede desarrollarse adherida a un soporte (sistemas de biopelículas) o en una suspensión (sistemas de lodo activado). Los diferentes reactores pueden ser operados bajo condiciones aerobias o anaerobias, el flujo de agua puede ser intermitente o constante y este flujo puede ser independiente o común al formar parte de una mezcla de componentes.

Los biorreactores en los que se promueve la formación de biopelícula son los de filtro por goteo, de discos rotatorios, de flujo ascendente con filtro fijo y los de lecho fluidificado. En los biorreactores de filtro por goteo, las bacterias crecen fijadas a un soporte (filtro) inerte, el flujo del contaminante es descendente y la aireación es ascendente. En los de discos rotatorios, los microorganismos se desarrollan en la superficie de los discos que son parcialmente sumergidos en el agua y, luego, parcialmente puestos en contacto con el aire en cada giro. En un biorreactor de flujo ascendente los microorganismos crecen sumergidos en un empaque inerte y el flujo de agua les provee sustratos y nutrientes; las condiciones hidráulicas en este tipo de reactor puede causar algo de expansión del empaque pero no su fluidización. Por otro lado, en los reactores de lecho fluidizado la biomasa crece sobre material de soporte



granular, su principio fundamental es la fluidización del lecho (fondo) por altas tasas de recirculación del agua a ser tratada. La recirculación del agua diluye la concentración del afluente a niveles no tóxicos para las bacterias y provee condiciones totales de mezcla, mientras la aireación está diseñada para generar recirculación. Este sistema permite obtener altas concentraciones de biomasa (Langwaldt y Puhakka, 2000).

Para remediar compuestos aromáticos policíclicos de hidrocarburos, benceno, tolueno, etilbenceno, xileno y fenoles presentes en acuíferos, los biorreactores de flujo por goteo son inadecuados y menos efectivos que los de flujo ascendente. Los de disco rotatorio no suelen emplearse y, al ser comparados con los de flujo ascendente, mostraron una menor eficiencia para remover hidrocarburos aromáticos y fenoles (van der Hoek *et al.*, 1989). En cambio, los reactores de lecho fluidizado son ampliamente utilizados para descontaminar agua subterránea (Ahmadvand *et al.*, 1995; Massol-Deyá *et al.*, 1997; Shim y Yang, 1999), incluso a bajas temperaturas (Järvinen *et al.*, 1994; Puhakka y Melin, 1998); siendo especialmente utilizados aquellos que contienen carbón activado como material de soporte. El carbón activado tiene la ventaja de permitir un rápido establecimiento y crecimiento microbiano por la adsorción del contaminante en el carbón activado granular (Edwards *et al.*, 1994, Sutton y Mishra, 1994; Webster *et al.*, 1997).

Un proceso que combina la adsorción por el carbón activado y el crecimiento microbiano en su superficie puede remover efectivamente los compuestos de BTX de la gasolina que contamina el agua. El mecanismo de este proceso es que primero los compuestos son adsorbidos y luego metabolizados por los microorganismos

adheridos en la superficie del carbón, lo que implica una ventaja ya que ambos mecanismos son integrados para la remoción de contaminantes del agua. Además, el oxígeno necesario para el metabolismo de BTX proviene del oxígeno disuelto en el agua o del oxígeno puro predisuelto en ella. Esto proporciona una ventaja adicional del proceso sobre los métodos convencionales de aireación que provocan que pequeñas cantidades de BTX sean emitidas del agua al aire a través de su volatilización causando contaminación del aire (Tang *et al.*, 1999). Bajo condiciones óptimas de operación en este sistema de tratamiento, más del 90% del total de compuestos orgánicos presentes pueden ser removidos con tiempos de retención hidráulica de 5 a 10 minutos (Massol-Deyá *et al.*, 1995).

Las bacterias poseen la tendencia de crecer en las interfases y para adherirse producen materiales gelatinosos basados en exopolímeros. Este material mantiene unidas a las células en la biopelícula y sobre el material de soporte. Las bacterias también utilizan estructuras celulares superficiales específicas como los *pili* y las fimbrias para adherirse a una superficie. Los contaminantes disueltos y el oxígeno difunden a través de la biopelícula, y las capas externas protegen a las células del interior de la toxicidad y reducen la concentración del contaminante soluble por absorción (Langwaldt y Puhakka, 2000).

La comunidad microbiana que se establece al interior de ecosistemas contaminados tiende a ser dominada por aquellos organismos capaces de utilizar y/o sobrevivir la contaminación tóxica. Como resultado, estas comunidades son típicamente menos diversas que las de sistemas no contaminados, aunque la diversidad puede ser influenciada por la complejidad de las mezclas químicas

presentes y el lapso de tiempo que las poblaciones han sido expuestas. Sin embargo, cuando las bacterias gram negativas dominan estos sistemas, como es el caso usual de la contaminación por hidrocarburos, las técnicas de detección microbiana por análisis de biomarcadores relacionados con el estado nutricional o fisiológico pierden significancia frente a pequeñas variaciones entre las especies. Una manera complementaria por la cual el cambio de la estructura de una comunidad microbiana puede ser monitoreado en detalle es mediante técnicas de separación electroforética de productos del fraccionamiento del 16S rDNA, molécula portada por todo organismo vivo y que provee de marcadores moleculares para la identificación de especies (Hirsch y Sigmund, 1995; Lipski y Altendorf, 1997).

El método anterior fue originalmente usado para perfiles de poblaciones microbianas en muestras ambientales por Muyzer *et al.* (1993) y recientemente, ha sido empleado por otros investigadores como Ovreas y Torsvik (1998) que, aplicando pruebas fenotípicas (Biolog®) y métodos moleculares como el “Análisis de Restricción de DNA Amplificado” (ARDRA), la hibridización de sondas de oligonucleótidos y REP- PCR (PCR de fragmentos repetitivos), investigaron y compararon la diversidad bacteriana cultivable de dos suelo agrícolas de Noruega. Ovreas y Torsvik establecieron que las bacterias aisladas pertenecían a los grupos  $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  de las proteobacterias, al grupo *Cytophaga–Flexibacter–Bacteroides* (CFB) y a las gram positivas de bajo contenido de GC. Asimismo, establecieron que la diversidad de bacterias cultivables fue similar para ambos tipos de suelo, pero al comparar las comunidades totales (especies cultivables y no cultivables) la diferencia fue significativamente alta.

Macnaughton *et al.* (1999), aplicando métodos moleculares, estudiaron el progreso de la atenuación y el transcurso de la biorremediación de un derrame controlado de petróleo en suelo. Mediante dendogramas de relación de los patrones de restricción y de la secuenciación del 16S rDNA de las cepas determinaron que las bacterias de esa comunidad estaban distribuidas en los grupos  $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\epsilon$  de las proteobacterias, algunas eran del filo de las gram positivas y otras del grupo *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*. Estos investigadores emplearon la técnica del Número Más Probable (MNP) para monitorear los cambios en el tiempo de la comunidad a través de las fluctuaciones en el número de individuos presentes.

Entre otras investigaciones dedicadas a establecer la composición y dinámica de poblaciones microbianas en ambientes contaminados con petróleo o sus derivados se encuentra la realizada por Juteau *et al.* (1999), quienes aislaron bacterias de filtros para vapores de tolueno y verificaron que éstas no degradaban el tolueno en ausencia de oxígeno. En esta investigación aislaron grupos fenotípicos de los que confirmaron su capacidad degradadora, observando que sólo 15% de ellas eran verdaderas degradadoras pertenecientes a 11 grupos genotípicos. Los genotipos que se identificaron, mediante la comparación de las secuencias genéticas de sus 16S rDNA, pertenecían a 7 géneros: *Acinetobacter*, *Azoarcus*, *Mycobacterium*, *Nevskia*, *Pseudomonas*, *Pseudonocardia* y *Rhodococcus*; siendo los géneros *Pseudomonas* y *Rhodococcus* los de mayor frecuencia.

Antes del derrame de petróleo del buque Exon Valdez en 1989, pocos agentes u organismos de biorremediación para la bioestimulación o bioaumentación (OSBA, por sus siglas en inglés) estuvieron comercialmente disponibles. Recién después de

la gran publicidad que recibió la biorremediación de este derrame, se incrementó el número de OSBA comercializados. Esto ha creado una necesidad de agencias ambientales para regular y evaluar la seguridad y eficiencia de los OSBA a ser liberados en el ambiente; así como también para crear una lista de productos aceptables que podrían usarse en los diversos derrames y que serían validados por estas agencias.

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) y la “Environment Canada’s Emergencys Division” hacen frente a esta necesidad contemporánea desarrollando pruebas de laboratorio cuantitativas de evaluación de los OSBA. Sin embargo, sus procesos difieren en que la EPA, a través de la Corporación Nacional de Tecnología aplicada al ambiente (NETAC), escoge el uso de la microflora natural del agua para los inóculos estándar para las pruebas de laboratorio. En contraste, la agencia de Canadá prefiere la construcción de consorcios sintéticos compuestos por bacterias aisladas de diversas áreas geográficas que representan ambientes naturales diferentes.

Foght *et al.* (1998) desarrollaron dos consorcios, uno de fuentes terrestres y acuáticas (agua dulce) como futuros OSBA para uso continental a moderada temperatura (10 a 25 °C) y otro derivado de agua y sedimento marino para un OSBA de aplicaciones marinas y a bajas temperaturas (menos de 10 °C). Los consorcios fueron desarrollados con dos propósitos: para servir como poblaciones reproducibles para probar la eficacia de la estimulación del OSBA y como poblaciones de referencia contra las cuales OSBA de bioaumentación pueden ser reproduciblemente medidos. A los consorcios se les sometió a pruebas de selección e identificación que

incluyeron: coloración Gram y morfología celular, movilidad, reducción de nitratos ( $\text{NO}_3$ ), crecimiento anaerobio, producción de pigmentos fluorescentes, composición de los aminoácidos de la pared celular, presencia e identidad de ácidos micólicos, presencia de pigmentos de xantomonadina, utilización y producción de ácidos a partir de carbohidratos y actividades de gelatinasa, amilasa, oxidasa, catalasa y descarboxilasa. Asimismo, los sometieron a pruebas de estabilidad fenotípica al inocularlos en medios de cultivo con fuentes de carbono similares a los derivados del petróleo, pruebas de biodegradación y pruebas de selección e identificación de inóculos creando combinaciones de cepas del consorcio que permitan la mayor degradación. Estableciendo que las bacterias de estos consorcios que degradaban hidrocarburos pertenecían a las especies *Pseudomonas fluorescens*, *P. alcaligenes*, *Xanthomonas* sp. (aisladas de suelo contaminado de una refinería), *Mycobacterium* sp. y *Corynebacterium* sp. (agua dulce con derrame de petróleo), y generaron un consorcio moderadamente degradador de hidrocarburos para servir como control de calidad de OSBA para bioaumentación.

La ventajas de usar un consorcio sintético son las conocidas actividades de predecibilidad y reproducibilidad del inóculo frente el uso de poblaciones indígenas que se enfrentan a problemas de baja actividad degradadora y pobre reproducibilidad debido a la variabilidad geográfica y temporal del inóculo. Pero el uso de consorcios sintéticos puede ser criticado como lo artificial frente a lo natural, donde el consorcio puede competir con la microflora natural, y como está compuesto por bacterias de procedencia diversa se le puede considerar como una introducción y modificación genética de lo natural.

## **Materiales y Métodos**

La biorremediación de agua contaminada con gasolina se realizó en un biorreactor de lecho fluidizado con carbón activado como material de soporte. Este biorreactor consistió de una columna de 5-L PVC de 10 cm de diámetro y 150 cm de longitud, operado como un sistema de flujo ascendente de un solo paso a una tasa de 0.2 a 0.5 litros por minuto y en cuyo interior se empacaron aproximadamente 500 g de peso seco de carbón activado. Este carbón tiene un diámetro geométrico de 0.7 mm con una densidad total de 1.6 g/cm<sup>3</sup>. El agua contaminada (extraída del acuífero) fue bombeada a un tanque de equalización (TE) y suplementada con oxígeno (7 a 10 mg por litro) antes de su ingreso al biorreactor, donde tuvo un tiempo de retención hidráulica de aproximadamente 20 min. Dependiendo del contenido de gasolina del efluente, éste fue recibido en uno de los dos tanques de recepción (TR 1 y 2) para ser recirculado o para ser transferido a un tanque de nutrientes (TN) para su retorno al acuífero. Un diagrama del biorreactor es mostrado en la figura 1.

### **Monitoreo de parámetros físicos y químicos**

Los parámetros físicos y químicos monitoreados durante la biorremediación de agua contaminada con gasolina en el biorreactor de Planta Física del Recinto Universitario de Mayagüez (RUM) fueron: pH, conductividad (mS/cm), oxígeno disuelto (mg/L), temperatura (°C), turbidez (NTU) y concentración de los nutrientes fosfato, nitrato e ión amonio (mg/L). Cada parámetro fue medido tanto en el afluente como en el efluente del biorreactor, al inicio y final de cada ciclo de tratamiento

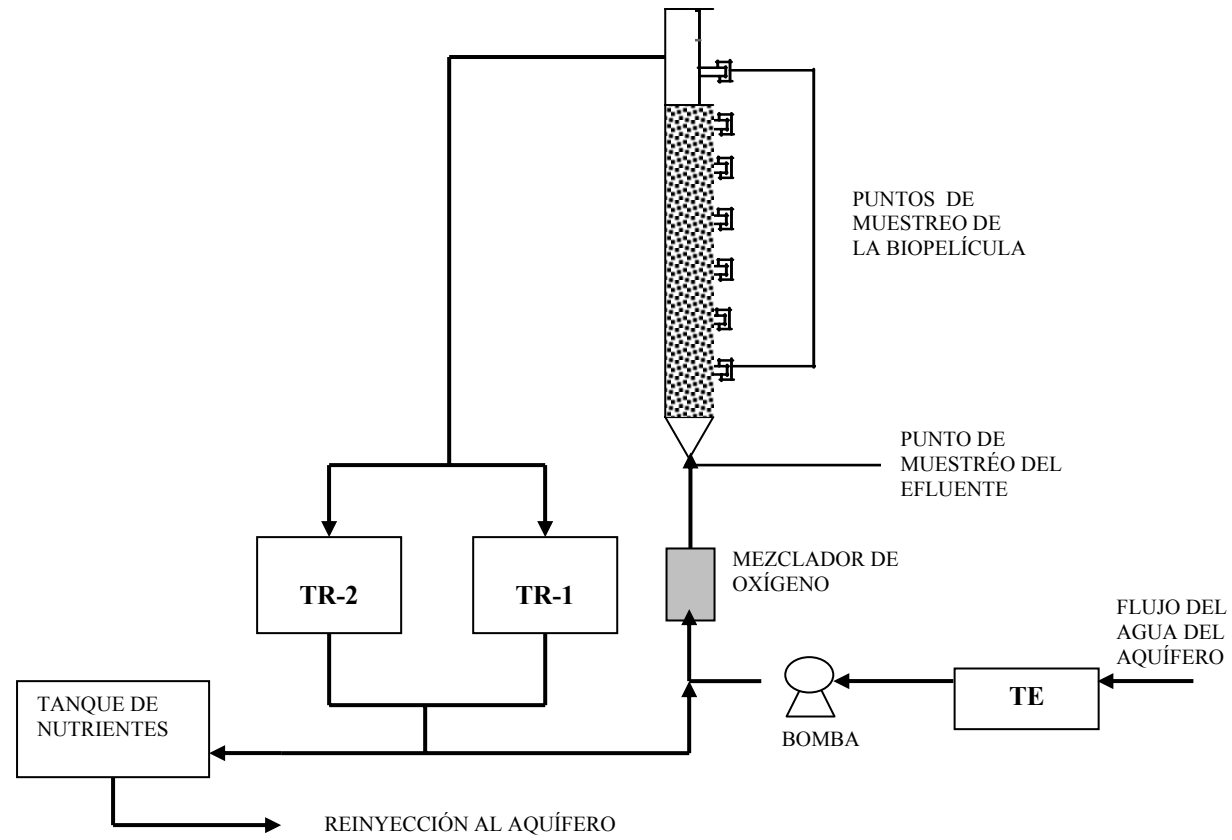


Figura 1. Representación esquemática del Biorreactor de lecho fluidizado de la UPR- Recinto de Mayagüez. TE = tanque de ecualización, TR = tanque de recepción



El monitoreo de los parámetros físicos se realizó mediante el uso del Verificador de Calidad de Agua U-10 de HORIBA®, el cual a través de sus electrodos mide simultáneamente los parámetros a monitorear. La concentración de oxígeno fue medida en mg/L, turbidez en Unidades de Turbidez Nefelométrica (NTU), pH en un rango de 0 a 12 unidades y temperatura en grados Celsius (°C).

Para la determinación de nutrientes, en cada una de estas unidades de muestreo se tomaron 250 ml de agua que se colocaron en frascos oscuros de polietileno y los cuales se transportaron y conservaron en hielo hasta su procesamiento respectivo. Las muestras de agua para cuantificación de amonio, al momento de su vertido en el frasco oscuro, fueron acidificadas con 0.2 ml de ácido sulfúrico 1N. La cuantificación de nutrientes se realizó por nefelometría a 600 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro HACK modelo DR/4000U; siguiendo los métodos que este equipo provee para cada tipo de nutriente y que corresponden a los códigos 8155, 8171 y 8048 para cuantificación de amonio, nitratos y fosfatos respectivamente. Todas aquellas muestras cuya lectura en el espectrofotómetro indicaron que la concentración del nutriente se encontraba sobre el límite de detección (“over range”), fueron diluidas con agua destilada. A dicha dilución se le volvió a medir la concentración del nutriente y el valor obtenido fue corregido por el factor de dilución correspondiente.

### **Monitoreo de la concentración de TPH y BTX**

Al inicio y final de cada ciclo de tratamiento, se colectaron muestras de agua asepticamente del tanque de equalización (TE) afluente y del efluente (tanques de recepción TR1 y TR2), respectivamente. Para la determinación de hidrocarburos

totales de petróleo (TPH), las muestras de agua fueron colectadas en frascos de 500 ml de capacidad, color ámbar, previamente esterilizados. Para la determinación de BTX, las muestras de 10 ml fueron colectadas en frascos de vidrio esterilizados que contenían 0.2 ml de ácido clorhídrico 5N; estos frascos fueron rápidamente sellados, rotulados y colocados en hielo para su transporte y conservación hasta el momento del análisis.

La determinación de la concentración de TPH se realizó mediante el uso de un “Site Lab UVF Analytical Test Kit” para TPH. Este equipo se calibró con soluciones estándar a fin de generar y guardar en su memoria una curva patrón de concentración de TPH frente a su fluorescencia en luz ultravioleta, utilizándose como blanco el metanol. De diluir la muestra, el valor dado por el equipo fue corregido por el respectivo factor de dilución. La concentración de TPH es reportada en partes por millón (ppm). La determinación de BTX se hizo por cromatografía de gases (GC), según el método descrito por Tang *et al.*, (1999), utilizando un GC de PERKIN ELMER® modelo AS9000 que emplea helio como medio de transporte. La lectura es expresada en partes por millón (ppm) y la concentración de BTX fue determinada mediante comparación de las áreas de los picos del cromatograma con una curva estándar de concentración de BTX.

La determinación de estos dos parámetros también fue realizada por un laboratorio particular: Alchem Laboratory Inc., como una forma de control o verificación de nuestros resultados mediante los métodos EPA 8015B y SW 846-8021 para TPH-gasolina y BTX, respectivamente.

