

Degradación de *n*-alcanos por *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1

Rosa Salgado Brito¹, Gabriel Pineda Flores¹, Ana María Mesta Howard²,
Francisco Díaz Cedillo², En Tao Wang Hu²

¹Universidad Simón Bolívar

²Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional

Resumen

Los alcanos son el mayor componente de cualquier petróleo crudo. Bacterias, animales y plantas producen también estos compuestos. Cuando los *n*-alcanos sólidos, también llamados parafinas, son derramados al ambiente, forman una densa capa en la superficie que impide el transporte de oxígeno y nutrientes, afectando la calidad y funcionalidad del suelo. Los informes de bacterias que degradan parafinas son escasos; por tanto, resulta de interés el hecho de que *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1 pueda degradar queroseno, diesel y otros compuestos con alto contenido de alcanos. En este trabajo se determinó que *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1 utiliza y degrada *n*-alcanos entre 11 y 40 átomos de carbono. La rapidez para degradar dichos compuestos disminuye conforme la cadena hidrocarbonada aumenta o disminuye alrededor de C20. En este estudio también se desarrolló un método fácil y confiable de cromatografía de gases para cuantificar los *n*-alcanos, el cual se usó para analizar la eficiencia de la degradación de los mismos por el microorganismo estudiado.

Palabras clave: degradación, alcanos, *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1.

Abstract

Alkanes are the principal component of petroleum. Bacteria, animals and plants also produce these components. When the solid *n*-alkanes, also called paraffins, are spilt onto the field, they form a dense layer on the surface that hinders the oxygen and nutrients transport, affecting the quality and functionality of the soil. Only a few bacteria have been reported to be able to degrade paraffins, therefore it is surprising that the *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1, a strain isolated from petroleum contaminated soil in a previous study, can degrade kerosene, diesel and other compound with a high content of alkanes. In the present study the uses and degradation of *n*-alkanes between 11 and 40 carbon atoms by *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1 were analyzed. The speed to degrade and to oxidize these compounds diminishes as the hydrocarbon chain increases or diminishes around C20. In this study, a fast and reliable quantification method of GS chromatography was also developed. It was used to analyze the degradation efficiency of each alkane by the tested strain.

Keywords: degradation, alkanes, *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1.

Introducción

En el medio ambiente y especialmente en sitios contaminados con petróleo, es posible aislar microorganismos capaces de degradar hidrocarburos aromáticos mono y polinucleados, o bien, hidrocarburos alifáticos como los *n*-alcanos. (Bossert y Bartha, 1984; Foght et.al., 1989; Leahy y Colwell, 1990; Westlake et.al.,1974; Whyte et.al.,1996; Whyte et.al.,1997).

Numerosas bacterias son capaces de crecer sobre alcanos gaseosos y líquidos (Ratajczak et.al., 1998; Hamamura et.al., 1999); pero existen muy pocos reportes acerca de la capacidad para degradar *n*-alcanos sólidos (parafinas) con cadena mayor a C18 (Sakai et.al., 1994; Whyte, et.al., 1998). Haines y Alexander (1974) fueron los primeros en reportar que *n*-alcanos de siete a 44 átomos de carbono fueron metabolizados por algunos microorganismos, si bien se han reportado cuatro géneros bacterianos con capacidad para usar *n*-alcanos con más de 20 átomos de carbono.

Por su parte, Sakai et al., (1994) demostró el uso de *n*-alcanos de cadena larga (C13-C44) por *Acinetobacter* sp. M-1; mientras que Lai y Khanna (1996) investigaron la mineralización de octacosano por *A. calcoaceticus* S30. Pero Radwan et.al., (1996) reportó crecimiento de *Arthrobacter nicotianae* KCCB35 sobre *n*-alcanos de C10 a C40 como única fuente de carbono y energía. De igual forma, se determinó que *Rhodococcus* sp. cepa Q15 es capaz de degradar *n*-alcanos puros y diesel a bajas temperaturas, mineralizando dodecano y hexadecano así como alcanos con 28 y 32 carbonos (Whyte et.al., 1998).