## Recuento y aislamiento microbiano

A partir de muestras de agua del afluente y efluente del biorreactor y muestras del carbón activado presente al interior del biorreactor se realizó la cuantificación y el aislamiento de las bacterias presentes en el proceso de biorremediación. Las muestras fueron recolectadas asépticamente en bolsas Whirl Pack® de 250 ml que se transportaron en hielo y que se mantuvieron en refrigeración hasta el momento de su procesamiento (a 2 h o menos de su recolección). De las muestras de carbón activado se extrajeron las bacterias adheridas a su superficie empleando por cada 0.2 g de carbón activado 1 ml de Solución de Extracción cuya composición es Tween 20 0.004 M, peptona 0.01%, extracto de levadura 0.007% y amortiguador de fosfatos para aforar a 1 L (Massol-Deyá *et al.*, 1995). A partir del sobrenadante generado se transfirieron 100 µl a un sistema de diluciones de  $10^{-2}$  a  $10^{-7}$ . Para el recuento de la flora bacteriana presente se utilizaron platos de Petri conteniendo medio de cultivo R<sub>2</sub>A en cuya superficie se dispersó 0.1 ml de muestra o de las diluciones de la misma. Realizada la siembra, se procedió a incubar a 25 °C por 2 a 5 días, al cabo de los cuales se procedió a determinar el número de unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro o gramo de muestra.

A partir de los platos de cultivo para recuento bacteriano se aislaron diferentes morfotipos coloniales. Para cada morfotipo se anotó su fecha de aislamiento, procedencia, color y tamaño de la colonia. Cada colonia aislada fue transferida a un tubo con tapa de rosca conteniendo medio R<sub>2</sub>A y se le asignó un código de acuerdo a su procedencia y orden de aislamiento: “BW” para las procedentes del agua de biorreactor, “BC” para las del carbón activado, “A” para las del afluente y “E” para

las del efluente. Los tubos así inoculados fueron incubados a 25°C por 3 a 5 días hasta el total desarrollo de la cepa. La conservación de estos cultivos fue en refrigeración y en medio Luria Bertani (LB) con glicerol (20%) como preservante y crioprotector.

### **Caracterización de la comunidad microbiana**

La caracterización de las poblaciones bacterianas aisladas a partir de las muestras de agua o del carbón activado del biorreactor fue realizada en dos etapas. La primera etapa consistió en una caracterización preliminar basada en características microscópicas de forma, dimensiones (diámetro y longitud), reacción frente a la coloración de Gram y crecimiento en gasolina como única fuente de carbono. La segunda etapa consistió en una caracterización molecular mediante análisis de restricción de las moléculas de 16S rDNA, Box-PCR y secuenciación de los genes de 16S rRNA. Asimismo, la estructura de la comunidad bacteriana del reactor fue visualizada mediante microscopía electrónica de rastreo y de fluorescencia.

#### *Determinación del crecimiento en gasolina como única fuente de carbono*

Cada cepa fue inoculada en medio LB e incubada a 25°C por 12 horas y, luego, se separaron las bacterias del medio de cultivo mediante la centrifugación de 1 ml del cultivo a 7,500 rpm por 10 min. Las células así obtenidas fueron lavadas dos veces consecutivas con solución al 0.85% de cloruro de sodio (SSF) estéril y finalmente resuspendidas en 100 µl. Esta solución constituyó el inóculo para las pruebas de esta etapa. Se prepararon platos Petri con medio Bushnell-Hass (BH), medio Bushnell-

Hass suplementado con gasolina al 0.1% como única fuente de carbono (BHG) y medio R<sub>2</sub>A. Cada cepa bacteriana fue inoculada en dos platos de BH, dos platos de BHG y un plato de R<sub>2</sub>A; aplicando en cada plato 20 µl del inóculo preparado. Los platos de R<sub>2</sub>A fueron los controles de crecimiento y viabilidad del inóculo, un plato de BH y de BHG fueron incubados en una atmósfera con vapores de gasolina y el otro en una atmósfera sin vapores de gasolina. Todos los platos fueron incubados en aerobiosis, a 25 °C y en oscuridad, por 3 a 10 días.

#### *Visualización de la comunidad microbiana*

Para la visualización de la comunidad microbiana de la superficie del carbón activado y la biopelícula flotante mediante microscopía electrónica de rastreo, se tomaron muestras que se procesaron, observaron y fotografiaron de acuerdo a lo establecido por Massol-Deyá *et al.* (1997). Muestras de biopelícula también fueron procesadas para microscopía de fluorescencia; para lo cual se fijaron en tampón de fosfatos 0.1 M (pH 7.1) con glutaraldehído al 4% por 1h, lavaron en tampón fosfato 0.1 M por 10 min y se montaron alicuotas de 10 µl en láminas portaobjetos que se tiñeron con una gota de 4',6- Diamidino-2-fenilindol (DAPI) por 5 min y en oscuridad. Estas muestras se observaron en un microscopio Olympus de fluorescencia modelo BX2 equipado con un filtro XF02-2 de Omega Optical Inc (excitación máxima a 440 nm).

#### **Tipificación genética**

La identificación de las cepas aisladas se realizó mediante técnicas moleculares de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para esto, se llevaron a

cabo etapas secuenciales de extracción de DNA, amplificación del 16S rDNA y generación de patrones de bandas mediante su corte con enzimas de restricción (ARDRA), amplificación de secuencias repetitivas mediante la técnica de Box PCR y secuenciación del 16S rDNA. A todas las cepas aisladas se les tipificó mediante ARDRA, pero el análisis de Box-PCR y la secuenciación sólo fue aplicada a aquellas cepas que evidenciaron desarrollo con gasolina como única fuente de carbono.

#### *Extracción de DNA de las cepas bacterianas*

A partir de sedimentos bacterianos se procedió a la extracción de DNA utilizando “DNAeasy™ Tissue Kit de QIAGEN®”. Terminada la extracción de DNA, se procedió a su verificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % en solución amortiguadora de Tris Ácido Acético EDTA (TAE) utilizando como marcador  $\lambda$  cortado con la enzima Hind III, 1  $\mu$ l de colorante (“Loading Dye”) 6x (Promega®, G 1881) y una intensidad de corriente de 75 voltios por 2 a 3 h. Para la visualización de las bandas de DNA se tiñó el gel en una solución de bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/ml) por 30 minutos y se llevó a un transiluminador de radiación UV, donde se tomó una fotografía del mismo.

#### *Segregación de grupos bacterianos por el método de ARDRA*

ARDRA consiste en la amplificación de la región 16S rDNA, su corte con enzimas de restricción y la visualización del patrón de bandas generado mediante electroforesis en agarosa. Todos los cultivos aislados fueron caracterizados mediante ARDRA. Para la amplificación del 16S rDNA se hizo reaccionar por cada cultivo 2.5 mM de cloruro de magnesio, 30  $\mu$ g de albúmina sérica bovina (BSA), 5 $\mu$ l de

solución amortiguadora para PCR, mezcla de desoxirribonucleótidos con 2.5 mM de cada uno, 40 pmol de iniciador 8F (Coates *et al.*, 1998) e iniciador 1392R (Bachoon *et al.*, 2001), 5 u de polimerasa Taq, 70 a 100 ng de DNA y agua destilada para completar a 50 µl el volumen de reacción. La amplificación se realizó en un termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 con un programa de 1 minuto a 94 °C, 35 ciclos de 1 minuto a 92 °C, 2 minutos a 52 °C y 2 minutos a 72 °C, y una extensión final de 6 minutos a 72 °C.

La visualización del fragmento amplificado se hizo por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Confirmada la amplificación del 16S rDNA, se cortó con las enzimas de restricción *Hae* III, *Hinf* I y *Rsa* I (Promega®) colocando por cada tipo de enzima 10 µl del 16S rDNA que contenía aproximadamente 1 µg de DNA, 1.5 µl de amortiguador enzimático (10X), 0.2 µl de BSA y 0.5 µl de enzima de restricción (20 U/µl) para un volumen final de 15 µL. Esta solución fue incubada a 37 °C por 3 horas. La visualización se hizo por electroforesis en gel de agarosa al 2.5% con pGEM cortado con *Hae* III como marcador. Los patrones de bandas generados fueron visualizados y fotografiados luego de teñir con bromuro de etidio. Las fotografías fueron posteriormente digitalizadas para ser analizadas con Gel-Pro Analyzer™ y obtener datos acerca del tamaño de cada una de las bandas. Los datos generados en Gel-Pro fueron transcritos en una matriz binomial y analizadas en SYSTAT 9.0®.

#### *Segregación de cepas por Box-PCR*

La amplificación y tipificación de las secuencias repetitivas de tipo A1R de las cepas se logró haciendo reaccionar por cada muestra 0.4 µg BSA, 2.5 µl dimetil

sulfóxido al 10% (DMSO), 0.2  $\mu$ l de Tween 20, 5  $\mu$ l de amortiguador GR 5x, mezcla de desoxirribonucleótidos con 2.5 mM de cada uno, 40 pmol de iniciador Box A1R (Miteva *et al.*, 1999), 2.5 u de polimerasa Taq, 50 ng de DNA bacteriano y agua destilada para un volumen final de 25  $\mu$ l. La amplificación se realizó con un programa de un periodo inicial de desnaturalización de 7 minutos a 95 °C, 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 52 °C y 8 minutos a 65 °C, y una extensión final de 15 minutos a 65 °C. La visualización fue en gel de agarosa Metaphor al 2.5% en TAE con pGEM cortado con *Hae* III como marcador. Los patrones de bandas generados fueron visualizados y fotografiados luego de teñir con bromuro de etidio. Las fotografías fueron posteriormente digitalizadas para ser analizadas con Gel-Pro Analyzer™ y obtener datos del tamaño de cada una de las bandas. Los datos generados en Gel-Pro fueron transcritos en una matriz binaria y llevadas al programa SYSTAT 9.0® para realizar análisis de grupo.

#### *Secuenciación del 16S rDNA*

El 16S DNA ribosomal de 20 poblaciones con crecimiento en gasolina como única fuente de carbono fue enviado para su secuenciación al Centro de Ecología Microbiana de la Universidad Estatal de Michigan. Para este envío, el 16S rDNA de cada cepa fue separado por electroforesis en gel de agarosa al 2%. La banda correspondiente de aproximadamente 1,500 pb fue extraída y lavada con el “QIA quick PCR Purification Kit” de QIAGEN®, y se colocó en un microtubo a una concentración de 20 a 80 ng del 16S rDNA purificado con 30 pmol de uno de los iniciadores en un volumen final de 12  $\mu$ l. Esto se hizo por duplicado, usando en uno de los microtubos el iniciador 8F y en el otro el iniciador 1392R. Las secuencias



obtenidas, en ambas direcciones, fueron procesadas y comparadas con el banco de datos del programa Ribosomal Data Base (RDP) de la Universidad Estatal de Michigan (Cole *et al.*, 2003) para establecer la identidad y posición filogenética de estas bacterias.

### **Identificación fenotípica**

#### *Perfil de utilización de fuentes únicas de carbono (Análisis Biolog<sup>®</sup>) de las cepas con crecimiento en gasolina*

Para esta prueba, una colonia de cada cultivo tipificado por Box PCR fue transferido a un plato con medio LB y se incubó a 25 °C por 3 a 5 días. A partir de este cultivo, se preparó una suspensión densa en SSF (20 ml) con aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/ml (tubo #8 del nefelómetro de MacFarland) que sirvió como inóculo para una microplaca de Biolog<sup>®</sup> GN/GP. La microplaca fue inoculada usando una multipipeta de ocho canales, vertiendo en cada pocillo 150 µl de la suspensión. Después de 24 o 48 horas de incubación el desarrollo de color fue medido como densidad óptica (OD) a 590 nm, usando un lector automático de placas (Tmax Molecular Device, Biolog Inc.). Los datos fueron generados usando el MicroLog 3N “soft-ware” (Biolog, Inc.) y fueron convertidos en una matriz binaria con la cual se hicieron análisis de grupos y generación de dendogramas empleando los programas Microsoft Excel<sup>®</sup> y Systat 9.0<sup>®</sup>.

#### *Crecimiento anaerobio y reducción de nitratos (NO<sub>3</sub>)*

Para esta prueba cada una de las cepas fue activada y llevada a una suspensión en SSF de manera similar a la prueba de Biolog<sup>®</sup>. A partir de cada

suspensión se inocularon 100  $\mu$ l en un tubo con Caldo Nitrato que contenía en su interior un tubo de Durham invertido. Cada cepa se trabajó por duplicado incluyéndose como control positivo un cultivo de *Pseudomonas stutzeri* y como control negativo un tubo con caldo nitrato inoculado con SSF. Todos los tubos fueron incubados en anaerobiosis y a 30°C por 5 días. La determinación de reducción de nitratos se hizo con ácido sulfanílico,  $\alpha$ -naftilamina y polvo de zinc. Un aumento en la turbidez del medio de cultivo, luego del periodo de incubación, fue tomado como resultado positivo para crecimiento en anaerobiosis y la presencia de burbujas en el tubo de Durham como positivo para la producción de nitrógeno molecular ( $N_2$ ) a partir de nitrato.

## **Resultados**

### **Tratamiento Biológico**

El proceso de biorremediación de agua contaminada con gasolina en el Recinto Universitario de Mayagüez, utilizando un biorreactor de lecho fluidizado, permitió la descontaminación del acuífero impactado. La unidad de biorremediación operó de manera discontinua con un paso de recirculación por 160 días, durante los cuales 50,000 litros de agua subterránea fueron tratados y reinyectados una vez se confirmó la remoción de hidrocarburos. El proceso implicó un total de 33 tandas; cada tanda se caracterizó por una operación microaerofílica a 25°C y pH neutral.

Los niveles de hidrocarburos fluctuaron de 112 a 2054 ppm de TPH, 4 a 60 ppm de benceno, 5 a 330 ppm de tolueno, 2 a 79 ppm de m- y p-xileno y de o-xileno 2 a 74 ppm (Apéndices 1 y 2). La remoción del 90% (en promedio) del contaminante fue obtenida luego del primer paso del agua por la unidad de tratamiento. Con un evento de recirculación, la remoción de hidrocarburos alcanzó 99.9% de eficiencia.

La remoción de TPH, luego de un periodo de recirculación, se caracterizó por un periodo de fluctuación de entre 10 a 30% de remoción para los 50 primeros días de operación y un periodo de estabilidad del día 53 en adelante (Figura 2). Esta diferenciación de periodos operacionales no se observó en la remoción de BTX, cuyas tasas de remoción fueron constantes durante todo el proceso de remediación y de los cuales el tolueno fue el de más alto porcentaje de remoción inicial (88%) seguido por o-xileno (83%), benceno (80%) y m- y p-xileno (78%) (Figura 3).

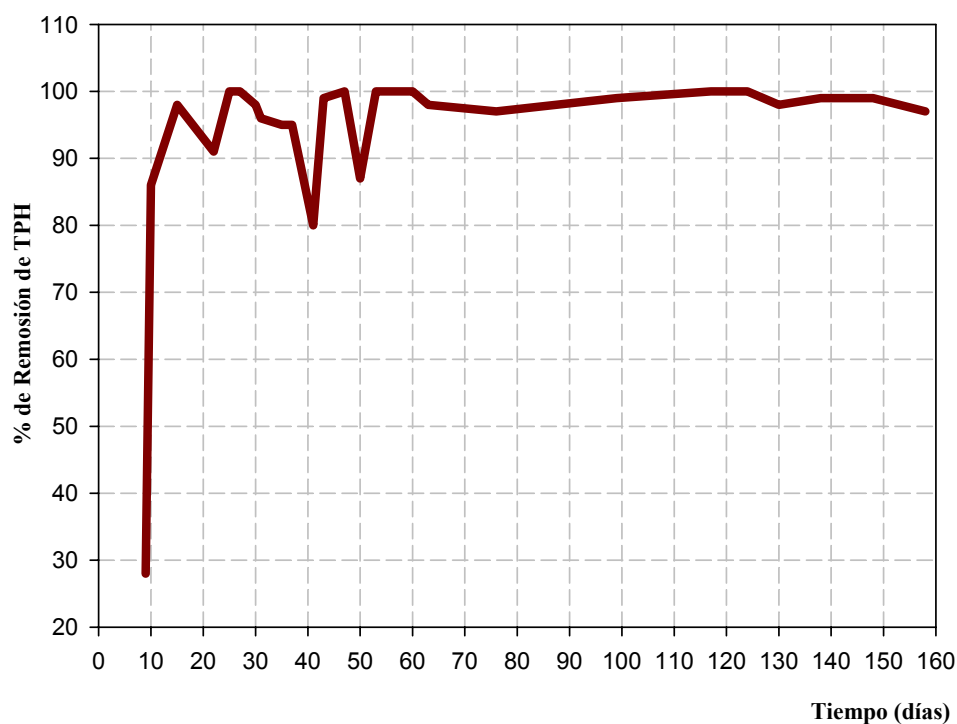


Figura 2. Porcentaje de remoción de hidrocarburos totales del petróleo (TPH) en el biorreactor de lecho fluidizado, luego de una etapa de recirculación.

El proceso de remediación también se caracterizó por una reducción promedio de 71% de la turbidez y un consumo promedio de oxígeno de 1.72 mg/L. La reducción de la turbidez del agua fluctuó entre 41 a 94%, siendo los días 1, 16, 42, 57, 91 y 154 los que tuvieron una reducción  $\geq 90\%$ , y los días 31 y 44 una reducción  $< 50\%$  (Figura 4, Apéndice 3). El consumo de oxígeno fluctuó entre 1.07 a 2.42 mg/L (Apéndice 4) y fue independiente de la concentración de gasolina (valores de TPH) presente en el agua a tratar (Figura 5). Así por ejemplo, en los días 23 y 138 que corresponden a las tandas 5 y 38, respectivamente, el consumo de oxígeno fue de aproximadamente 2.4 mg/L aún cuando la concentración de TPH fue de 112.5 y 2054 ppm, respectivamente.

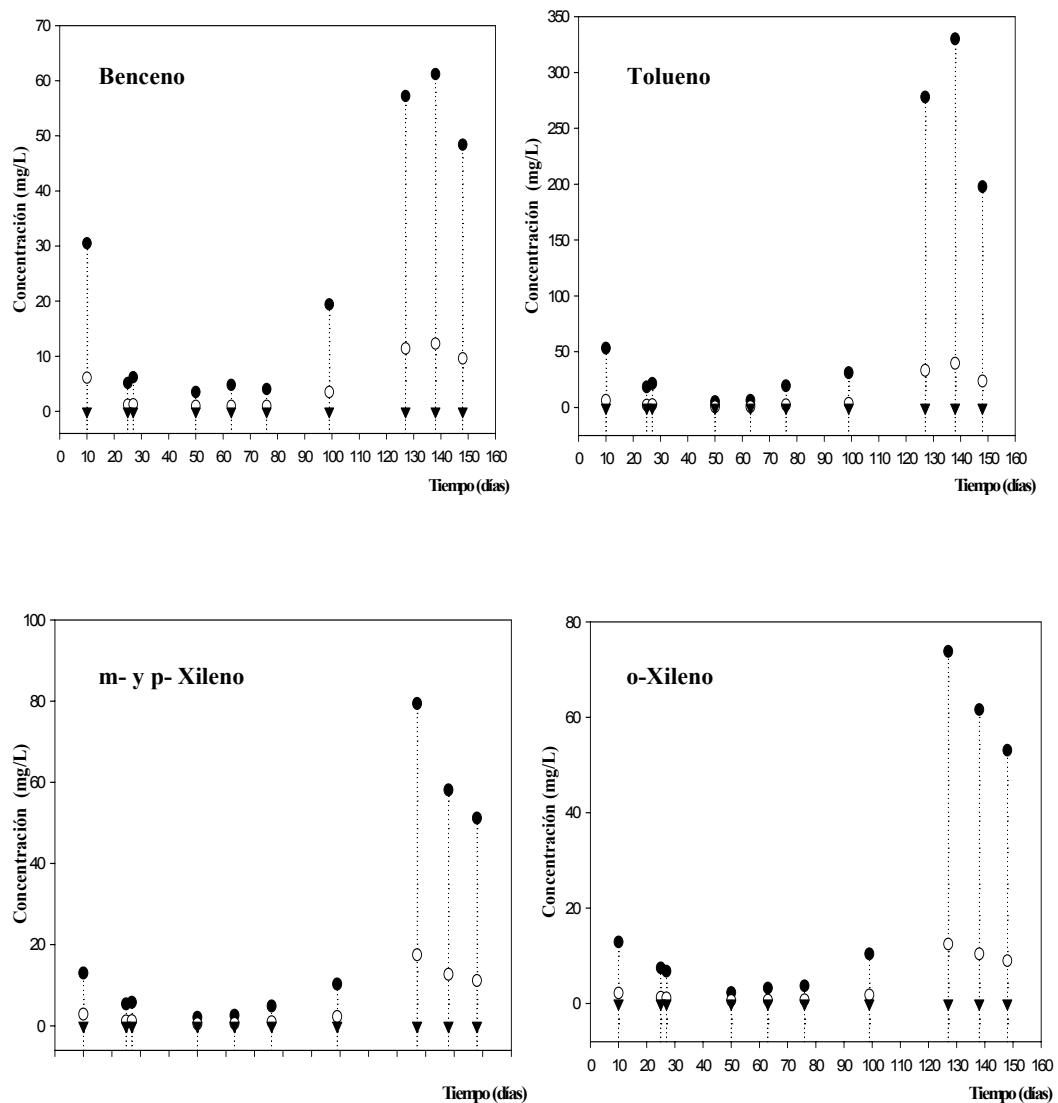


Figura 3. Concentración de benceno, tolueno y xileno durante el tratamiento de agua contaminada con gasolina en el biorreactor de lecho fluidizado.(●)= afluente, (○)= efluente, (▼)= efluente de recirculación

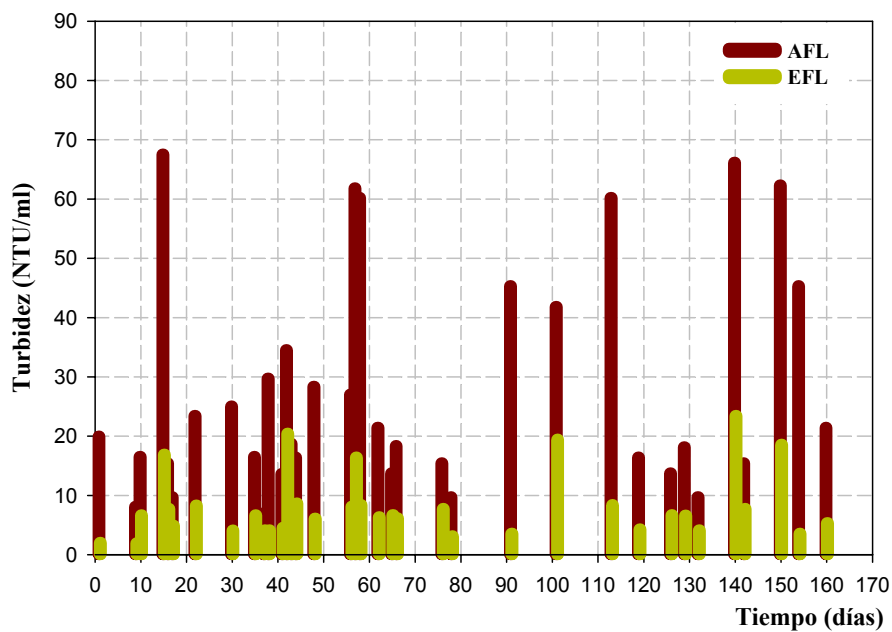


Figura 4. Turbidez (NTU/ml) en el afluente (AFL) y en el efluente (EFL) del biorreactor de lecho fluidizado

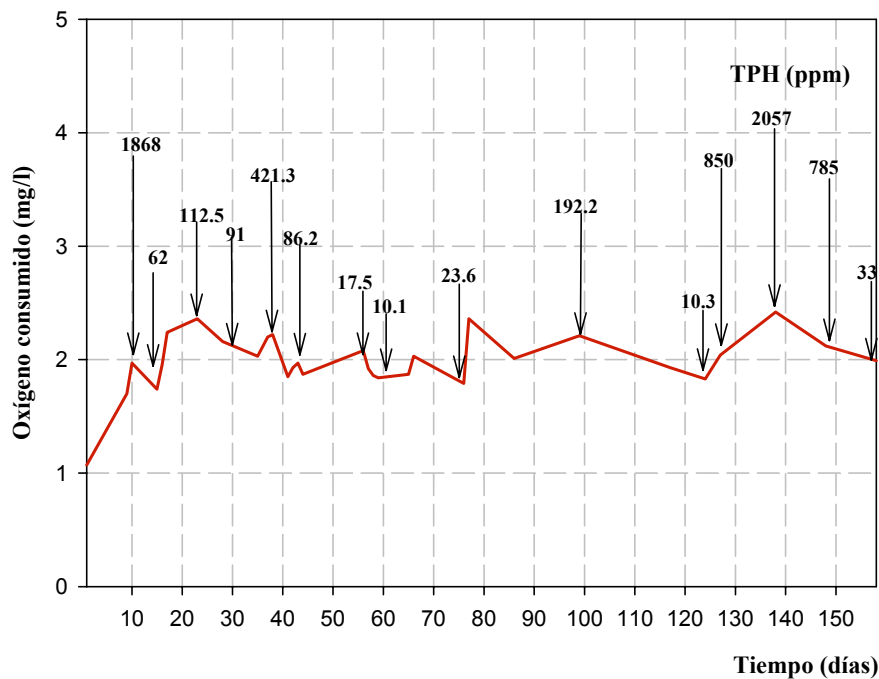


Figura 5. Consumo de oxígeno y cantidad de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) en el BCAR.

## Comunidad Microbiana

Durante el proceso de biorremediación la comunidad bacteriana en el reactor alcanzó una densidad aproximada de  $10^{12}$  UFC/reactor que se distribuyó entre el carbón activado y el medio acuoso del reactor (Tabla 1). El carbón activado utilizado se caracterizó por una buena porosidad y una superficie con un gran porcentaje de áreas rugosas (Figura 6). Sin embargo, la población que se adhirió al carbón activado alcanzó un máximo de  $3 \times 10^7$  UFC/g el día 9<sup>no</sup> de operación del BAC y a partir de ese día disminuyó hasta  $10^4$  UFC/g; en cambio, la población presente en la columna de agua aumentó conforme disminuyó la del carbón, que paulatinamente se desagregó y se caracterizó por formar una biopelícula flotante y adherida a la superficie interna del reactor. La biopelícula fue visualizada mediante microscopía electrónica de rastreo (Figura 7a) y microscopía de fluorescencia con DAPI (Figura 7b), observándose que estaba constituida por numerosas bacterias de diversa morfología inmersas en una matriz de polisacáridos.

De las colonias obtenidas para el recuento bacteriano se aislaron 162 cultivos bacterianos que se caracterizaron por su morfología, tinción Gram y crecimiento en medios con gasolina como única fuente de carbono (Apéndice 5). Por su morfología y reacción a Gram, un 75% de los cultivos son bacilos gram-negativos, 19% bacilos gram-positivos, 5.4% cocos gram-negativos y 0.6% cocos gram-positivos (Figura 8a). Un 53% (86) de los cultivos crecieron en medios mínimos suplementados con gasolina como única fuente de carbono (58% utilizaba componentes volátiles, 10% compuestos alifáticos y el 32% ambos componentes (Figura 8b). El crecimiento de las cepas BW23, BW 26, BC24, E27 al E30 y E33 fue inhibido por la presencia de componentes alifáticos, tanto cuando eran la única fuente de carbono como cuando

estaban conjuntamente con los componentes volátiles; lo cual indicaría que estas cepas son especialistas de volátiles. En cambio, la cepa BW24 es un especialista de alifáticos ya que su crecimiento fue inhibido por la presencia de componentes volátiles.

Tabla 1. Recuento de la comunidad bacteriana (UFC/ml) presente en el proceso de biorremediación de agua contaminada con gasolina.

Día	Afluente	Procedencia		Efluente
		Agua	Biorreactor Carbón Activado	
1	$2 \times 10^6$	$6 \times 10^3$	$1 \times 10^4$	$3 \times 10^2$
4	$5 \times 10^6$	$4 \times 10^3$	$3 \times 10^4$	$3 \times 10^3$
9	$2 \times 10^6$	$7 \times 10^4$	$3 \times 10^7$	$2 \times 10^3$
22	$3 \times 10^7$	$1 \times 10^5$	$7 \times 10^6$	$5 \times 10^4$
36	$8 \times 10^7$	$3 \times 10^5$	$2 \times 10^6$	$1 \times 10^4$
37	$2 \times 10^7$	$9 \times 10^6$	$1 \times 10^6$	$2 \times 10^5$
41	$1 \times 10^8$	$2 \times 10^7$	$4 \times 10^5$	$1 \times 10^5$
42	$1 \times 10^8$	$8 \times 10^7$	$2 \times 10^5$	$5 \times 10^6$
45	$2 \times 10^8$	$5 \times 10^8$	$4 \times 10^4$	$3 \times 10^7$
53	$2 \times 10^9$	$7 \times 10^8$	$1 \times 10^4$	$4 \times 10^7$



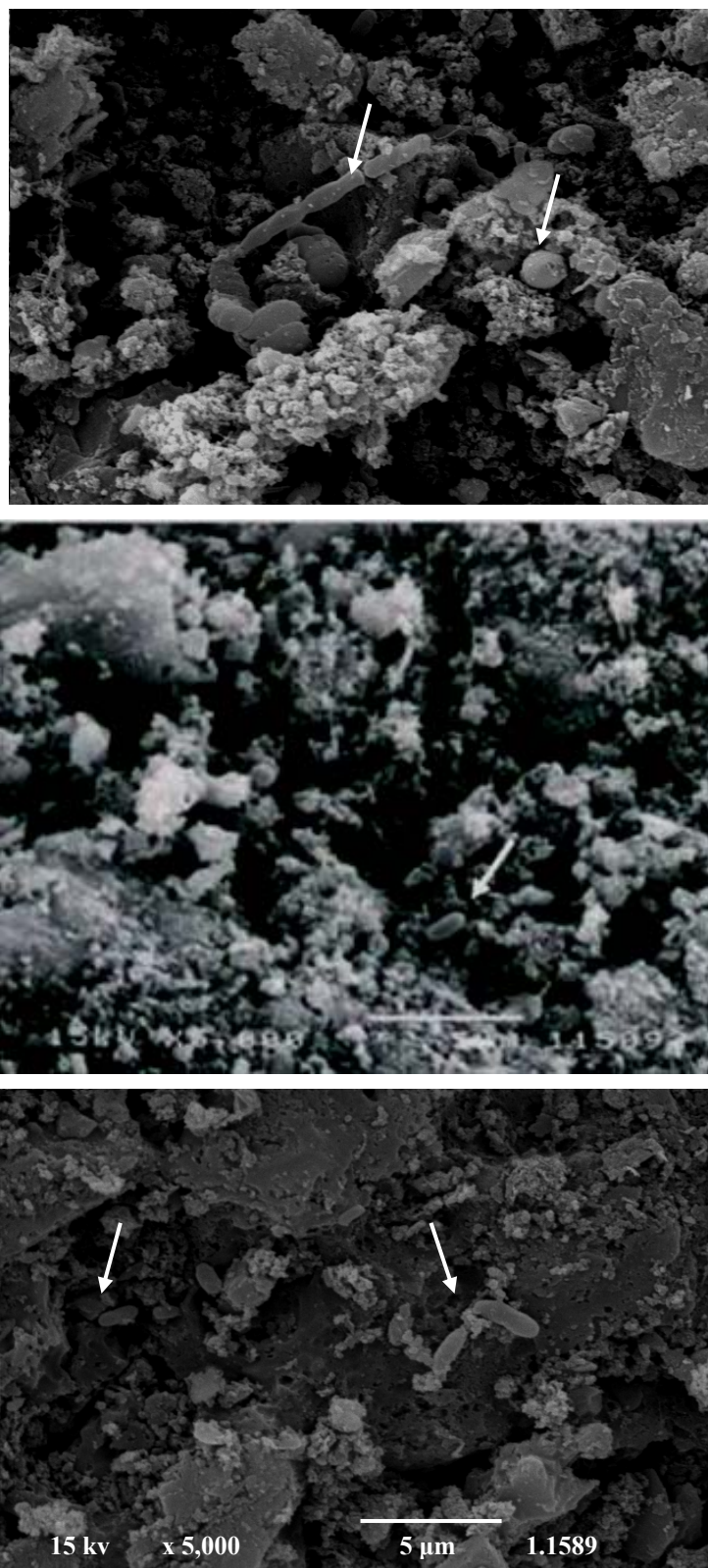


Figura 6. Microscopía electrónica de rastreo de la superficie del carbón activado usado como medio de soporte en el BAC del RUM. Las flechas señalan algunas de las bacterias adheridas a la superficie del carbón.

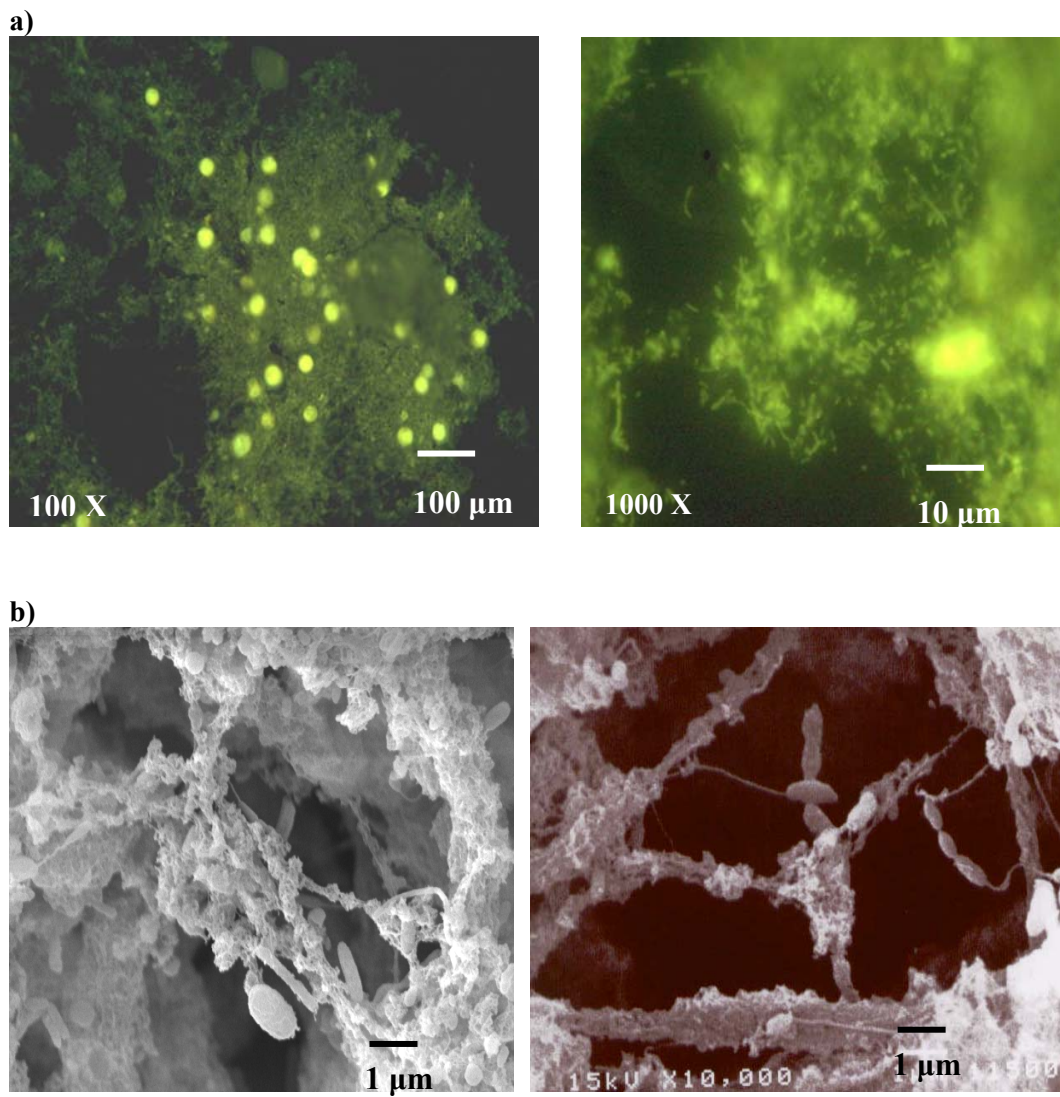


Figura 7. Microscopía del “biofilm” flotante de la columna de agua del BCAR: (a) Fluorescencia con DAPI (a 100 X y 1000 X) y (b) Microscopía electrónica de rastreo (10,000 X).

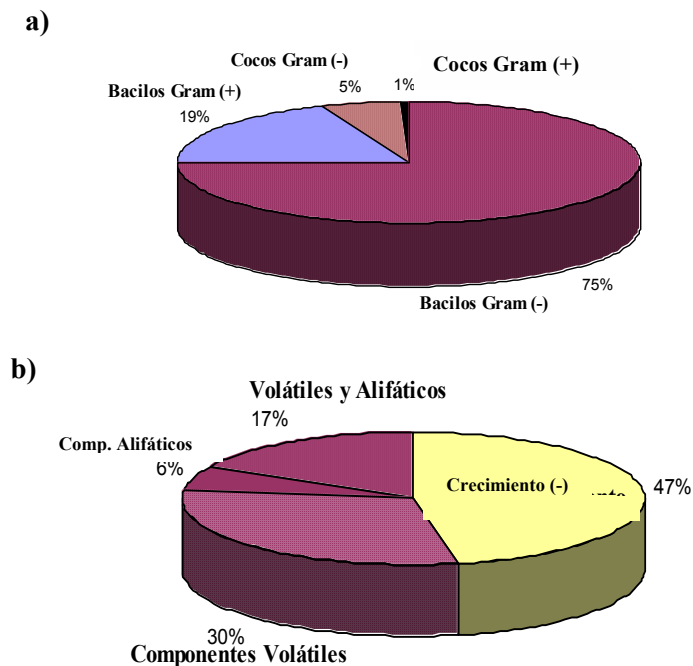


Figura 8. Distribución de las cepas aisladas del BAC por su (a) morfología y reacción a Gram y (b) crecimiento en medio mínimo con gasolina como única fuente de carbono.