El género de *Pseudomonas* es bien conocido por su capacidad para degradar hidrocarburos aromáticos y alifáticos (Fish et.al., 1982; Parekh et.al., 1977; Rosenberg, 1992; Whyte et.al., 1997). Los *n*-alcanos susceptibles al ataque microbiano comprenden desde el metano hasta el heptadecano, por las especies de *P. methanica*, (CH₄) *P. oleovorans* (C5-C12) y *Pseudomonas aeruginosa* (C12-C17); sin embargo, no se ha reportado ninguna cepa de este género con capacidad para degradar *n*-alcanos sólidos (Singer y Finnerty, 1984). En un trabajo previo se aisló *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1 a partir de suelo contaminado con hidrocarburos y se demostró que crece y degrada queroseno; en el presente trabajo se investigó su capacidad para degradar *n*-alcanos y la preferencia que tiene sobre éstos (Grimaldo, 1997).

Objetivo

Determinar la capacidad de *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1 para degradar *n*-alcanos.

Método

Utilización de alcanos

Se determinó la utilización de los alcanos puros: pentano (C₅), hexano (C₆), heptano (C₇), octano (C₈), nonano (C₉), decano (C₁₀), undecano (C₁₁), dodecano (C₁₂), tetradecano (C₁₄), hexadecano (C₁₆), eicosano (C₂₀), tetracosano (C₂₄), triacontano (C₃₀), dotriacontano (C₃₂), hexatriacontano (C₃₆) y tetracontano (C₄₀) en el medio mineral M9 (Sambrook et.al., 1989). Éste se preparó con (g/L): 6 de Na₂HPO₄, 3 de KH₂PO₄, 0.5 de NaCl, 2.0 de NH₄Cl. Se esterilizó a 121°C, 15lb de presión durante 15 min.; posteriormente se le adicionaron 2.0 ml/L de una solución de MgSO₄ 7H₂O 1M y 100µl/L de CaCl₂ 1M, ambas soluciones esterilizadas previamente.

Los cultivos para determinar la utilización de alcanos y las cinéticas de crecimiento se realizaron en matraces con 50 ml del medio mineral M9 con 1% de los alcanos puros y un inóculo 500 µl de un cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1, con una turbiedad de entre 200-300 Unidades Klett (UK), medida en un fotocolorímetro Klett con filtro azul. Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente con agitación de 150 rpm; su crecimiento se midió determinando las UK medidas en un fotocolorímetro Klett con filtro azul a diferentes tiempos hasta que se alcanzó el máximo crecimiento. Los testigos negativos para evaluar crecimiento y degradación no fueron inoculados. También se preparó un testigo sin fuente de carbono.

Cuantificación de *n*-alcanos por cromatografía de gases

Primero se seleccionó el solvente para extraer las fases orgánicas de los cultivos de acuerdo a Salgado-Brito (1998) utilizando benceno, diclorometano, tetracloruro de carbono y tolueno, así como los alcanos C₁₆, C₂₄, C₃₀ y C₄₀. Una vez seleccionado el solvente que permitiera extraer el mayor porcentaje de alcanos y considerando sus características químicas, se probaron dos alternativas para cuantificar los alcanos por cromatografía de gases, utilizando dos columnas con dos rampas de temperatura en

el horno y diferentes temperaturas tanto en el inyector como en el detector, de acuerdo con las rampas probadas.

Los mismos alcanos utilizados en la selección del disolvente se emplearon para estandarizar y montar los métodos cromatográficos; cada alcano se extrajo con diclorometano y benceno, cada extracto se analizó en cada una de las columnas y en cada una de éstas se probaron las dos rampas de temperatura (ver tabla 1).

Tabla 1. Condiciones para el análisis y cuantificación de *n*-alcanos por cromatografía de gases.

CONDICIONES	N-ALCANOS PENTANO (C ₅) A TETRACOSANO	N-ALCANOS TRICONTANO (C ₃₀) A TETRACONTANO (C ₄₀)
Columna	Capilar marca Quadrex de sílica fundida. 50% fenil metilpolisiloxano. 30 m de longitud y 0.32 mm de diámetro interno y 0.5µm de película.	Capilar marca Perkin Elmer - 5 de sílica fundida. 5% fenil, metilpolisiloxano. 30m de longitud- 0.53mm de diámetro interno y 0.5µm de película.
Gas acarreador	Nitrógeno 10psi	Nitrógeno 10psi
Rampa de temperatura del horno	70°C, 5min 70°C- 250°C en 10°C / min.	55°C 5 min. 55- 280°C 5 min. Rampa de 3°C/min hasta 310°C.
Inyector manual Split y volumen de inyección	Inyección 1µl 250°C	Inyección 1µl 310°C
Detector Ionización de flama	280°C	310°C
Tiempo de corrida	30 min.	75 min.

Degradación de *n*-alcanos

La degradación de los alcanos se hizo en cultivo por lote y por duplicado. Antes de llegar a la fase estacionaria de crecimiento se extrajo la fase orgánica tres veces en un embudo de separación con diclorometano a los cultivos con C₁₁ y hasta C₂₄, y con benceno a los que tenían de C₃₀ hasta C₄₀. Las fases orgánicas fueron colectadas en matraces y deshidratadas pasándolas a través de un papel filtro Wathman 1 con Na₂SO₄. Después se concentraron las muestras por destilación con un rotovapor. Para analizar las fases orgánicas residuales se inyectó 1 µl de la fase orgánica en un cromatógrafo de gases (Perkin Elmer AutoSystem XL, con detector de ionización de flama), conforme a los datos de la Tabla 1.

Análisis estadístico

Los resultados referentes a los porcentajes de degradación se analizaron estadísticamente por análisis de varianza (ANOVA), utilizando una distribución de tipo normal con el programa GLIM versión 3.77.

Resultados

Utilización de alcanos

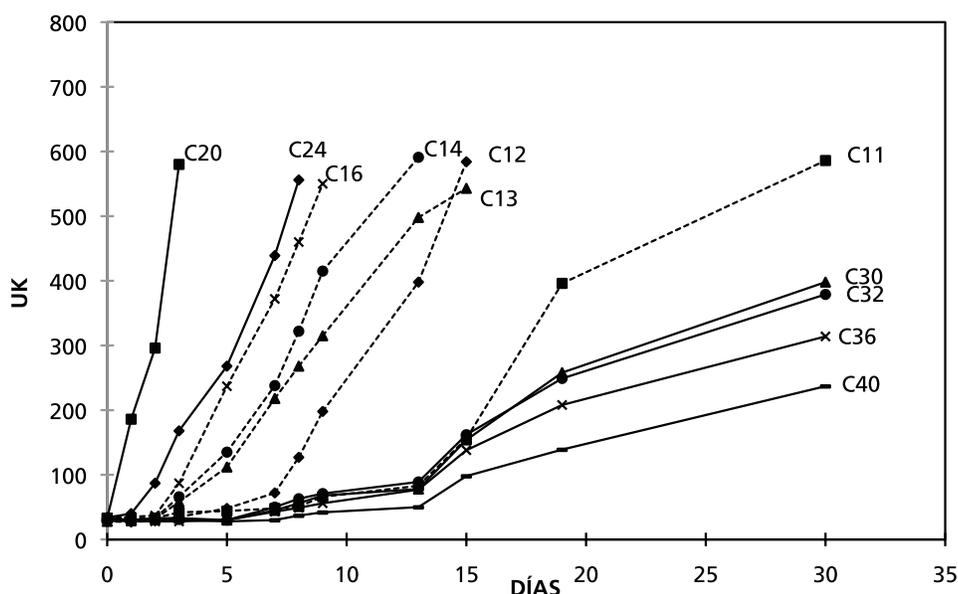
Pseudomonas aeruginosa MGP-1 utilizó como fuente de carbono y energía *n*-alcanos con 11 y hasta 40 átomos de carbono. El más pequeño en el que creció fue el C₁₁, y el más grande el C₄₀. Los alcanos con 5 a 10 átomos de carbono no fueron utilizados como fuentes de carbono y energía. En el estudio cinético se encontró que el mejor crecimiento se obtuvo al cultivar la cepa con C₂₀. Lo opuesto se obtuvo con alcanos de 30 a 40 átomos de carbono (ver figura 1).