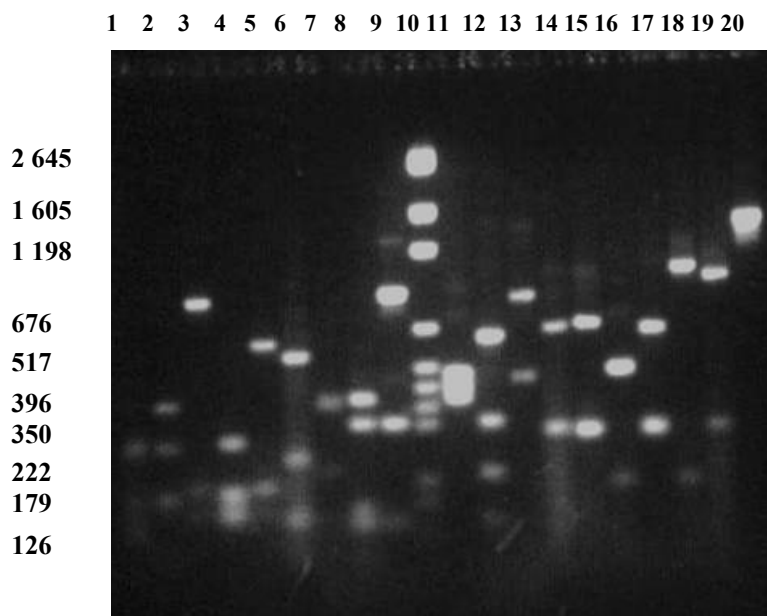


Figura 9. ARDRA del 16S rDNA de seis cepas cortado con *Hae* III (carriles 1 al 6), *Hinf* I (carriles 7 al 9 y 11 al 13) y *Rsa* I (carriles del 14 al 19). Carril 10, marcador (pGEM cortado con *Hae* III) y el carril 20 es el control (16S rDNA sin cortar). A la derecha se muestra el tamaño en pb de cada una de las bandas del marcador.

La diversidad genética de los aislamientos fue verificada por ARDRA. Un fragmento de 1,500 pb fue obtenido de cada reacción de amplificación con los iniciadores universales 8F y 1932R; tamaño que es consistente con el preestablecido para los genes de 16S rRNA de las bacterias. La digestión de estos fragmentos generaron patrones de restricción constituidos por 2 a 7 bandas de entre 100 a 1,100 pb (establecido por comparación con el marcador pGEM cortado con *Hae* III). La figura 9 muestra el producto de restricción del 16S rDNA de las cepas BW7, BW8, BW9, BW10, BW12 y BW16 por las enzimas *Hae* III (carriles 1 al 6), *Hinf* I (carriles 7 al 9 y 11 al 13) y *Rsa* I (carriles 14 al 19).

Con la información derivada de los patrones de restricción del 16S rDNA de los 162 cultivos se generó un dendograma (Figura 10) que revela la existencia de una amplia variación genética entre los cultivos aislados. Se tomó un valor de corte de 0.2 DE (distancia euclidiana), para establecer el número de unidades taxonómicas operacionales (UTO) en que se diferencian los patrones de bandas generados. Los cultivos se diferenciaron en 91 UTO que se agruparon en 90 grupos distintivos: de los cuales, el 40% están compuestos por dos o más cultivos (grupos de amplia distribución o frecuencia) y el 60% restante son grupos particulares (especialistas). El 53% (48 grupos) incluyen cultivos con crecimiento en gasolina como única fuente de carbono y el 16% (14 grupos) incluyen cultivos gram-positivos. Ninguno de los UTO mostró analogía con las cuatro especies de *Pseudomonas* cuyos patrones de ARDRA, para las tres enzimas de restricción utilizadas, fueron tomados como patrones de comparación.

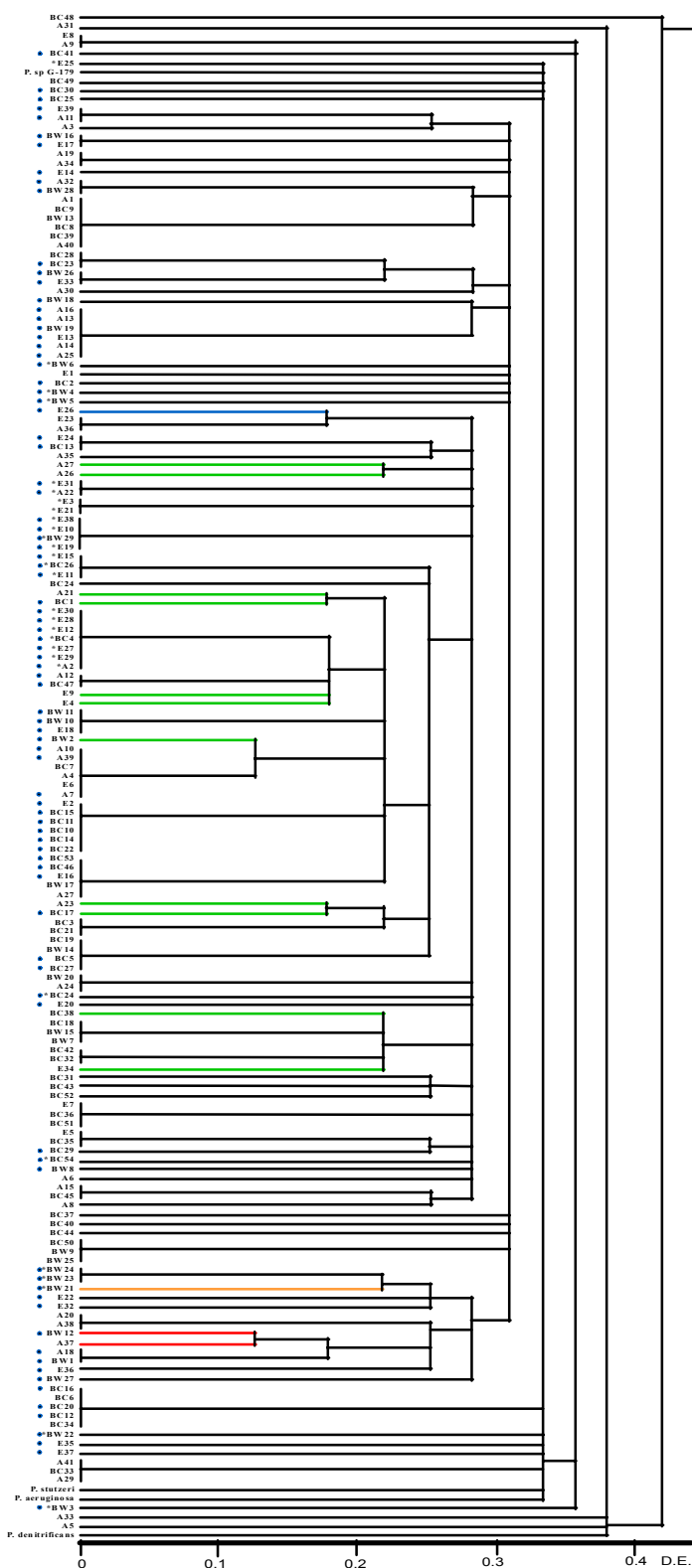


Figura 10. Análisis de grupo de patrones ARDR de 162 cultivos bacterianos aislados del biorreactor. (\*) gram -positivas, (•) cepas con crecimiento en gasolina como única fuente de carbono, DE = distancia euclidiana

De los cultivos con crecimiento en medio mínimo suplementado con gasolina, 66 fueron gram-negativos y 20 gram-positivos; éstas cepas fueron caracterizadas mediante la amplificación Box-PCR de las regiones repetitivas de tipo A1R presente en su genoma. Este análisis genera patrones de bandas distintivos, que caracterizan a una cepa y la diferencian de otras como puede observarse en la figura 11. La imagen muestra el producto de Box-PCR de 9 cepas aisladas del afluyente. Mientras algunas cepas generan un mismo patrón de bandas y por ende corresponden a un mismo genotipo (carriles 2 y 3; 6 y 8), otras poseen patrones distintivos.

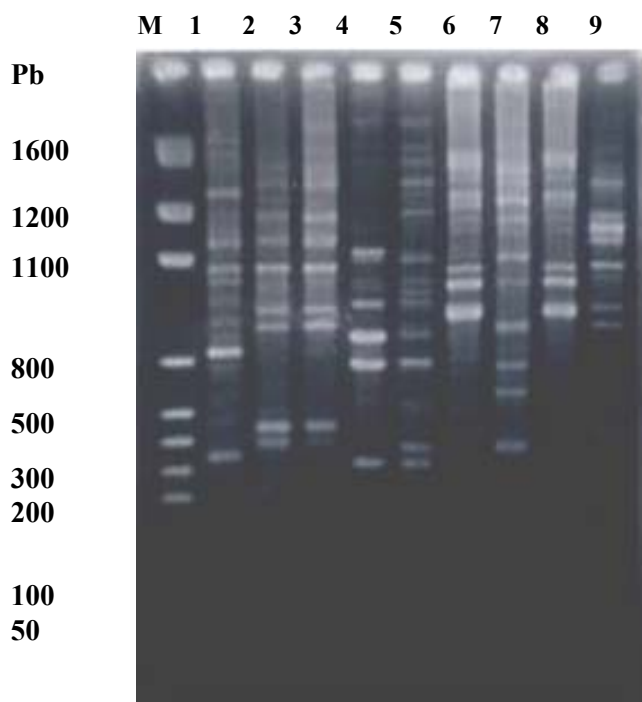


Figura 11. A1R Box-PCR del genoma de nueve cepas con crecimiento en medio mínimo suplementado con gasolina como única fuente de carbono. El carril M corresponde al marcador pGEM.

El análisis de grupo de los perfiles genotípicos de las cepas degradadoras de hidrocarburos (Figura 12) establece la presencia de 52 cepas que se distribuyen en 50 grupos (12 corresponden a bacterias gram-positivas). Cepas como la A11, A22, BC4, BC10, BC12, BC13, BC26, BC46, BC47, BW1, BW16, BW19, BW23, BW26, BW28 y BW29 fueron aisladas en más de una ocasión y a partir de más de una fuente de aislamiento (amplia distribución); en cambio, las cepas A7, BW23 y E12 fueron aisladas en más de una ocasión pero a partir de la misma fuente (especialistas).

Los diferentes genotipos según Box-PCR fueron posteriormente caracterizados por el método de identificación bacteriana Biolog<sup>®</sup> (Apéndice 6) así como por pruebas de crecimiento anaerobio y reducción de nitratos (Apéndice 7). Los resultados de Biolog<sup>®</sup> muestran que las 52 poblaciones no están metabólicamente relacionadas y que un 70% de las gram-negativas (Figura 13) y un 75% de las gram-positivas (Figura 14) no fueron identificadas por este método. En el grupo de las bacterias gram negativas, 11 cepas fueron identificadas como pertenecientes a 9 especies de 8 géneros diferentes, y en el grupo de las gram positivas, el sistema Biolog<sup>®</sup> sólo identificó a tres de las cepas como pertenecientes a tres especies de géneros diferentes. El 81% de las cepas (42) crecieron anaeróbicamente y lo hicieron reduciendo nitratos, pero sólo el 21% de ellas lo redujo hasta nitrógeno molecular (N<sub>2</sub>). Sólo un 19% de las cepas degradadoras fueron de metabolismo exclusivamente aerobio mientras las demás poseen la capacidad de crecer tanto en presencia como en ausencia de oxígeno.

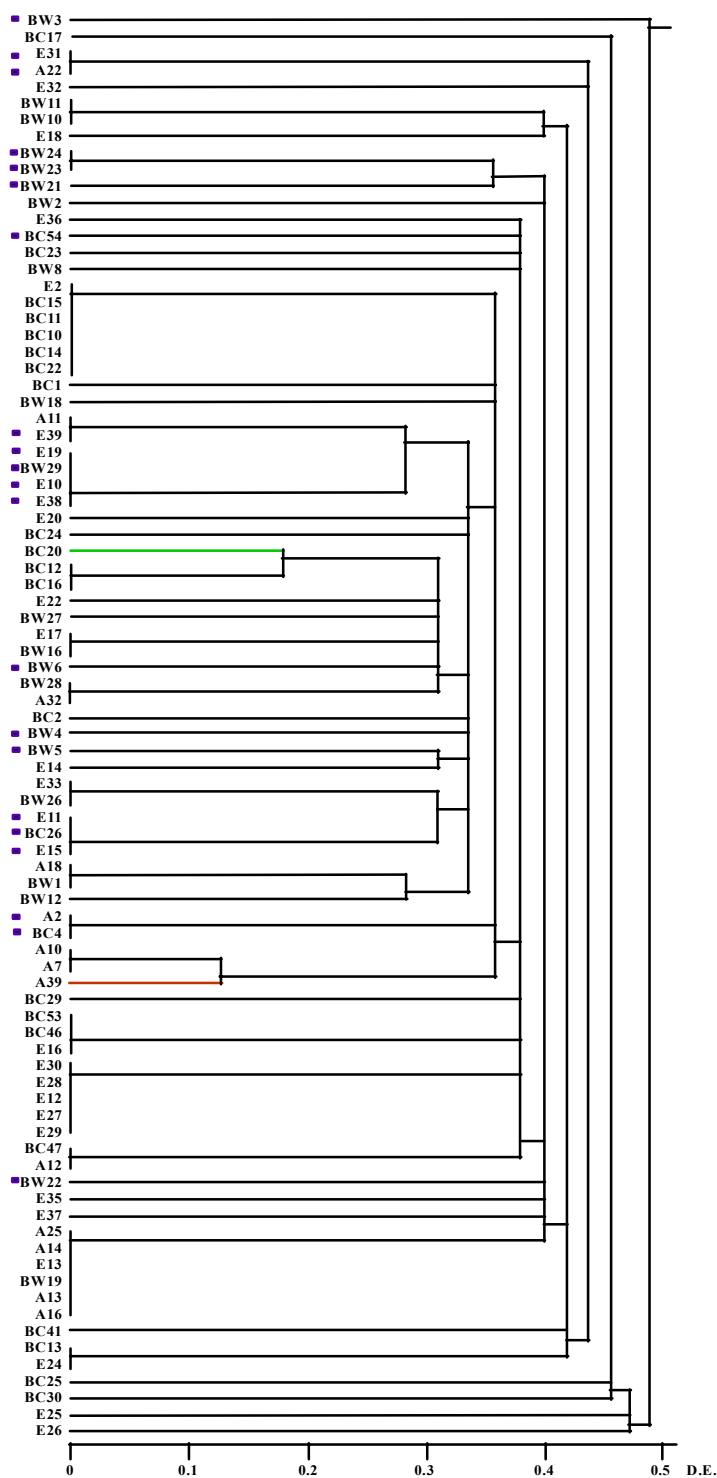


Figura 12. Análisis de grupo de los patrones de Box-PCR de las cepas degradadoras de hidrocarburos aisladas del biorreactor. (■) gram -positivas.



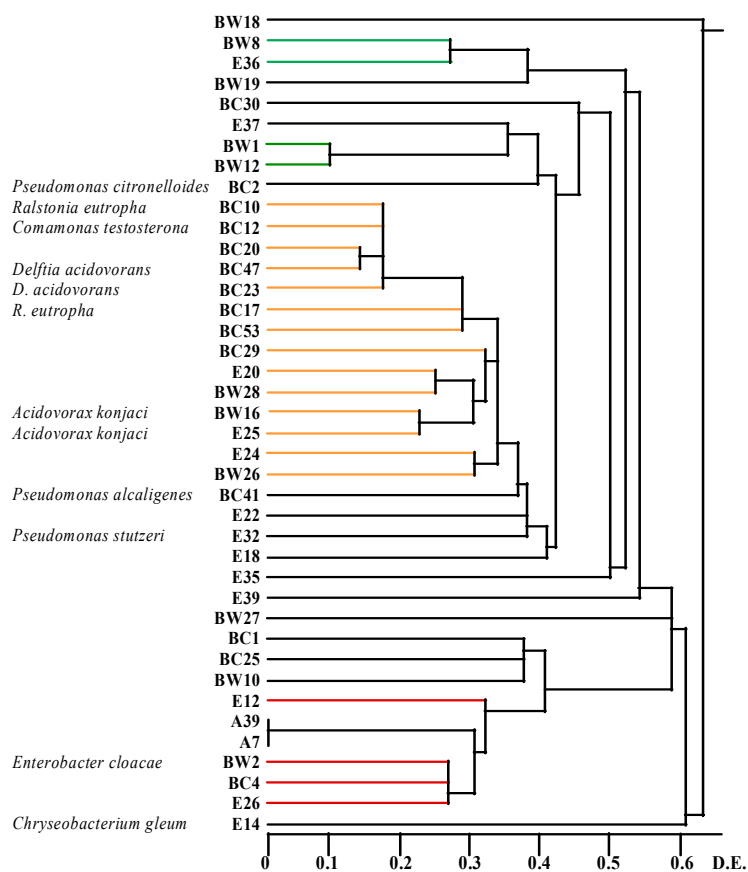


Figura 13. Dendrograma de cepas gram-negativas con crecimiento en gasolina basado en BIOLOG GN (DE, distancia euclidiana).

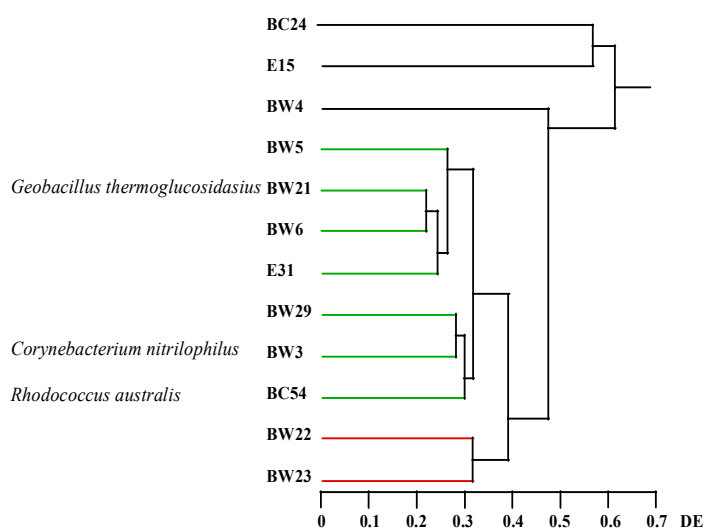


Figura 14. Dendrograma de cepas gram-positivas con crecimiento en gasolina basado en BIOLOG GP (DE, distancia euclidiana).

Finalmente, el 16S rDNA de veinte poblaciones degradadoras de hidrocarburos fue amplificado, secuenciado y comparado con las secuencias de la base de datos del “Ribosomal Data Base Project” (RDP) para establecer su identidad y posición filogenética. El análisis de estas cepas generó secuencias de entre 600 a 700 bases que representan cerca del 50% de la longitud del gen del 16S rRNA bacteriano, lo que permitió la determinación de homologías con coeficientes de similitud superiores a 0.8. El resultado de la comparación con la base de datos del RDP es mostrado en la tabla 2 y el análisis filogenético de las mismas mediante el programa PHYLIP<sup>®</sup> en la figura 15. En general, las cepas están filogenéticamente relacionadas con tres divisiones bacterianas: *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*, Proteobacteria y bacterias gram-positivas o Firmicutes. La división Proteobacteria fue la de mayor frecuencia al incluir a 13 de las cepas distribuidas en tres de sus subdivisiones: alfa, beta y gamma.

Tabla 2. Análisis de las secuencias del 16S rDNA de veinte cepas con crecimiento en gasolina como única fuente de carbono.