Las cinéticas muestran que conforme disminuye o aumenta el número de carbonos en la cadena del alcano, el tiempo que tardan los cultivos para obtener un valor aproximado al máximo obtenido en C20, es mayor.

Cuando C12, C13 y C14 fueron utilizados para cultivar la cepa, se obtuvo el crecimiento máximo hasta después de 10 días de incubación; mientras que para el C11 el crecimiento máximo se obtuvo a los 30 días de incubación.

Por otra parte, al utilizar alcanos con más de 30 átomos de carbono, hasta el tiempo que se mantuvo la cinética (30 días), nunca se alcanzó el crecimiento máximo observado cuando se utilizó C20. Sin embargo, sí se obtuvo crecimiento, ya que las UK aumentaron hasta un 300% más con respecto al tiempo cero (ver figura 1).

Figura 1. Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1, sobre diferentes *n*-alcanos.



Las líneas punteadas muestran alcanos de C₁₁ a C₁₆ y las continuas a los alcanos con C₂₀ a C₄₀, midiendo crecimiento por turbiedad en UK.

Las velocidades específicas de crecimiento sobre cada uno de los *n*-alcanos fueron calculadas para determinar la rapidez con que crece la cepa en los diferentes sustratos. La velocidad de crecimiento se determinó calculando la pendiente de las rectas obtenidas de la cinética de crecimiento, midiendo dicho crecimiento por determinación de UFC (datos no mostrados en este trabajo) para cada alcano mediante la siguiente ecuación.

$$\mu = 2.302(\log \text{ UFC/mL a un } t_2 - \log \text{ UFC / mL a un } t_1) / t_2 - t_1$$

donde:

μ : Velocidad específica de crecimiento.

2.302: Factor constante para convertir log en ln.

log de las UFC/ml a un t_2 : Log de las UFC/ml a un tiempo 2 en la grafica.

log de las UFC/ml a un t_1 : Log de las UFC/ml a un tiempo 1 en la grafica.

t_2 es el tiempo 2.

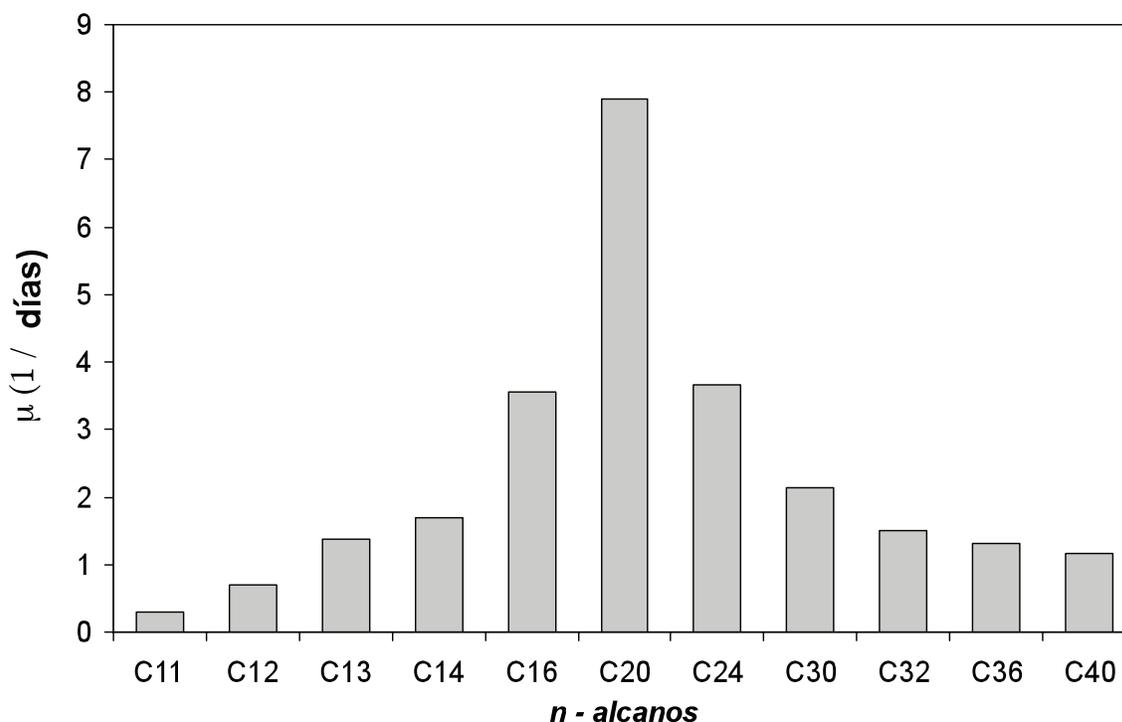
t_1 es el tiempo 1.

Las velocidades de crecimiento van aumentando al crecer la cadena carbonada de C_{11} a C_{16} , encontrando la mayor velocidad al utilizar el C_{20} . Después, al aumentar la cadena del alcano, ocurre una disminución de este parámetro, como cuando el C_{24} es utilizado. Las velocidades de crecimiento más pequeñas se obtuvieron cuando se utilizaron alcanos de C_{30} a C_{40} (ver figura 2).

Cuantificación de *n*-alcanos por cromatografía de gases

Los resultados referentes a la selección del solvente para extraer los alcanos residuales demostraron que el benceno permitía el mejor porcentaje de extracción de los C_{16} , C_{24} , C_{30} y C_{40} , los cuales fueron 96, 94.8, 93.6 y 93.5 % respectivamente. El diclorometano, por otro lado, logró extraer el 92.4, 91.3, 89.4 y 88.3 respectivamente. Sin embargo, y considerando que el benceno es muy tóxico, se decidió extraer los alcanos con menos de 30 átomos de carbono con el diclorometano, ya que un valor mayor al 90% es una buena recuperación. Por otro lado, el tetracloruro de carbono y el tolueno, como disolventes, permitieron extracciones menores al 85% y considerando su alta toxicidad, no fueron seleccionados para hacer las extracciones de la fase acuosa del cultivo. Con relación a la optimización del método cromatográfico, en la tabla 1 se muestran los dos métodos que permitieron los mejores resultados de resolución y separación de las áreas bajo la curva de los alcanos C_{16} , C_{24} , C_{30} y C_{40} .

Figura 2. Velocidades específicas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1 en cada uno de los *n*-alcanos utilizados.



Degradación de alcanos

Respecto a los porcentajes de degradación obtenidos para cada uno de los *n*-alcanos probados, se obtuvo que éstos son proporcionales al crecimiento de la cepa. El porcentaje más alto de degradación (60%) se obtuvo cuando se utilizó C_{20} como sustrato. Los porcentajes de degradación fueron disminuyendo conforme disminuyó o aumentó la cadena de carbonos. Los porcentajes de degradación más bajos (menor de 18%) se presentaron con C_{40} , C_{36} , C_{32} , C_{30} , y C_{11} (ver tabla 2 y figura 3). En la figura 3 se presentan los cromatogramas obtenidos de la extracción de la fase orgánica de los sobrenadantes de los cultivos de la cepa en C_{11} , C_{20} y C_{40} , después de un tiempo de incubación de 16 días. En A se pueden apreciar los testigos a los cuales no se