Cepa	Longitud (bases)	Organismo relacionado de la base de datos del RDP <sup>a</sup>	Sab <sup>b</sup>	División Filogenética
<b>BW2</b>	640	<i>Flavobacterium xylanivorum</i>	0.825	CBF <sup>c</sup>
<b>BW3</b>	589	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	0.960	gram-positiva (BAGC <sup>d</sup> )
<b>BW4</b>	663	<i>Bacillus cereus</i>	1.000	gram-positiva
<b>BW5</b>	644	<i>Renibacterium salmoninarum</i>	0.899	gram-positiva
<b>BW8</b>	633	<i>Comamonas</i> sp	0.961	γ-Proteobacteria
<b>BW10</b>	646	<i>Bosea thiooxidans</i>	0.924	α-Proteobacteria
<b>BW16</b>	672	<i>Acidovorax temperans</i>	0.989	β-Proteobacteria
<b>BW19</b>	547	<i>Acidovorax defluvii</i>	0.947	β-Proteobacteria
<b>BW22</b>	541	<i>Staphylococcus cohnii subsp urealyticum</i>	0.976	gram-positiva
<b>BW23</b>	628	<i>Bacillus cereus</i>	0.998	gram-positiva
<b>BC10</b>	606	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.946	γ-Proteobacteria
<b>BC12</b>	702	<i>Delftia acidovorans</i>	0.981	β-Proteobacteria
<b>BC17</b>	704	<i>Delftia acidovorans</i>	0.954	β-Proteobacteria
<b>BC23</b>	568	<i>Pseudomonas stutzeri</i> str. <i>Stanier</i>	0.988	γ-Proteobacteria
<b>BC41</b>	426	<i>Sphingomonas</i> sp.	0.925	α-Proteobacteria
<b>BC53</b>	592	<i>Acidovorax temperans</i>	0.978	β-Proteobacteria
<b>BC54</b>	598	<i>Gordonia terrae</i>	0.904	gram-positiva (BAGC <sup>d</sup> )
<b>E12</b>	526	<i>Xanthomonas sacchari</i>	0.819	γ-Proteobacteria
<b>E20</b>	696	<i>Hydrogenophaga</i> sp.	0.911	β-Proteobacteria
<b>E35</b>	617	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.979	γ-Proteobacteria

(a) RDP = "Ribosomal Data Base Project"

(b) Sab = coeficiente de similaridad

(c) CBF = *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*

(d) BAGC = Bacterias de Alto contenido G C

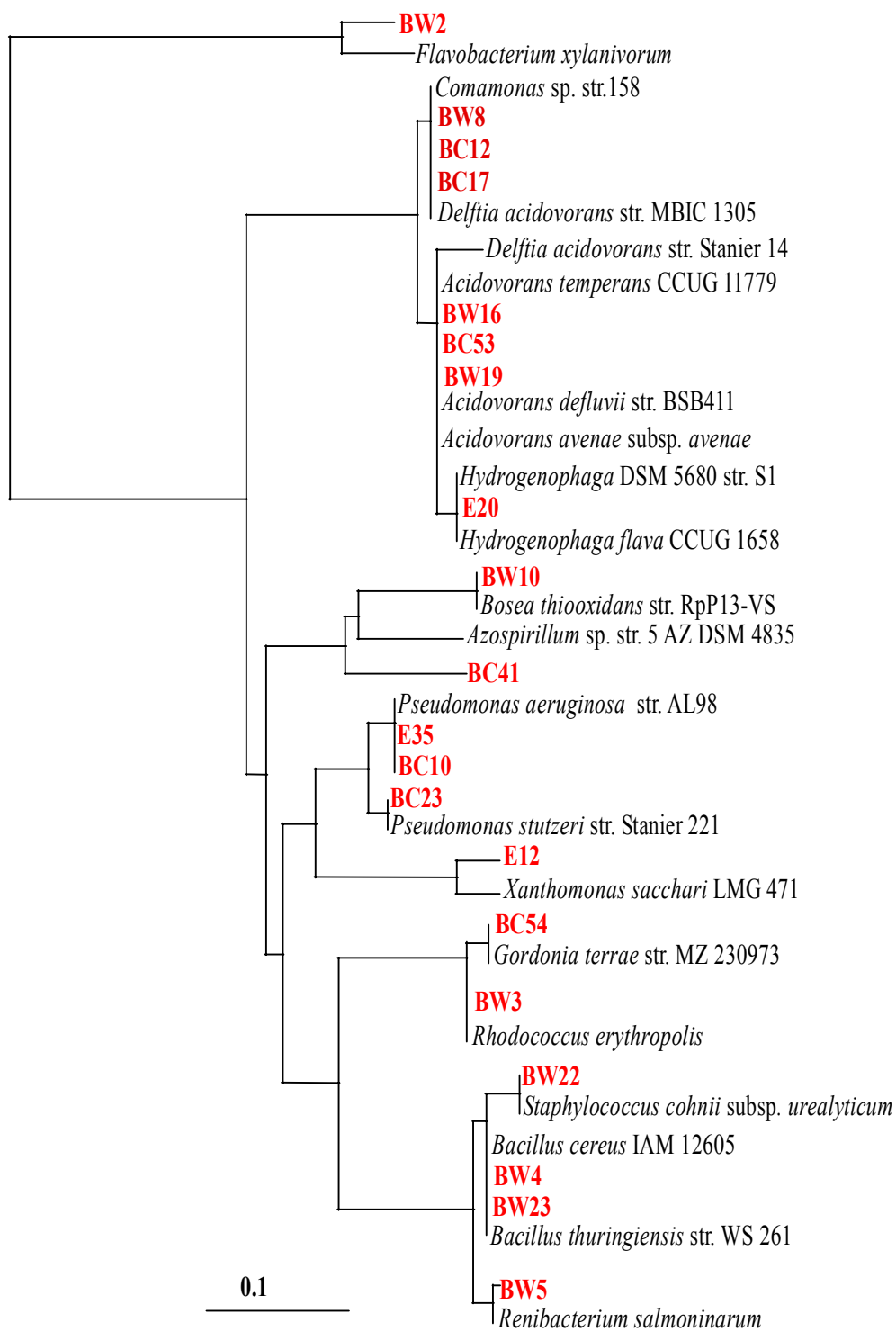


Figura 15. Análisis filogenético de bacterias degradadoras de hidrocarburos aisladas del biorreactor.

## Discusión

### Tratamiento biológico

Los sistemas de remediación artificial con biorreactores como el empleado en la Universidad de Puerto Rico, suelen presentar diferentes etapas de eficiencia en la remoción de un determinado contaminante. Estas etapas describen gráficas sigmoideas con una fase inicial con baja tasa de remoción (fase de aclimatación), seguida por una etapa de eficiencia creciente (fase logarítmica) y una etapa de eficiencia máxima y constante (fase de estabilidad). La presencia de estas etapas se debe a procesos de adaptación o aclimatación de la microflora presente a las condiciones ambientales o de operación del biorreactor (Reardon *et al.*, 2002; Solano-Serena *et al.*, 2000). Dos etapas operacionales fueron observadas en el BCAR: una etapa de fluctuación con características combinadas de fases de aclimatación y logarítmica, y una etapa de estabilidad. Estas etapas, que si bien se debieron a un proceso de adaptación microbiana, también se debieron a un proceso de estandarización del sistema; las cuales permitieron corregir deficiencias en el mantenimiento de la unidad y la estandarización del biorreactor.

La biodegradabilidad de un contaminante como la gasolina depende y es influenciada por su composición (Yerushalmi y Guiot, 1998). De todos los hidrocarburos y aditivos que componen la gasolina, los componentes volátiles representan el 40 a 45% y por ello son una buena fuente de monitoreo para un sistema de remediación. En este trabajo monitoreamos tres de estos componentes: tolueno, benceno y los isómeros de xileno (Figura 3). La biodegradabilidad de estos compuestos cuando están presentes como una mezcla implica un amplio rango de

interacciones de sustratos que incluyen la no interacción, estimulación, inhibición competitiva, inhibición no competitiva y el cometabolismo. Estas interacciones dependen en gran medida de la composición y características metabólicas de la comunidad microbiana encargada de su degradación (Deeb y Álvarez-Cohen, 1998).

En el BCAR se tuvo la presencia conjunta de benceno, tolueno y xileno, una alta concentración de tolueno y una concentración de o-xileno superior a la de benceno; condiciones que pudieron generar interacciones como las reportadas por Deeb y Álvarez-Cohen (1998), du Plessis *et al.* (2001), Solano-Serena *et al.* (2000) y Yerushalmi y Guiot (1998). Estos autores señalan que la presencia conjunta de los tres componentes suele promover interacciones de cometabolismo entre tolueno y p-xileno, inhibición no competitiva entre tolueno y benceno, inhibición del benceno por la presencia conjunta de tolueno y o-xileno, retardación de la degradación del o-xileno en altas concentraciones de benceno, aumento de la degradación de los demás componentes cuando disminuye la concentración de tolueno y, al bajar la concentración de tolueno, un orden de degradación de benceno > o-xileno > m-xileno > p-xileno.

La composición de la comunidad bacteriana, la presencia de interacciones entre sustratos y la alta concentración de tolueno que se dieron en el BCAR, serían los factores que determinaron el orden de biodegradabilidad de tolueno > o-xileno > benceno > m- y p-xileno, la mayor degradación del tolueno frente a los demás compuestos y que primara la degradación del o-xileno sobre la del benceno y los otros dos isómeros de xileno, a pesar del cometabolismo entre tolueno y p-xileno. Aún cuando la concentración y el porcentaje de degradación de m-xileno y p-xileno

fueron los mismos, esto no necesariamente implica un efecto de cometabolismo ya que la biodegradación de estos isómeros es el resultado de vías metabólicas diferentes que conducen a la formación de metilcatecoles diferentes: 3-metilcatecol a partir de m-xileno y 4-metilcatecol a partir de p-xileno que son catabolizados por diferentes sistemas enzimáticos; de los cuales, la vía del 4-metilcatecol suele conducir a la acumulación y polimerización de intermediarios como el 3,6-dimetilcatecol que hacen que el p-xileno necesite de cometabolismo con el tolueno y que su tasa de degradación sea menor a la de los otros dos isómeros de xileno (Chang *et al.*, 1993; Yerushalmi y Guiot, 1998).

Los hidrocarburos disueltos actúan como fuente de carbono y energía para los microorganismos presentes en estos ambientes; los cuales pueden degradarlos aerobia o anaerobiamente dependiendo de los aceptores de electrones y de sus capacidades metabólicas. Por ello, la tasa de consumo de oxígeno es otro parámetro usado para monitorear y tipificar sistemas de biorremediación de ambientes contaminados con petróleo o sus derivados. En el BCAR esta tasa fue de 2 mg/L (Figura 5), inferior a los valores que presentan sistemas de biorremediación aerobios como el investigado por Solano-Serena *et al.* (1999), quienes reportan una tasa promedio de consumo de oxígeno de 7 mg/L durante la degradación aerobia de gasolina en un cultivo en medio líquido inoculado con lodos activados.

La tasa de consumo de oxígeno y la concentración de oxígeno disuelto que tuvimos en este trabajo (Apéndice 4) corresponden a valores que caracterizan a sistemas de remediación microaerófilicos; sistemas que por definición son aquellos cuya concentración de oxígeno disuelto es mayor de 2 mg/L y menor de 21 mg/L

(Mikesell *et al.*, 1993). En ambientes microaerofílicos a concentraciones de oxígeno superiores a 0.5 mg/L, el metabolismo aerobio hidroxila anillos de benceno para romperlos y generar productos intermediarios cuyo metabolismo central incluye las vías del ciclo de Krebs y de la  $\beta$ -oxidación (Wilson y Bower, 1997). Estos procesos aerobios rápidamente usan el oxígeno disuelto y disminuyen su concentración a niveles por debajo de 0.5 mg/L, donde varios procesos de degradación anaerobia como la desnitrificación, la reducción de hierro y sulfatos y la metanogénesis pueden darse; al usar otros aceptores de electrones diferentes al oxígeno (Gibson *et al.*, 1998; Wilson y Bower, 1997). De éstos, el nitrato ( $\text{NO}_3$ ) es la alternativa preferida, debido a que su rendimiento energético es similar al del oxígeno y al ser altamente soluble en agua no precipita óxidos y no es tóxico para los microorganismos a concentraciones inferiores a 500 mg/L (Wilson y Bower, 1997). Estas fluctuaciones de la concentración de oxígeno, implican la presencia y participación de microorganismos con capacidad para desarrollar degradando hidrocarburos tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. Esta flexibilidad catabólica se observó en el 81% (70 cultivos) de las poblaciones degradadoras de la comunidad microbiana del biorreactor (Apéndice 7); quienes en ausencia de oxígeno podrían utilizar al nitrato como aceptor alternativo de electrones.

### **Comunidad Microbiana**

En los sistemas de biorremediación se emplea carbón activado como medio de soporte o fijación para una comunidad bacteriana debido a las propiedades adsorbentes de este material que posibilitan la adherencia microbiana (Harendranath *et al.*, 1996). Asimismo, por sus propiedades adsorbentes, el carbón activado suele



emplearse para físicamente remediar aire y agua contaminados con productos volátiles, pero con la desventaja de rápidamente alcanzar un punto de saturación, el que Daifullah y Girgis (2002) establecieron suele alcanzarse al tercer día de remediación a partir del cual se requiere de un proceso de recuperación o desaturación. Esta desventaja es anulada con el desarrollo en su superficie de una comunidad dedicada a degradar el contaminante adsorbido (Harendranath *et al.*, 1996).

En el BCAR se usó carbón activado de superficie rugosa y alto grado de porosidad (Figura 6), características que Harendranath *et al.* (1996) y Massol-Deyá *et al.* (1995) señalan como idóneas para la adsorción de contaminantes y la fijación bacteriana; sin embargo, el tipo de carbón utilizado sólo permitió la fijación de una población estable de  $10^4$  UFC/g de carbón que representa el 0.1% de la población del afluente ( $10^7$  UFC/ml en promedio) que actuó como inóculo natural. Estas densidades resultan ser pobres si se comparan con la reportada por Massol-Deyá *et al.* (1995), quienes con un afluente con  $10^7$  UFC/ml obtuvieron una población de  $10^9$  a  $10^{10}$  UFC/g de carbón activado. Esto pudo deberse a algún tipo de inhibición por características del carbón o por la poca cantidad de oxígeno disuelto que se tuvo en el sistema.

En este trabajo no se tuvieron grandes densidades bacterianas en la superficie del carbón activado, pero se tuvo la formación de una biopelícula flotante que no ha sido informada para otros procesos en reactores con carbón activado como material de fijación microbiana. Sí tomamos en cuenta que la biopelícula estuvo presente en el agua del biorreactor donde hubo una comunidad bacteriana de entre  $10^6$  a  $10^9$

UFC/ml y la sumamos a la comunidad establecida en el carbón ( $10^4$ ) tendríamos en el reactor una población máxima cultivable aeróbicamente de  $10^{12}$  UFC/ml similar a la obtenida por otros investigadores como Massol-Deyá *et al.* (1995).

La estructura de una biopelícula está dada por el arreglo espacial de bacterias, grupos de bacterias, exopolisacáridos (EPS) y material particulado; donde el EPS es producido por las bacterias, consiste de polisacáridos, ácidos poliurónicos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, y es el que mantiene a las células juntas y adheridas al substrato (De Beer y Stoodley, 2000; Davey y O'toole, 2000). Según De Beer y Stoodley (2000) y Massol-Deyá *et al.* (1995), la distribución de las bacterias al interior de una biopelícula no es uniforme y en biopelículas con múltiples especies microbianas se observa la presencia de espacios “vacíos”, canales, cavidades, poros y filamentos donde las células se arreglan en grupos o capas; tal como se observó en la biopelícula del BCAR (Figura 7b).

Este tipo de estructuras complejas ha sido observada en biopelículas de reactores de lecho fluidizado (Massol-Deyá *et al.*, 1995; Strauss *et al.*, 2000), biopelículas de cámaras de flujo (Sternberg *et al.*, 1999) y en biopelículas de cultivos puros (Tolker-Nielsen *et al.*, 2000) y mixtos (Møller *et al.*, 1998). En todas estas investigaciones, las biopelículas se observaron adheridas a una superficie, en cambio en el reactor del RUM la observamos en el cuerpo de agua. Esta ubicación preferencial puede deberse a factores físicos y químicos que son parte de la hidrodinámica del reactor de lecho fluidizado. Así por ejemplo, se ha determinado que la forma y grosor de una biopelícula dependen en gran medida del tipo de flujo: un flujo laminar produce biopelículas gruesas y un flujo turbulento biopelículas

delgadas y con muchos espacios o canales y que de ser muy fuerte (la turbulencia) puede ocasionar el desprendimiento y desplazamiento de la biopelícula del lugar en que se formó (De Beer y Stoodley, 2000; Davey y O'toole, 2000). En nuestro caso, debido a que durante la ejecución del proceso siempre se trató de inyectar la mayor cantidad posible de oxígeno al sistema para estimular y acelerar una degradación aerobia de la gasolina, la turbulencia generada fue fuerte; lo que habría propiciado tanto la morfología de la biopelícula como su ubicación.

Las comunidades bacterianas establecidas en ambientes contaminados con hidrocarburos del petróleo o en las unidades de tratamiento poseen una gran diversidad morfológica, fisiológica y genética (Ficker *et al.*, 1999; Greene *et al.*, 2000; Massol-Deyá *et al.*, 1997; Röling *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2000) como la observada en este trabajo. Morfológicamente, la comunidad microbiana estuvo compuesta tanto por cocos como por bacilos gram-positivos y gram-negativos (con el predominio de bacilos gram-negativos), que a través del análisis de grupo de patrones de bandas generados por ARDRA (Figura 9), se agruparon en 90 grupos genéticamente diferentes (Figura 10).

El análisis de ARDRA se basa en la generación de patrones de bandas, cuyo número y tamaño depende de la presencia o ausencia de sitios de restricción al interior de los genes de 16S rRNA; patrones que son usados como criterio para estimar diversidad genética. Esta técnica tiene tres limitaciones: (1) genera una restringida cantidad de datos a partir de las moléculas de 16S rDNA (sólo usa sitios de restricción), (2) no permite establecer si dos patrones iguales se deben a sitios de restricción con igual ubicación en las moléculas de DNA de las que proceden y (3)

genera inconsistencias topológicas en los dendogramas por la limitada capacidad discriminadora de las enzimas de restricción con respecto a la extensa variedad de organismos que ocurren naturalmente (Rodríguez, 1998). Por lo tanto, al igual que Massol-Deyá *et al.* (1997) y Rodríguez (1998), los resultados de ARDRA sólo se han usado para establecer una medida de diversidad entre los organismos probados y una presuntiva identificación y diferenciación en grupos genéticos cuyos integrantes pueden pertenecer a una o más especies.

El método de Box-PCR, al igual que ARDRA, se basa en la amplificación de segmentos de DNA, pero usa una mayor cantidad de datos y posee una mayor capacidad discriminadora entre los diversos organismos de una comunidad (Rodríguez, 1998). Esto es debido a que amplifica regiones de DNA inter-específicas, repetitivas, altamente conservadas y presentes en múltiples copias a través del genoma bacteriano. Se basa en amplificaciones que se traducen en patrones de bandas cuyo tamaño y número caracterizan y diferencian a una cepa de otra (Rodríguez, 1998; Seurinck *et al.*, 2003). El análisis de Box-PCR de las 86 poblaciones degradadoras de gasolina revela una alta diversidad en la comunidad que se traduce en la presencia de 52 cepas o genotipos diferentes (Figura 12); de los cuales, el 69% se establecieron en el biorreactor (cepas BW y BC), un 23% fueron aislados del efluente (donde también se observó la biopelícula) y sólo un 8% (2 genotipos), que únicamente fueron aislados del afluente, no se estableció como miembro de la comunidad del reactor. Aún cuando las condiciones al interior del biorreactor no fueron las mejores, éstas permitieron el establecimiento y desarrollo de una comunidad degradadora de gasolina numerosa, genéticamente diversa y muy eficiente.