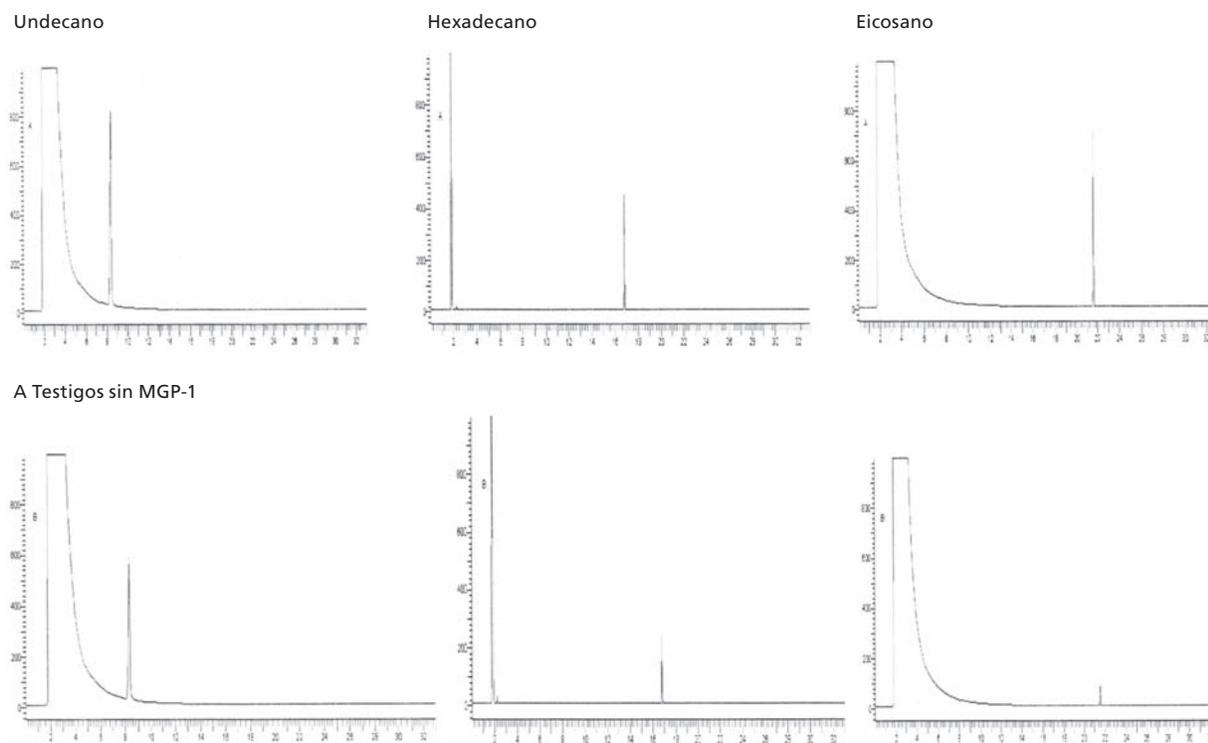
les inoculó la cepa. En B se muestran los cultivos problema o cultivos inoculados con la cepa. La disminución del área de C_{20} es notable después de 16 días, con respecto al área del testigo sin inocular y al testigo al tiempo cero, cuyo resultado por ser similar al testigo sin inocular a los 16 días no se muestra en la figura. Los cromatogramas obtenidos al analizar el C_{11} muestran poca disminución del área de C_{11} y mucho menos de C_{40} . La disminución del área obtenida de los alcanos C_{16} y C_{24} fue muy similar, lo cual probablemente se deba a que existe la misma diferencia de carbonos con respecto al C_{20} .

Tabla 2. Porcentajes de degradación de los n-alcamos probados.

<i>n</i> -alcano	% Degradación
Pentano C_5	0.0
Hexano C_6	0.0
Heptano C_7	0.0
Octano C_8	0.0
Nonato C_9	0.0
Decano C_{10}	0.0
Undecano C_{11}	18.3
Dodecano C_{12}	21.3
Tridecano C_{13}	28.4
Tetradecano C_{14}	32.5
Hexadecano C_{16}	49.0
Cosano C_{20}	60.0
Tetracosana C_{24}	47.0
Triacotano C_{30}	16.4
Dotriacotano C_{32}	12.4
Hexatriacontano C_{36}	13.0
Tetracontano C_{40}	12.0

El análisis estadístico de los porcentajes de degradación demuestran que C_{20} es diferente significativamente a todos los porcentajes obtenidos y que los porcentajes de degradación de C_{16} y C_{24} no son diferentes significativamente; los porcentajes de C_{30} , C_{32} , C_{36} y C_{40} son iguales significativamente entre ellos, mientras que los porcentajes del C_{11} , C_{12} y C_{13} y C_{14} si son diferentes significativamente. Todo lo anterior puede observarse en la figura 3.

Figura 3. Cromatogramas obtenidos de los sobrenadantes de los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* propagada durante 16 días en C₁₁, C₁₆ y C₂₀



B Problemas con MGP-1.