La diversidad de la comunidad degradadora de hidrocarburos también fue fisiológicamente evaluada mediante el sistema Biolog<sup>®</sup>. Este sistema permite la identificación de poblaciones bacterianas en base a sus perfiles de utilización de fuentes de carbono y su comparación con una base de datos. El bajo porcentaje de identificación (70% para gram-negativas y 75% para gram-positivas) de este sistema con los aislamientos del BCAR puede deberse a que la base de datos aún no cuenta con información para ellas. En el grupo de las gram negativas, Biolog<sup>®</sup> identificó 11 cultivos como pertenecientes a 9 especies de 8 géneros diferentes; de las cuales BC47 y BC23 fueron identificadas como la misma especie al igual que lo fueron BW16 y E35; pero fueron mantenidas como entidades diferentes, lo que implicaría que aún siendo de la misma especie son cepas con diferente capacidad metabólica. Sin embargo, el resultado de Box-PCR establece que éstas cepas son genotipos diferentes; por lo tanto, se trataría de especies diferentes con capacidades metabólicas similares.

En la figura 13, las cepas comprendidas entre BC10 y BW26 pertenecerían a la subdivisión  $\beta$  de las proteobacterias, la cual incluye a los cuatro géneros de las bacterias identificadas en este grupo del dendograma. Otro grupo de proteobacterias presente es la subdivisión  $\gamma$  a la que pertenecen los géneros *Pseudomonas* y *Enterobacter*, también identificadas por este sistema. La división proteobacteria es una de las divisiones cuya inclusión de especies degradadoras de hidrocarburos del petróleo como la gasolina y sus componentes volátiles, ha sido fehacientemente comprobada (Dojka *et al.*, 1998; Greene *et al.*, 2000; Röling *et al.*, 2001 y Watanabe *et al.*, 2000). La cepa E14 fue identificada como la especie *Chryseobacterium gleum* que pertenece a la división *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* de las bacterias

verdes sulfurosas; bacterias que Dojka *et al.* (1998) identificaron como miembros de la comunidad bacteriana presente en un acuífero contaminado con solventes hidrocarbonados y clorinados y por ende con probable capacidad degradadora de estos contaminantes.

En el grupo de los gram-positivos el sistema Biolog<sup>®</sup> identificó a tres de las 12 cepas como pertenecientes a las especies *Corynebacterium nitrilophilus* (BW3) *Geobacillus thermoglucosidasius* (BW21), y *Rhodococcus australis* (BC54); de los cuales, los géneros *Corynebacterium* y *Rhodococcus* pertenecen a la familia Corynebacteriaceae, que incluye a bacilos gram-positivos (Firmicutes) con una morfología irregular y un alto contenido de GC en su DNA (Stackebrandt y Schumann, 2002). Poblaciones de esta familia han sido frecuentemente aisladas de ambientes contaminados con hidrocarburos así como también de unidades de tratamiento de agua contaminada con hidrocarburos (Dojka *et al.*, 1998; Greene *et al.*, 2000; Röling *et al.*, 2001). Asimismo, Strauss *et al.* (2000) reportaron el aislamiento de *C. nitrilophilus* a partir de una biopelícula formada en un biofiltro de composta de pino usado para remover tolueno de agua contaminada.

*Geobacillus thermoglucosidasius*, es descrito como un bacilo termofílico que crece entre 37 a 75°C, aerobio o anaerobio facultativo, de distribución ubicua, que tiene al suelo por hábitat (Slepecky y Hemphill, 2002; Zeigler, 2001) y que de manera particular no ha sido relacionada a ambientes contaminados con hidrocarburos; pero que otras especies del mismo género y muy relacionadas genéticamente con esta especie han sido aisladas por Nazina *et al.* (2001) a partir del agua de campos petrolíferos de Rusia, Kazakhstan y China, y les han tipificado como

bacterias degradadoras de hidrocarburos del petróleo que soportan altas temperaturas y que por su metabolismo oxidativo generan grandes daños corrosivos a los tanques de almacenaje. Por lo tanto, la cepa BW21 podría ser una especie del género *Geobacillus* diferente a la indicada por Biolog® y muy relacionada a las reportadas por Nazina *et al.* (2001).

La evaluación filogenética de las secuencias parciales del 16S rDNA de veinte poblaciones degradadoras (Tabla 2 y Figura 15) mostró que la similaridad con bacterias conocidas, generalmente, fue baja a excepción de la cepa BW4 que tuvo un coeficiente de similaridad de 1.0 con la bacteria *Bacillus cereus*. Las 20 poblaciones son filogenéticamente asociadas a tres divisiones bacterianas cuya participación en la degradación de hidrocarburos del petróleo ha sido comprobada en numerosos estudios (Dojka *et al.*, 1998; Greene *et al.*, 2000; Magnaugton *et al.*, 1999; Margesin *et al.*, 2003; Nazina *et al.*, 2001; Ovreas y Torsvick, 1998; Röling *et al.*, 2001; Strauss *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 2000 y Zeigler, 2001). La división de las proteobacterias fue la de mayor frecuencia al contener a 13 (65%) de las cepas, seguida por la división de gram positivas con 6 (30%) y la división *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* con sólo una cepa (BW2).

Las trece cepas de proteobacterias son distribuidas entre las subdivisiones  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  de esta división; BW10 y BC 41 en la subdivisión  $\alpha$ ; BW16, BW19, BC12, BC17, BC53 y E20 en el grupo *Acidovorax* de la subdivisión  $\beta$  y BW8, BC10, BC24, E12 y E35 en la subdivisión  $\gamma$ . Estas tres subdivisiones han sido frecuentemente asociadas a la degradación de hidrocarburos del petróleo por tener entre sus miembros a especies aisladas de ambientes contaminados con hidrocarburos o de

sistemas usados en la recuperación de los mismos (Dojka *et al.*, 1998; Greene *et al.*, 2000; Macnaughton *et al.*, 1999; Ovreas y Torsvik, 1998; Röling *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2000), y algunas de las cuales, como *Pseudomonas putida*, son usadas para estudios de metabolismo de hidrocarburos (Reardon *et al.*, 2002; Shim y Yang, 1999; Yu *et al.*, 2001). El género *Xanthomonas*, que generalmente se asocia a pseudomonas patógenas de plantas, también incluye entre sus miembros a especies no patógenas (Palleroni, 2002). De su aislamiento de ambientes contaminados se tiene escasos reportes como los de Foght *et al.* (1998) que la aisló de suelos de refinerías y el de Rodríguez (1998) que reporta la cepa ACA-2 que degrada tolueno, como filogenéticamente relacionada a *X. maltophilia*.

Las poblaciones de la división de bacterias gram-positivas son ubicadas en dos de sus subdivisiones: bacterias con alto contenido de GC y *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus*; ambos grupos de Firmicutes han sido asociados a la degradación de hidrocarburos por Bell *et al.* (1999), Correa *et al.* (1999); Deeb y Alvarez –Cohen (2000), Greene *et al.* (2000) y Röling *et al.* (2001) al aislarlos o utilizarlos en ambientes contaminados por hidrocarburos. Las cepas BW3 y BC54, al ser relacionadas con la subdivisión de bacterias con alto GC, son actinomicetos nocardiformes cuya pared celular contiene ácidos micólicos (Stackebrandt y Schumann, 2002). BW3 posee un índice de similaridad de 0.96 con la especie *Rhodococcus erythropolis*, actinomiceto aerobio cuyo ciclo de vida se alterna entre dos formas celulares (coco y bacilos cortos) y que posee una fuerte hidrofobicidad, características que observamos en BW3 y que hicieron difícil su cultivo y coloración. Bell *et al.* (1998) señalan que la hidrofobicidad se debe a la presencia de cadenas alifáticas de ácidos micólicos que hace que esta bacteria se adhiera a la interface



aceite/agua, ubicación donde tiene fácil acceso a los hidrocarburos y al oxígeno que necesita para metabolizarlos, ya que es una bacteria aerobia.

La cepa BC54 está filogenéticamente asociada con la bacteria *Gordonia terrae* con un índice de similaridad de 0.9 (Tabla 2), pero fisiológicamente fue asociada a *Rhodococcus australis* (Figura 14). Estos dos géneros anteriormente eran uno sólo, *Gordona* estaba incluida en el género *Rhodococcus*, y entre los actinomicetos son muy frecuentes los cambios de un género a otro y de una especie a otra (Bell *et al.*, 1998; Stackebrandt y Schumann, 2002). Aunque se ha establecido que una similaridad del 97% entre el 16S rDNA de dos cepas es indicativo de que pertenecen a la misma especie (Stackenbrandt y Goebel, 1994), en este grupo se cuenta con ejemplos, como el de *R. percolatus* y *R. opacus* que tienen un 99.3% de similaridad en su 16S rDNA y se mantienen como especies diferentes por su fenotipo nutricional y composición de ácidos grasos. Por lo tanto, para establecer la identidad de BW3 y BC54 sería necesario contar con el análisis de composición de ácidos grasos de sus paredes celulares y el análisis de la secuencia completa de sus respectivos 16S rDNA.

Las otras cepas de Firmicutes filogenéticamente relacionadas con la subdivisión *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus*, son distribuidas en los subgrupos *Bacillus cereus* (BW4 y BW23), *Bacillus sphaericus* (BW5) y *Staphylococcus* (BW22). De ellas, sólo BW4 posee un índice de similaridad alto (1.0), pero con dos bacterias del mismo grupo que poseen diferencias nutricionales y morfológicas: *B. cereus* y *B. thuringiensis*. Esta última especie se caracteriza por formar en su citoplasma cristales con actividad citotóxica para larvas de insectos (Helgason *et al.*, 2002; Slepecky y Hemphill, 2002; Zeigler, 2001); que no se observaron en la

tipificación morfológica de BW4; cuya morfología se asemeja más a la especie *B. cereus*. Sin embargo, aún cuando ambas especies forman parte del banco de datos del sistema Biolog®, este no identificó a BW4 (Figura14). Se trataría entonces de una cepa fisiológicamente diferente a aquellas con las que cuenta la base de datos del sistema Biolog®. Algo similar sucedería con BW23, cuyo índice de similaridad con ambas especies es ligeramente menor (0.99) y que tampoco fue identificada por Biolog®. La cepa BW5 fue relacionada con la bacteria *Renibacterium salmoninarum*, la cual es una bacteria patógena de peces salmónidos, de cuyo aislamiento a partir de agua dulce o de ambientes contaminados con hidrocarburos no se tiene referencia. Teniendo en cuenta estos aspectos y el bajo índice de similaridad con esta bacteria (0.89 de similaridad), la cepa BW5 no pertenecería al género *Renibacterium* y se trataría de un género y especie de la subdivisión *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus* diferente de las que forman parte de la base de datos del RDP.

## Conclusiones

Las condiciones físicas y químicas (25°C, microaerofilia, flujo turbulento, etc.) que caracterizaron al biorreactor del Recinto de Mayagüez de la Universidad de Puerto Rico (BCAR), permitieron el establecimiento de una comunidad de gran diversidad que incluye a cultivos primarios (53%) o degradadores de gasolina y cultivos secundarios (47%) o de metabolismo dependiente de la comunidad degradadora, que se diferenciaron en 90 grupos genéticos y que permitió una eficiencia de remoción promedio del 90% del contaminante luego del primer paso del agua por el BCAR y del 99.9% luego de un evento de recirculación.

La comunidad microbiana degradadora de gasolina estuvo constituida por aproximadamente  $10^{12}$  UFC/reactor y se estableció en la superficie del carbón activado y en el cuerpo de agua (biopelícula flotante). Comunidad a partir de la cual se aislaron 50 genotipos Box A1R cuya identificación por el sistema Biolog<sup>®</sup> y comparación de las secuencias parciales de sus genes para 16S rDNA la definieron como una comunidad microbiana fisiológica y genéticamente muy diversa con especies de por lo menos tres divisiones bacterianas: *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*, Proteobacteria y Firmicutes.

El 80% de la comunidad degradadora era anaerobia facultativa; evidencia adicional de que el reactor operó bajo condiciones limitantes de oxígeno. El 17% de estas poblaciones son bacterias desnitrificadoras; evidencia de la utilización de aceptores alternos de electrones. Por lo tanto, las bacterias anaerobias cumplieron un papel importante en la remoción del contaminante.

Es muy probable que la reinyección de agua rica en excedente de flora microbiana del biorreactor sirviera para bioaumentar y de este modo contribuir a la rápida recuperación del suelo impactado.

El alto nivel de diversidad microbiana observada en el reactor contribuyó en la estabilidad y eficiencia del BCAR. Un mejor entendimiento del comportamiento biótico permitiría mejorar y optimizar estas unidades de tratamiento.

## Literatura Citada

- Ahmadvand, H., G. German, J.P. Gandee and V.T. Buehler. 1995. Utilizing the Fluidized bed to initiate water treatment on site. En: Hinchee, R.E., G.-D. Sayles and R.S. Skeen (Eds.), *Biological Unit Processes for Hazardous Waste Treatment*. Battelle Press, Columbus, OH, pp. 47 - 53.
- Atlas, R.M., Cerniglia, C.E., 1995. Bioremediation of petroleum pollutants: diversity and environmental aspects of hydrocarbon biodegradation. *BioScience* **45** (5): 322–338.
- Bachoon, D.S., R. Araujo, M. Molina y R.E. Hodson. 2001. Microbial community dynamics and evaluation of bioremediation strategies in oil – impacted salt marsh sediment microcosms. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* **27**: 72 – 79.
- Balows, A., H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder y K-H. Schleifer. 1991. *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. 2<sup>da</sup> ed. Springer Verlag, New York.
- Bell, K.S., J.C. Philip, D.W.J. Aw y N. Christofi. 1998. The Genus *Rhodococcus*. *J. Appl. Microbiol.* **85**: 195 - 210
- Bell, K.S., M.S. Kuyukima, S. Heidbrink, J.C. Philip, D.W.J. Aw, I.B. Ivshima y N. Christofi. 1999. Identification and environmental detection of *Rhodococcus* Species by 16S rDNA-target PCR. *J. Appl. Microbiol.* **83**: 472 – 480.
- Coates, J.D., D. J. Ellis, E. L. Blunt-Harris, C. V. Gaw, E. E. Roden y D. R. Lovley. 1998. Recovery of Humic-Reducing Bacteria from a Diversity of Environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** (4): 1504 – 1509.
- Cole, J.R., B. Chai, T.L. Marsh, Q. Wang, S.A. Kulam, S. Chandra, D.M. McGarrell, T.M. Schmidt, G.M. Garrity y J.M. Tiedje. 2003. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res.* **31**(1): 442 -443

- Correa, F., L.C. Fleck y M.A. Záchia. 1999. Production of Biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus rubber* and *Rhodococcus erythropolis*. *Revista de Microbiología*. **30**: 231 - 236
- Chang, M-K., T.C. Voice y C.S. Criddle. 1993. Kinetics of Competitive inhibition and Cometabolism in the Biodegradation of Benzene, Toluene, and p-Xylene by two *Pseudomonas* isolates. *Biotech. Bioeng.* **41**(11): 1057 – 1065.
- Chapelle, F.H., 1993. Ground-water Microbiology and Geochemistry. Wiley, New York, pp. 264–294.
- Daifullah, A.A.M. y B.S. Girgis. 2002. Impact of Surface Characteristics of Activated Carbon on adsorption of BTEX. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. **214**: 181 – 193.
- Davey, M.E. y G.A. O'toole. 2000. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**(4): 847 – 867.
- De Beer, D. y P. Stoodley. 2002. Microbial Biofilms. En: Balows, A., H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder y K-H. Schleifer (Ed.). *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. Springer Verlag, New York.
- Deeb, R.A. and L. Alvarez-Cohen. 2000. Aerobic Biotransformation of Gasoline Aromatics in Multicomponent Mixtures. *Bioremed. J.* 4:1-9.
- Dojka, M.A., P. Hugenholtz, S.K. Haack, and N.R. Pace. 1998. Microbial Diversity in a Hydrocarbon- and Chlorinated-Solvent-Contaminated Aquifer Undergoing Intrinsic Bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3869-3877.
- du Plessis, C.A., J.M. Strauss y K.H.J. Riedel. 2001. BTEX catabolism interactions in a toluene-acclimatized biofilter. *Appl. Microbiol. Biotech.* **55**: 122 - 128
- Edwards, D.E., W.J. Adams and M.A. Heitkamp. 1994. Laboratory scale evaluation of aerobic Fluidized bed reactors for the biotreatment of a synthetic, high-strength chemical industry waste stream. *Water Environ. Res.* **66** (1): 70 - 83.

- Ficker, M., K. Krastel, S. Orlicky y E. Edwards. 1999. Molecular Characterization of a Toluene-Degrading Methanogenic Consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(12): 5576 - 5585
- Foght, J., K. Semple, D.W.S. Westlake, S. Blenkinsopp, G. Sergy, Z. Wang and M. Fingas. 1998. Development of a standard bacterial consortium for laboratory efficacy testing of commercial freshwater oil spill bioremediation agents. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* **21**: 322 – 330.
- Gibson, T.L., S.A. Abdul y P.D. Chalmer. 1998. Enhancement of In Situ Bioremediation of BTEX-Contaminated Ground Water by Oxygen Diffusion from Silicone Tubing. *Ground. W. Monit. Remed.* 614 - 618
- Greene, E.A., J.G. Kay, K. Jaber, L.J. Stehmeier y G. Voordouw. 2000. Composition of Soil Microbial Communities Enriched on a Mixture of Aromatic Hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(12): 5282 -5289
- Harendranath, C.S., K. Anuja, A. Singh, A. Gunaseelan, K. Satish, and K. Lala. 1996. Immobilization in Fixed Film Reactors: An Ultrastructural Approach. *Wat. Sci. Tech.* 33:7-15.
- Helgason, E., O.A. Økstad, D.A. Caugant, H.A. Johansen, A.Fouet, M. LeMock, I. Hegna y A.-B. Kolstø. 2002. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*—One Species on the Basis of Genetic Evidence. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(6): 2627 - 2630
- Hirsch C.F. and J.M. Sigmund. 1995 Use of polymerase chain reaction (PCR) fingerprinting to differentiate bacteria for microbial products screening. *J Ind. Microbiol* **15**: 85 - 93
- Järvinen, K.T., E.S. Melin and J.A. Puhakka. 1994. High-rate bioremediation of chlorophenol-contaminated groundwater at low temperatures. *Environ. Sci. Tech.* **28** (13): 2387 - 2392.
- Juteau, P., R. Larocque, D. Rho and A. LeDuy. 1999. Analysis of the relative abundance of different types of bacteria capable of Toluene degradation in a compost biofilter. *Appl. Microbiol. Biotech.* **52**: 863 – 868.