Discusión

Los *n*-alcanos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, principalmente en mezclas complejas de hidrocarburos como diesel, aceites y petróleo; en este último puede representar cerca del 20 al 50 % sobre todo en petróleo crudo (Smits et.al., 2003; Marin et.al., 2003). La contaminación del ambiente es inherente a la extracción, transportación y manejo del petróleo (Oudot, 2000; Amat et.al., 2004; Yamamoto et.al., 2003; Short et.al., 2007).

Aun cuando los *n*-alcanos no son tóxicos al hombre u otros seres vivos, sí afectan el equilibrio del ambiente al presentarse un derrame, pues si éstos son parcialmente solubles en la mezcla de hidrocarburos (gracias a la presencia de los mismos alcanos volátiles, gaseosos y líquidos), ahora se solidifican formando una capa densa difícil de degradar (Salvayre et.al., 1988; Baxter et.al., 1991; Koma et.al., 2001).

De acuerdo con lo anterior, es importante estudiar microorganismos que degradan alcanos de alto peso molecular (además de los que degradan alcanos líquidos de 12 hasta 17 carbonos) que pueden ser recalcitrantes por su condición física (sólido), como las parafinas o alcanos de más de 18 átomos de carbono.

Cuantificación de *n*-alcanos por cromatografía de gases

Se han realizado numerosas investigaciones sobre la biodegradación de *n*-alcanos y de otros hidrocarburos, pero no se habían efectuado estudios cuantitativos sobre remoción de todos estos compuestos sólidos, por la dificultad de recuperación y cuantificación de ellos debido a las diferencias de tamaño de los *n*-alcanos. Por otra parte, conforme aumenta la cadena carbonada, disminuye la solubilidad y aumenta tanto el punto de fusión como el de evaporación y, por tanto, estos puntos o temperaturas de fusión y de evaporación son críticos para realizar el análisis por cromatografía de gases.

Previo a la extracción de las fases orgánicas de los alcanos, se les realizaron pruebas de solubilidad. De tal ensayo se obtuvo que el benceno es el disolvente con el que se obtiene la mayor recuperación, pero debido a su toxicidad se prefirió usar el diclorometano, con el que se obtuvo también muy buena recuperación de los alcanos menores a 30 carbonos, mientras que para alcanos mayores de C_{30} se determinó el uso exclusivo de benceno.

Por otro lado, debido a las propiedades de los alcanos (estado físico en el que se encuentran a temperatura ambiente) fue necesario utilizar dos diferentes métodos de cromatografía de gases para poder cuantificar los alcanos residuales en los cultivos. La diferencia de los métodos cromatográficos consistió en utilizar dos tipos de columnas cromatográficas, una para alcanos de 5 hasta 24 átomos de carbono y otra para alcanos con más de 24 átomos de carbono, así como diferentes rampas de temperatura en el horno y distintas temperaturas en el inyector y detector, mismas que pueden verse en la tabla 1. Lo anterior se debió a la necesidad de alcanzar temperaturas en las cuales las muestras se gasificaran para poder llevar a cabo el desarrollo de la técnica de cromatografía, de lo contrario es imposible el análisis si esta condición no se cumple.

La utilización de dos protocolos cromatográficos permitió obtener áreas bajo la curva de cada uno de los alcanos bien separadas y resueltas, lo que facilitó calcular el porcentaje de degradación dependiente del área bajo la curva obtenida para cada alcano. El establecimiento de este método cromatográfico ofreció una base para hacer de manera precisa los análisis de remoción de alcanos en el presente trabajo.

Utilización y degradación de alcanos

Los reportes de bacterias que tienen la capacidad para utilizar *n*-alcanos sólidos no han permitido definir con exactitud cómo se lleva a cabo la utilización y degradación de estos compuestos (Miller y Johnson, 1966; Haines y Alexander, 1974; Klug y Markovetz, 1971). Los géneros bacterianos reportados son: *Acinetobacter* sp. ADP1 (C_{13} - C_{44}) (Sakai et al., 1994; Lai y Khanna, 1996; Koma et al., 2001), *Acinetobacter* sp. M-1 (Maeng et al., 1996), *Arthrobacter nicotianae* KCCB35 (Radwan et al., 1996), *Rhodococcus* sp. Q15 (Whyte et al., 1998), *Pseudomonas* PAO1 y RR1 (Marín et al., 2003) y *Bacillus* sp. NG80-2 (C_{15} to C_{36}) (Wang et al., 2006); sin embargo, en ninguno de los trabajos antes mencionados se determinó el intervalo de alcanos

que puede usar cada cepa, no se hicieron cinéticas de crecimiento, ni determinaciones del porcentaje de degradación para cada *n*-alcano.