- Langwaldt, J.H. and J.A. Puhakka. 2000. On-site biological remediation of contaminated groundwater a review. *Environ. Pollut.* **107**: 187 – 197.
- Lipski A. and K. Altendorf. 1997 Identification of heterotrophic bacteria isolated from ammonia-supplied experimental biofilters. *System. Appl. Microbiol.* **20**: 448 - 457
- Macnaughton, S.J., J.R. Stephen, A.D. Venosa, G.A. Davis, Y-J. Chang and D.C. White. 1999. Microbial Population Changes during Bioremediation of a Experimental Oil Spill. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(8): 3566 – 3574.
- Margesin, R., D. Labbé, F. Schinner, C.W. Greer y L.G. Whyte. 2003. Characterization of Hydrocarbon-Degrading Microbial Populations in Contaminated and Pristine Alpine Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(6): 3085 - 3092
- Massol-Deyá, A.A., J. Whallon, R.F. Hickey and J.M. Tiedje. 1995. Channel Structures in Aerobic Biofilms of Fixed-Film Reactors Treating Contaminated Groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(2): 769 – 777.
- Massol-Deyá, AA., R. Weller, L. Rios-Hernández, J.Z. Zhou, R.F. Hickey and J.M. Tiedje. 1997. Succession and convergence of biofilm communities in Fixed-Film reactors treating aromatic hydrocarbons in groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** (1): 270 - 276.
- Mikesell, M.D., J.J. Kukor, and R.H. Olsen. 1993. Metabolic diversity of aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from a petroleum-contaminated aquifer. *Biodegradation.* **4**:249-259.
- Miteva, V., S. Selenska-Pobell and V. Mitev. 1999. Random and repetitive primer amplified polymorphic DNA analysis of *Bacillus sphaericus*. *J. Appl. Microbiol.* **86**: 928 – 936.
- Møller, S., C. Sternberg, J.B. Andersen, B.B. Christensen, J.L. Ramos, M. Givstov y S. Molin. 1998. In Situ Gene Expression in Mixed-Culture Biofilms: Evidence of Metabolic interactions between Community Members. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(2): 721 – 732.



- Muyzer, G., E.C.De Waal and A.G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction- amplified genes coding for 16S rDNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 695 – 700.
- Nazina, T.N., T. P. Tourova, A. B. Poltarau, E. V. Novikova, A. A. Grigoryan, A. E. Ivanova, A. M. Lysenko, V. V. Petrunyaka, G. A. Osipov, S. S. Belyaev, and M. V. Ivanov. 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen.nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermo-catenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int. J. Syst. Evolut. Microbiol.* **51**: 433-446.
- Ovreas, L. and V. Torsvik. 1998. Microbial Diversity and Community Structure in Two Different Agricultural Soil Communities. *Microbiol. Eco.* **36**:303–315
- Puhakka, J.A. y E.S. Melin. 1998. Chlorophenol-contaminated groundwater bioremediation at low temperaturas. En: Meyers, R.E. (ED.), Encyclopedia of environmental analysis and remediation. John Wiley, pp. 1111 - 1120
- Reardon, K.F., D.C. Mosteller, J.B. Rogers, N.H. DuTeau y K. H. Kim. 2002. Biodegradation Kinetics of Aromatic Hydrocarbon Mixtures by Pure and Mixed Bacterial Cultures. *Environ. H. Perspect.* **110**(6): 1005 - 1011
- Rodriguez, C.M. 1998. Diversity of Aerobic Toluene-degrading Bacteria from Tropical Soils. Tesis para el grado de MS. Univ. de Puerto Rico.
- Röling, W.F.M., M. B.M. van Breukelen, M. Braster, B. Lin, and H.W. van Verseveld. 2001. Relationship between Microbial Community Structure and Hydrochemistry in a Landfill Leachate-Polluted Aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4619-4629.

- Seurinck, S., W. Verstraete y S.D. Siciliano. 2003. Use of 16S-23S rRNA intergenic Spacer Region PCR and Repetitive Extragenic Palindromic PCR Analysis of *Escherichia coli* Isolates to Identify Nonpoint Fecal Sources. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(8): 4942 - 4950
- Shim, H. y S.-T. Yang. 1999. Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* immobilized in a fibrous-bed bioreactor. *J. Biotech.* **67**: 99 – 112.
- Solano-Serena, F., R. Marchall, M. Ropars, J.M. Lebeault y J.P. Vandecasteele. 1999. Biodegradation of Gasoline: kinetics, mass balance and fate of individual hydrocarbons. *J. Microbiol.* **86**: 1008 - 1016
- Solano-Serena, F., R. Marchall, J.M. Lebeault y J.P. Vandecasteele. 2000. Distribution in the environment of degradative capacities for gasoline attenuation. *Biodegradation.* **11**: 29 – 35.
- Stackenbrandt, E. y B.M. Goebel. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bact.* **44**: 846 – 849.
- Sternberg, C., B.B. Christensen, T. Johansen, A.T. Nielsen, J.B. Andersen, M. Givskov y S. Molin. 1999. Distribution of Bacterial Growth Activity in Flow-Chamber Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(9): 4108 - 4117
- Strauss, J.M., C.A. Pleiss, and K.H.J. Riedel. 2000. Empirical Model for Biofiltration of Toluene. *J. Environ. Eng.* **126**:644-648.
- Sutton, P.M. and P.N. Mishra. 1994. Activated carbon based biological Fluidized beds for contaminated water and wastewater treatment: a state of the art review. *Water Sci. Tech.* **29** (10 -11): 309 - 317.
- Tang, N.H., Gomez, I and Massol, A. 1999. Treatment of BTX contaminated Groundwater in a Fluidized Bed Reactor. In The Proceedings of the Thirty – First Mid- Atlantic Industrial and Hazardous Waste Conference.

- Tolker-Nielsen, T., V.C. Brinch, P.C. Ragas, J.B. Andersen, C.S. Jacobsen y S. Molin. 2000. Development and Dynamics of *Pseudomonas* sp Biofilms. *J. Bact.* **182**(22): 6482 – 6489.
- Tsao, C.W.; H.G. Song and R. Bartha. 1998. Metabolism of Benzene, Toluene, and Xylene Hydrocarbons in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(12): 4924 – 4929.
- van der Hoek, J.P., Urlings, L.G.C.M., Grobben, C.M., 1989. Biological removal of polycyclic aromatic hydrocarbons, benzene, toluene, ethylbenzene, xylene and phenolic compounds from heavily contaminated ground water and soil. *Environ. Technol. Lett.* **10**: 185 - 194.
- Watanabe, K., K. Watanabe, Y. Kodama, K. Sytutsubo, and S. Harayama. 2000. Molecular Characterization of Bacterial Population in Petroleum-Contaminated Groundwater Discharged from Underground Crude Oil Storage Cavities. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4803-4809.
- Watanabe, K. 2001. Microorganisms relevant to bioremediation. *Curr Opin. Biotech.* **12**:237–241
- Watanabe, K., K. Watanabe, Y. Kodama, K. Syutsubo y S. Harayama. 2000. Molecular Characterization of Bacterial Populations in Petroleum-Contaminated Groundwater Discharged from Underground Crude Oil Storage Cavities. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(11): 4803 - 4809
- Webster T.S., J.S. Devinny, E.M. Torres and S.S. Basrai. 1997. Microbial ecosystems in compost and granular activated carbon biofilters. *Biotech. Bioeng.* **53**: 296-303
- Whiteley, A.S. and M.J. Bailey. 2000. Bacterial Community Structure and Physiological State within an Industrial Phenol Bioremediation System. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(6): 2400 – 2407.
- Wilson, L.P. and E.J. Bouwer. 1997. Biodegradation of aromatic compounds under mixed oxygen/denitrifying conditions: a review. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* **18**:116-130.

- Yerushalmi, L. y R.S. Guiot. 1998. Kinetics of biodegradation of gasoline and its hydrocarbon constituents. *Appl. Microbiol. Biotech.* **49**: 475 – 481.
- Yu H., B.J. Kim y B.E. Rittmann. 2001. The roles of intermediates in biodegradation of benzene, toluene, and p-xylene by *Pseudomonas putida* F1. *Biodegradation.* **12**: 455 – 463.
- Zeigler, D.R. 2001. The Genus *Geobacillus*. *Bacillus* Genetic Stock Center: Catalog of Strains. 7<sup>ma</sup> ed. Vol. 3.

# APÉNDICE

## APÉNDICE 1

Degradación de los hidrocarburos totales del petróleo (TPH) durante 160 días de operación del biorreactor de lecho fluidizado.

<b>Día</b>	<b>AFL</b>	<b>EFL</b>	<b>% de remoción</b>
9	86	62	<b>28</b>
10	1868	269	<b>86</b>
15	62	0	<b>98</b>
22	112.5	10.5	<b>91</b>
25	74	0	<b>100</b>
27	70.7	0	<b>100</b>
30	91	2	<b>98</b>
31	142.9	6	<b>96</b>
35	123.3	6	<b>95</b>
37	421.3	23.1	<b>95</b>
41	86.2	17	<b>80</b>
43	208.5	1	<b>99</b>
47	16.7	0	<b>100</b>
50	17	2.2	<b>87</b>
53	4.3	0	<b>100</b>
54	17.5	0	<b>100</b>
60	10.1	0	<b>100</b>
63	43.5	1	<b>98</b>
76	23.6	0.7	<b>97</b>
99	192.2	1.9	<b>99</b>
117	13.3	0	<b>100</b>
124	10.3	0	<b>100</b>
127	850	8.1	<b>99</b>
130	63.6	1.3	<b>98</b>
138	2057	16.4	<b>99</b>
148	785	6.4	<b>99</b>
158	33	1	<b>97</b>

## APÉNDICE 2

Concentración de benceno, tolueno y xileno en el sistema de biorremediación “on site” del Recinto Universitario de Mayagüez.

Día	Concentración (ppm)											
	Benceno			Tolueno			m y p-Xileno			o-Xileno		
	AFL	EFL	EFLr	AFL	EFL	EFLr	AFL	EFL	EFLr	AFL	EFL	EFLr
<b>10</b>	30.5	6.1	0.02	53.2	6.4	0.02	13	2.86	0.02	12.9	2.2	0.02
<b>25</b>	5.14	1.2	0.02	18.4	2.2	0.02	5.41	1.2	0.02	7.46	1.3	0.02
<b>27</b>	6.21	1.3	0.02	21.5	2.6	0.02	5.81	1.3	0.02	6.76	1.18	0.02
<b>50</b>	3.5	1	0.02	5.2	0.65	0.02	2.1	0.5	0.02	2.3	0.65	0.02
<b>63</b>	4.8	1	0.02	6.4	0.8	0.02	2.6	0.6	0.02	3.23	0.7	0.02
<b>76</b>	4.06	1	0.02	19.5	2.4	0.02	4.9	1	0.02	3.7	0.79	0.02
<b>99</b>	19.4	3.5	0.02	31.2	3.7	0.02	10.3	2.3	0.02	10.4	1.8	0.02
<b>127</b>	57.2	11.4	0.02	278	33.3	0.02	79.4	17.5	0.02	73.8	12.46	0.02
<b>138</b>	61.2	12.3	0.02	330	39.6	0.02	58.1	12.7	0.02	61.6	10.4	0.02
<b>148</b>	48.4	9.6	0.02	197.7	23.7	0.02	51.2	11.16	0.02	53.1	8.97	0.02
<b>Promedio % degrad.</b>	24.04	4.84 <b>80</b>		96.11	11.5 <b>88</b>		23.3	5.1 <b>78</b>		23.5	4.05 <b>83</b>	

EFLr = efluente de recirculación

### APÉNDICE 3

Diferencia de turbidez (NTU/ml) entre afluente y efluente del BCAR.

<b>Tanda</b>	<b>Día</b>	<b>Afluente</b>	<b>Efluente</b>	<b>% de Reducción</b>
1	1	19.94	1.99	<b>90</b>
	9	8.07	1.92	<b>76</b>
2	10	16.5	6.64	<b>60</b>
4	15	67.5	16.88	<b>75</b>
	16	15.4	7.7	<b>95</b>
	17	9.7	4.9	<b>50</b>
5	22	23.4	8.3	<b>65</b>
7	30	25	4.08	<b>84</b>
9	35	16.5	6.64	<b>60</b>
10	37	6.98	4.09	<b>41</b>
	38	29.7	4.11	<b>86</b>
11	41	13.6	4.53	<b>67</b>
	42	34.5	20.4	<b>94</b>
	43	18.7	2.86	<b>84</b>
12	44	16.4	8.62	<b>47</b>
13	48	28.3	6.05	<b>79</b>
16	56	26.98	8.09	<b>70</b>
	57	61.8	16.4	<b>97</b>
	58	60.2	8.36	<b>86</b>
17	62	21.4	6.31	<b>70</b>
18	65	13.7	6.68	<b>51</b>
19	66	18.32	6.14	<b>67</b>
	76	15.4	7.7	<b>50</b>
20	78	9.7	3.11	<b>68</b>
23	91	45.3	3.53	<b>92</b>
25	101	41.8	19.4	<b>54</b>
26	113	60.2	8.36	<b>86</b>
27	119	16.4	4.26	<b>74</b>
28	126	13.7	6.68	<b>51</b>
29	129	18.1	6.58	<b>64</b>
30	132	9.7	4.11	<b>58</b>
31	140	66.1	23.4	<b>65</b>
32	142	15.4	7.7	<b>50</b>
33	150	62.3	18.53	<b>70</b>
35	154	45.3	3.53	<b>92</b>
35	160	21.4	5.31	<b>75</b>



## APÉNDICE 4

Consumo de oxígeno (mg/l) durante el proceso de biorremediación en el BCAR.

<b>Tanda</b>	<b>Día</b>	<b>Afluente</b>	<b>Efluente</b>	<b>O<sub>2</sub> consumido</b>
1	1	6.47	5.4	<b>1.07</b>
2	9	6.0	4.30	<b>1.70</b>
	10	5.1	3.13	<b>1.97</b>
4	15	5.82	4.08	<b>1.74</b>
	16	6.22	4.26	<b>1.96</b>
	17	5.88	4.14	<b>2.24</b>
5	23	7.43	5.07	<b>2.36</b>
6	28	5.42	3.26	<b>2.16</b>
9	35	4.06	2.03	<b>2.03</b>
10	37	7.05	4.85	<b>2.20</b>
	38	6.98	4.76	<b>2.22</b>
11	41	6.2	4.35	<b>1.85</b>
	42	5.38	3.45	<b>1.93</b>
	43	6.02	4.05	<b>1.97</b>
12	44	5.92	4.05	<b>1.87</b>
16	56	6.24	4.16	<b>2.08</b>
	57	6.56	4.64	<b>1.92</b>
	58	6.34	4.48	<b>1.86</b>
17	59	6.36	4.52	<b>1.84</b>
	65	5.43	3.56	<b>1.87</b>
19	66	5.08	3.05	<b>2.03</b>
20	76	5.95	4.16	<b>1.79</b>
21	77	6.41	4.05	<b>2.36</b>
	86	6.29	4.28	<b>2.01</b>
25	99	6.97	4.76	<b>2.21</b>
27	117	6.96	5.03	<b>1.93</b>
28	124	6.35	4.52	<b>1.83</b>
29	127	6.16	4.12	<b>2.04</b>
31	138	6.71	4.29	<b>2.42</b>
33	148	6.97	3.85	<b>2.12</b>
35	158	6.28	4.29	<b>1.99</b>

**APÉNDICE 5.** Caracterización morfológica de 162 cepas aisladas del proceso de biorremediación de agua contaminada con gasolina del RUM

Fuente	N°	Morfología de colonia		Morfología microscópica		Crecimiento en gasolina como fuente de carbono				Grupo de ARDRA
		Ø (mm)	Color	Forma	Gram	R <sub>2</sub> A	BHGV	BHV	BHG	
Agua del Biorreactor (BW)	1	7	B	Bacilo	-	+	+	-	+	<b>80</b>
	2	3	B	Coco	-	+	+	-	+	<b>44</b>
	3	2	R	Bacilo	+	+	+	+	+	<b>88</b>
	4	8	B	Bacilo	+	+	+	+	+	<b>24</b>
	5	3	B	Bacilo	+	+	+	+	+	<b>25</b>
	6	2	B	Bacilo	+	+	+	+	+	<b>21</b>
	7	1	A	Bacilo	-	+	-	-	-	<b>56</b>
	8	7	A	Bacilo	-	+	+	+	+	<b>66</b>
	9	11	A	Bacilo	-	+	-	-	-	<b>73</b>
	10	8	B	Bacilo	-	+	+	+	+	<b>43</b>
	11	6	B	Bacilo	-	+	+	+	+	<b>43</b>
	12	5	Vi	Bacilo	-	+	+	-	+	<b>79</b>
	13	4	C	Bacilo	-	+	-	-	-	<b>15</b>
	14	6	A	Bacilo	-	+	-	-	-	<b>51</b>
	15	1	B	Bacilo	-	+	-	-	-	<b>56</b>
	16	1	T	Bacilo	-	+	+	+	-	<b>11</b>
	17	2	R	Bacilo	-	+	-	-	-	<b>47</b>
	18	2	B	Bacilo	-	+	+	+	-	<b>19</b>
	19	2	R	Bacilo	-	+	+	+	-	<b>20</b>
	20	8	R	Bacilo	-	+	-	-	-	<b>52</b>
	21	6	A	Bacilo	+	+	+	+	-	<b>75</b>
	22	8	B	Coco	+	+	+	+	+	<b>84</b>
	23	12	B	Bacilo	+	+	-	+	-	<b>74</b>
	24	10	B	Bacilo	+	+	-	+	+	<b>74</b>
	25	2	B	Bacilo	-	+	-	-	-	<b>73</b>
	26	3	A	Bacilo	-	+	-	+	-	<b>17</b>

## Apéndice 5 continuación

Fuente	N°	Morfología de colonia		Morfología microscópica		Crecimiento en gasolina como fuente de carbono				Grupo de ARDRA
		Ø (mm)	Color	Forma	Gram	R <sub>2</sub> A	BHGV	BHV	BHG	
Carbón Activado del biorreactor (BC)	27	3	R	Bacilo	-	+	+	+	+	<b>82</b>
	28	2	B	Bacilo	-	+	+	+	+	<b>14</b>
	29	2	B	Bacilo	+	+	+	+	+	<b>34</b>
	1	2	B	Bacilo	-	+	+	-	+	<b>38</b>
	2	4	A	Bacilo	-	+	+	+	-	<b>23</b>
	3	6	B	Bacilo	+	+	-	-	-	<b>50</b>
	4	3	A	Bacilo	+	+	+	-	+	<b>39</b>
	5	7	T	Bacilo	-	+	-	-	-	<b>51</b>
	6	2	A	Bacilo	-	+	-	-	-	<b>83</b>
	7	2	T	Bacilo	-	+	-	-	-	<b>45</b>
	8	4	C	Bacilo	-	+	-	-	-	<b>15</b>
	9	4	B	Bacilo	-	+	-	-	-	<b>15</b>
	10	8	Av	Bacilo	-	+	+	+	-	<b>46</b>
	11	7	Av	Bacilo	-	+	+	+	-	<b>46</b>
	12	6	B	Coco	-	+	+	+	+	<b>83</b>
	13	2	R	Bacilo	-	+	+	+	+	<b>28</b>
	14	7	Av	Bacilo	-	+	+	+	-	<b>46</b>
	15	8	Av	Bacilo	-	+	+	+	-	<b>46</b>
	16	4	B	Coco	-	+	+	+	+	<b>83</b>
	17	2	B	Bacilo	-	+	+	-	+	<b>49</b>
	18	2	B	Bacilo	-	+	-	-	-	<b>56</b>
	19	7	B	Bacilo	-	+	-	-	-	<b>51</b>
	20	4	C	Coco	-	+	+	+	-	<b>83</b>
21	6	B	Bacilo	-	+	-	-	-	<b>50</b>	
22	7	B	Bacilo	-	+	+	+	+	<b>46</b>	
23	5	B	Bacilo	-	+	+	+	+	<b>16</b>	

## Apéndice 5 continuación

Fuente	N°	Morfología de colonia		Morfología microscópica		Crecimiento en gasolina como fuente de carbono				Grupo de ARDRA
		Ø (mm)	Color	Forma	Gram	R <sub>2</sub> A	BHGV	BHV	BHG	
<b>(BC)</b>	24	2	C	Coco	+	+	-	+	-	<b>53</b>
	25	4	B	Bacilo	-	+	+	+	+	<b>8</b>
	26	3	B	Bacilo	+	+	+	+	-	<b>35</b>
	27	3	B	Bacilo	-	+	-	-	-	<b>51</b>
	28	4	B	Bacilo	-	+	-	-	-	<b>16</b>
	29	1	A	Bacilo	-	+	+	+	+	<b>64</b>
	30	3	B	Bacilo	-	+	+	+	-	<b>7</b>
	31	4	B	Bacilo	-	+	-	-	-	<b>59</b>
	32	2	B	Bacilo	-	+	-	-	-	<b>57</b>
	33	3	A	Bacilo	-	+	-	-	-	<b>87</b>
	34	3	C	Coco	-	+	-	-	-	<b>83</b>
	35	1	T	Bacilo	-	+	-	-	-	<b>63</b>
	36	1	T	Bacilo	-	+	-	-	-	<b>62</b>
	37	4	T	Bacilo	-	+	-	-	-	<b>70</b>
	38	1	B	Bacilo	-	+	-	-	-	<b>55</b>
	39	4	C	Bacilo	-	+	-	-	-	<b>15</b>
	40	2	T	Bacilo	-	+	-	-	-	<b>71</b>
	41	2	A	Bacilo	-	+	+	+	-	<b>4</b>
	42	1	T	Bacilo	-	+	-	-	-	<b>57</b>
	43	3	B	Bacilo	-	+	-	-	-	<b>60</b>
	44	3	T	Bacilo	-	+	-	-	-	<b>72</b>
	45			Bacilo	-	+	-	-	-	<b>68</b>
	46	2	B	Bacilo	-	+	+	-	+	<b>47</b>
	47	1	A	Bacilo	-	+	+	+	-	<b>40</b>
48	3	A	Bacilo	-	+	-	-	-	<b>1</b>	
49	4	B	Bacilo	-	+	-	-	-	<b>6</b>	

## Apéndice 5 continuación

Fuente	N°	Morfología de colonia		Morfología microscópica		Crecimiento en gasolina como fuente de carbono				Grupo de ARDRA
		Ø (mm)	Color	Forma	Gram	R <sub>2</sub> A	BHGV	BHV	BHG	
Afluente (AFL)	50	2	T	Bacilo	-	+	-	-	-	73
	51	2	T	Bacilo	-	+	-	-	-	62
	52	1	B	Bacilo	-	+	-	-	-	61
	53	2	B	Bacilo	-	+	+	-	+	47
	54	2	R	Bacilo	+	+	+	+	+	65
	1	4	C	Bacilo	-	+	-	-	-	15
	2	3	A	Bacilo	+	+	+	-	+	39
	3	1	R	Bacilo	-	+	-	-	-	10
	4	3	B	Bacilo	-	+	-	-	-	45
	5	2	A	Bacilo	-	+	-	-	-	90
	6	1	B	Bacilo	-	+	-	-	-	67
	7	3	B	Bacilo	-	+	+	+	+	45
	8	1	B	Bacilo	-	+	-	-	-	69
	9	4	A	Bacilo	-	+	-	-	-	3
	10	8	C	Bacilo	+	+	+	+	+	45
	11	2	B	Bacilo	-	+	+	+	-	9
	12	1	A	Bacilo	-	+	+	+	-	40
	13	3	R	Bacilo	-	+	+	+	-	20
	14	2	R	Bacilo	-	+	+	+	-	20
	15	1	B	Bacilo	-	+	-	-	-	68
	16	4	R	Bacilo	-	+	+	+	-	20
17	3	M	Bacilo	-	+	-	-	-	30	
18	7	B	Bacilo	-	+	+	-	+	80	
19	3	R	Bacilo	-	+	-	-	-	12	
20	9	T	Bacilo	-	+	-	-	-	78	
21	4	B	Coco	-	-	+	-	-	37	

## Apéndice 5 continuación

Fuente	N°	Morfología de colonia		Morfología microscópica		Crecimiento en gasolina como fuente de carbono				Grupo de ARDRA
		Ø (mm)	Color	Forma	Gram	R <sub>2</sub> A	BHGV	BHV	BHG	
(AFL)	22	2	R	Bacilo	+	+	+	+	-	32
	23	2	T	Bacilo	-	+	-	-	-	48
	24	1	B	Bacilo	-	+	-	-	-	52
	25	2	R	Bacilo	-	+	+	+	-	20
	26	2	A	Bacilo	-	+	-	-	-	31
	27	3	R	Bacilo	-	+	-	-	-	47
	28	1	B	Bacilo	-	+	-	-	-	36
	29	1	B	Bacilo	-	+	-	-	-	87
	30	2	B	Bacilo	-	+	-	-	-	19
	31	4	B	Bacilo	-	+	-	-	-	2
	32	3	B	Bacilo	-	+	+	+	+	14
	33	3	B	Bacilo	-	+	-	-	-	89
	34	3	A	Bacilo	-	+	-	-	-	12
	35	3	A	Bacilo	-	+	-	-	-	29
	36	1	B	Bacilo	-	+	-	-	-	27
	37	9	A	Bacilo	-	+	-	-	-	79
	38	9	C	Bacilo	-	+	-	-	-	78
	39	1	C	Bacilo	-	+	+	+	+	45
	40	4	B	Bacilo	-	+	-	-	-	15
	41	2	A	Bacilo	-	+	-	-	-	87
	Efluente (EFL)	1	5	B		-	+	-	-	-
2		8	Av	Bacilo	-	+	+	+	-	46
3		2	B	Bacilo	+	+	-	-	-	33
4		3	A	Coco	-	+	-	-	-	42
5		1	B	Bacilo	-	+	-	-	-	63
6		6	A	Coco	-	+	-	-	-	45

## Apéndice 5 continuación

Fuente	N°	Morfología de colonia		Morfología microscópica		Crecimiento en gasolina como fuente de carbono				Grupo de ARDRA
		Ø (mm)	Color	Forma	Gram	R <sub>2</sub> A	BHGV	BHV	BHG	
(EFL)	8	4	A	Bacilo	-	+	-	-	-	3
	9	5	B	Coco	-	+	-	-	-	41
	10	5	B	Bacilo	+	+	+	+	+	34
	11	5	B	Bacilo	+	+	+	+	-	35
	12	6	B	Bacilo	+	+	+	+	-	39
	13	3	R	Bacilo	-	+	+	+	-	20
	14	1	A	Bacilo	-	+	+	+	-	13
	15	5	B	Bacilo	+	+	+	+	-	35
	16	1	B	Bacilo	-	+	+	+	-	47
	17	1	T	Bacilo	-	+	+	+	-	11
	18	6	C	Bacilo	-	+	+	+	-	43
	19	2	B	Bacilo	+	+	+	+	+	34
	20	3	R	Bacilo	-	+	+	+	-	54
	21	1	R	Bacilo	+	+	-	-	-	33
	22	2	B	Bacilo	-	+	+	+	-	76
	23	1	B	Bacilo	-	+	-	-	-	27
	24	2	R	Bacilo	-	+	+	+	+	28
	25	4	C	Bacilo	+	+	+	+	-	5
	26	1	B	Bacilo	-	+	+	+	-	26
	27	8	B	Bacilo	+	+	-	+	-	39
	28	6	B	Bacilo	+	+	-	+	-	39
	29	2	B	Bacilo	+	+	-	+	-	39
	30	2	B	Bacilo	+	+	-	+	-	39
	31	1	R	Bacilo	+	+	+	+	-	32
	32	1	B	Bacilo	-	+	+	+	-	77
	33	3	A	Bacilo	-	+	-	+	-	17

## Apéndice 5 continuación

Fuente	N°	Morfología de colonia		Morfología microscópica		Crecimiento en gasolina como fuente de carbono				Grupo de ARDRA
		Ø (mm)	Color	Forma	Gram	R <sub>2</sub> A	BHGV	BHV	BHG	
(EFL)	35	4	Vi	Bacilo	-	+	+	+	-	<b>85</b>
	36	4	B	Bacilo	-	+	+	+	-	<b>81</b>
	37	9	B	Bacilo	-	+	+	+	-	<b>86</b>
	38	3	B	Bacilo	+	+	+	+	+	<b>34</b>
	39	1	B	Bacilo	-	+	+	+	-	<b>9</b>

Ø= diámetro. B= blanco, R= rosa, A= amarillo, Av= amarillo verdoso, C= crema, T= translúcido, Vi= verde iridiscente, M= marrón. BHGV= Bushnell-Hass + 1% gasolina + vapor de gasolina, BHV= Bushnell-Hass + vapor de gasolina, BHG= Bushnell-Hass + 1% gasolina



## **APÉNDICE 6**

Utilización de fuentes de Carbono por las cepas bacterianas que crecen en gasolina como  
única fuente de Carbono

- 6a. Cepas Gram positivas
- 6b. Cepas Gram negativas del biorreactor
- 6c. Cepas Gram negativas del afluente y efluente

**APÉNDICE 6a.** Utilización de fuentes de carbono por las cepas bacterianas gram-positivas que crecen en gasolina como única fuente de carbono.

Fuente de Carbono	CEPA											
	BW3	BW4	BW5	BW6	BW21	BW22	BW23	BW29	BC24	BC54	E15	E31
$\alpha$ - ciclodextrina	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -ciclodextrina	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
Dextrina	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-
Glicógeno	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Manano	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Tween 40	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Tween 80	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
N-acetil-D-glucosamina	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
N-acetil- $\beta$ -D-mannosamina	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Amigdalina	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
L-arabinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
D-arabitol	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Arbutín	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
D-cellobiosa	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
D-fructosa	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
L-fucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
D-galactosa	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Ácido D-galacturónico	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Gentiobiosa	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Ácido D-glucónico	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
$\alpha$ -D-glucosa	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-
m-Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -D-lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Lactulosa	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Maltosa	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-
Maltotriosa	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-
D-manitol	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
D-manosa	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
D-melezitosa	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-



## Apéndice 6a continuación

Fuente de Carbono	CEPA											
	BW3	BW4	BW5	BW6	BW21	BW22	BW23	BW29	BC24	BC54	E15	E31
Ácido L-láctico	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-
Ácido D-málico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido L-málico	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Ácido pirúvico-metil ester	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
Ác. succínico mono metil ester	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
Ácido succínico	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
Ácido N-acetil-L-glutámico	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
L-alaninamida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D-alanina	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
L-alanina	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
L-alanil glicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-asparagina	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-
Ácido L-glutámico	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-
Ácido glicil-L-glutámico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido L-piroglutámico	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
L-serina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Putrescina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,3 -butanodiol	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Glicerol	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-
Adenosina	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
2'-deoxi-adenosina	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Inosina	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Timidina	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Uridina	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AMP	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
TMP	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
UMP	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
D-fructosa-6-fosfato	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
α-D-glucosa 1-fosfato	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
D-glucosa 6-fosfato	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
D,L-α-glicerol fosfato	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

**APÉNDICE 6b:** Utilización de fuentes de carbono por las cepas bacterianas gram-negativas procedentes de biorreactor que crecen en gasolina como única fuente de carbono.

Fuente de Carbono	CEPA																								
	BW											BC													
	1	2	8	10	12	16	18	19	26	27	28	1	2	4	10	12	17	20	23	25	29	30	41	47	53
α-ciclodextrina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Dextrina	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Glucógeno	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
Tween 40	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Tween 80	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N-acetil-D-galactosamina	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
N-acetil-D-glucosamina	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabinosa	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
D-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-cellobiosa	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
L-irritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
D-fructosa	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+
L-fucosa	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-galactosa	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Gentiobiosa	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
α-D-glucosa	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
m-inositol	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
α-D-lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactulosa	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltosa	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
D-manitol	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
D-manosa	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-



## Apéndice 6b continuación

Fuente de Carbono	CEPA																								
	BW											BC													
	1	2	8	10	12	16	18	19	26	27	28	1	2	4	10	12	17	20	23	25	29	30	41	47	53
Ácido Itanínico	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-
Ácido α-cetobutírico	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-
Ácido α-cetoglutarico	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-
Ácido α-cetovalérico	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Ácido D,L-láctico	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ácido malónico	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido propiónico	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Ácido quínico	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
Ácido D-sacárido	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
Ácido sebásico	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Ácido succínico	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Ácido bromosuccínico	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ácido succinámico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-
Glucoronamida	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I-alaninamida	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
D-alanina	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
L-alanina	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-
L-alanil glicina	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
L-asparagina	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ácido L-aspartico	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ácido L-glutámico	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ác. Glicil-L-aspartico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Ác. Glicil-L-glutámico	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-
L-histidina	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Hidroxi-L-prolina	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

## Apéndice 6b continuación

Fuente de Carbono	CEPA																								
	BW											BC													
	1	2	8	10	12	16	18	19	26	27	28	1	2	4	10	12	17	20	23	25	29	30	41	47	53
L-leucina	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
L-ornitina	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-fenilalanina	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-
L-prolina	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ácido L-piroglutámico	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
D-serina	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
L-serina	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
L-treonina	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-
D,L-carnitina	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido $\gamma$ -aminobutírico	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
Ácido urocánico	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Inosina	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Uridina	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Timidina	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Feniletilamina	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Putrescina	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2-aminoetanol	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,3 butanodiol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicerol	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
D,L- $\alpha$ -glicerol fosfato	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -D-glucosa 1 fosfato	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
D-glucosa 6 fosfato	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+



**APÉNDICE 6c.** Utilización de fuentes de carbono por las cepas bacterianas gram-negativas procedentes de afluente y efluente, que crecen en gasolina como única fuente de carbono

Fuente de Carbono	CEPA														
	A7	A39	E12	E14	E18	E20	E22	E24	E25	E26	E32	E35	E36	E37	E39
$\alpha$ -ciclodextrina	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
Dextrina	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
Glucógeno	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Tween 40	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
Tween 80	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+
N-acetil-D-galactosamina	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
N-acetil-D-glucosamina	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabinosa	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+
D-arabitol	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
D-cellobiosa	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
L-irritol	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-fructosa	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
L-fucosa	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D-galactosa	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
Gentiobiosa	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
$\alpha$ -D-glucosa	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
m-inositol	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
$\alpha$ -D-lactosa	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Lactulosa	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltosa	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
D-manitol	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
D-manosa	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+

## Apéndice 6c continuación...

Fuente de Carbono	CEPA														
	A7	A39	E12	E14	E18	E20	E22	E24	E25	E26	E32	E35	E36	E37	E39
D-melibiosa	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
$\beta$ -metil-D-glucósido	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
D-psicosa	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
D-rafinosa	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
D-trehalosa	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
Turanosa	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
Xilitol	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ácido pirúvico metil ester	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ácido succínico metil ester	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Ácido acético	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
Ácido cis-aconítico	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
Ácido cítrico	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
Ácido fórmico	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ácido D-galactónico lactona	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Ácido D-galacturónico	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Ácido D-glucónico	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Ácido D-glucosamínico	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido D-glucorónico	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Ácido $\alpha$ -hidroxibutírico	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Ácido $\beta$ -hidroxibutírico	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Ácido $\gamma$ -hidroxibutírico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
Ácido p-hidroxi-fenilacético	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Ácido Itanínico	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Ácido $\alpha$ -cetobutírico	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
Ácido $\alpha$ -cetoglutárico	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+

## Apéndice 6c continuación....

Fuente de Carbono	CEPA														
	A7	A39	E12	E14	E18	E20	E22	E24	E25	E26	E32	E35	E36	E37	E39
Ácido $\alpha$ -cetovalérico	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Ácido D,L-láctico	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Ácido malónico	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Ácido propiónico	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
Ácido quínico	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Ácido D-sacárido	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-
Ácido sebásico	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-
Ácido succínico	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
Ácido bromosuccínico	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
Ácido succinámico	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Glucoronamida	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
l-alaninamida	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
D-alanina	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-
L-alanina	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
L-alanil glicina	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
L-asparagina	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-
Ácido L-aspártico	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-
Ácido L-glutámico	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-
Ác. Glicil-L-aspártico	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ác. Glicil-L-glutámico	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
L-histidina	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
Hidroxil-L-prolina	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
L-leucina	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-
L-ornitina	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
L-fenilalanina	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

## Apéndice 6c continuación

Fuente de Carbono	CEPA														
	A7	A39	E12	E14	E18	E20	E22	E24	E25	E26	E32	E35	E36	E37	E39
L-prolina	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Ácido L-piroglutámico	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
D-serina	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
L-serina	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
L-treonina	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
D,L-carnitina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Ácido $\gamma$ -aminobutírico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
Ácido urocánico	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
Inosina	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Uridina	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Timidina	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Feniletilamina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Putrescina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2-aminoetanol	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-
2,3 butanodiol	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicerol	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+
D,L- $\alpha$ -glicerol fosfato	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -D-glucosa 1 fosfato	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
D-glucosa 6 fosfato	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

**APÉNDICE 7.** Crecimiento en anaerobiosis y reducción de nitrato de las cepas que crecen en gasolina como única fuente de carbono.

Cepa	Número	Crecimiento Anaerobio	Presencia de NO <sub>2</sub>	Presencia de NO <sub>3</sub>	Producción de Gas (N <sub>2</sub> )	Cepa	Número	Crecimiento Anaerobio	Presencia de NO <sub>2</sub>	Presencia de NO <sub>3</sub>	Producción de Gas (N <sub>2</sub> )	
<b>BW</b>	<b>1</b>	+	-	-	-	<b>BC</b>	<b>23</b>	+	-	-	-	
	<b>2</b>	+	-	-	-		<b>24</b>	+	-	-	-	
	<b>3</b>	-	-	+	-		<b>25</b>	+	-	-	+	
	<b>4</b>	+	+	-	-		<b>26</b>	+	-	-	-	
	<b>5</b>	+	-	-	-		<b>29</b>	-	-	+	-	
	<b>6</b>	+	-	-	-		<b>30</b>	-	-	+	-	
	<b>8</b>	+	-	-	-		<b>41</b>	-	-	+	-	
	<b>10</b>	+	-	-	-		<b>47</b>	+	-	-	-	
	<b>12</b>	+	-	-	-		<b>53</b>	+	-	-	+	
	<b>16</b>	-	-	+	-		<b>54</b>	+	+	+/-	-	
	<b>18</b>	+	+	-	-		<b>AFL</b>	<b>7</b>	+	-	-	-
	<b>19</b>	+	-	-	+			<b>39</b>	-	-	+	-
	<b>21</b>	+	-	-	+		<b>EFL</b>	<b>2</b>	+	-	-	-
	<b>22</b>	+	-	-	+			<b>12</b>	+	-	-	-
	<b>23</b>	+	-	-	-			<b>14</b>	+	+/-	+/-	-
	<b>26</b>	-	-	+	-			<b>18</b>	+	-	-	-
	<b>27</b>	+	+	-	-			<b>20</b>	-	-	+	-
	<b>28</b>	+	-	-	+			<b>22</b>	+	-	-	-
	<b>29</b>	-	-	+	-			<b>25</b>	+	-	-	+
<b>BC</b>	<b>1</b>	+	-	-	-	<b>26</b>		-	-	+	-	
	<b>2</b>	+	-	-	+	<b>31</b>		+	-	-	-	
	<b>4</b>	+	-	-	-	<b>32</b>	+	-	-	+		
	<b>12</b>	+	-	-	-	<b>35</b>	+	+	+/-	-		
	<b>13</b>	+	+	+/-	-	<b>36</b>	+	-	-	-		
	<b>17</b>	+	-	-	-	<b>37</b>	+	-	-	-		
	<b>20</b>	+	-	-	-	<b>39</b>	+	-	-	-		