Sólo en el caso de *Arthrobacter nicotianae* KCCB35 se reportó su crecimiento sobre *n*-alcanos de C_{10} a C_{40} como única fuente de carbono y energía, determinándose que el mejor crecimiento fue con C_{10} a C_{18} , pero no se demostró convincentemente el crecimiento de la cepa sobre estos hidrocarburos alifáticos. Con base en los resultados del presente trabajo, *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1 es la segunda bacteria Gram negativa que puede degradar parafinas de hasta 40 carbonos.

Trabajos más detallados como el de Sakai et al. (1994) y de Whyte et al. (1998) demuestran en el primer caso que *Acinetobacter* sp. M-1 puede utilizar alcanos de C_{25} hasta C_{37} , debido a que enzimas aisladas de esta cepa logran oxidar estos sustratos. Por otro lado, el crecimiento reportado sobre los *n*-alcanos fue diferente para cada alcano; en éstos se presentó su mayor crecimiento en un tiempo definido en el C_{24} , seguido del C_{28} y C_{20} ; también se observó que en los alcanos menores a C_{20} y mayores a C_{28} el crecimiento fue menor en el tiempo establecido, aun cuando no se realizaron las cinéticas de crecimiento que brindan un mejor entendimiento de lo que ocurre al cambiar los sustratos.

Resultados similares a los de Sakai et al. (1994) fueron encontrados en este trabajo donde hemos utilizado *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1, ya que crece más rápido cuando se cultiva en C_{20} (ver figuras 1 y 2). En este caso, el crecimiento es más lento a medida que la cadena hidrocarbonada disminuye o aumenta. Sin embargo, es muy notable que después de 30 átomos de carbono el crecimiento de la cepa sea extremadamente lento, lo cual puede deberse básicamente a que el transporte de una cadena larga es más difícil que el de cadenas medianas y requerirá más energía.

La relación entre la energía que se necesita para transportar y oxidar (por hidroxilación terminal) un *n*-alcano y la energía producida por su degradación, podría ser la explicación de la diferencia en la velocidad de crecimiento de la bacteria usando distintos *n*-alcanos como única fuente de carbono. *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1 no es capaz de crecer en alcanos menores a 10 átomos de carbono, lo que podría deberse a que el sistema enzimático que oxida los alcanos no reconoce alcanos menores de 10 carbonos (Maeng et al., 1996).

En el segundo caso la cepa *Rhodococcus sp* Q15 creció en dodecano, hexadecano y los alcanos con cadena larga (C_{28} y C_{32}), puesto que se demostró la mineralización de los mismos. La cepa mineralizó en mayor proporción en C_{16} y C_{17} (Whyte et.al., 1998), por lo que es importante señalar que esta cepa al igual que *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1, mineralizó y creció más rápido en dos alcanos (mientras que MGP-1 sólo creció más rápido y degradó más en un tiempo definido a un único alcano de los probados, el C_{20}).

El sistema enzimático de Q15 tiene especificidad parcial sobre dos sustratos y el sistema enzimático de *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1 es específico parcialmente con preferencia a un sustrato (C_{20}), pero de ninguna manera Q15 alcanza los mismos resultados de crecimiento o de degradación que se obtienen con MGP-1, tal y como se ve al medir los porcentajes de degradación de las parafinas obtenidos con *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1 (ver tabla 2 y figura 3).

El porcentaje más alto de degradación se obtuvo cuando *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1 utilizó el C_{20} . La degradación disminuye a medida que la cadena de carbono aumenta o disminuye. Para alcanos muy cercanos a C_{20} la diferencia es muy poca y aumenta conforme la cadena se aleja del C_{20} . Fue necesario establecer un tiempo en el cual se pudieran comparar los porcentajes de degradación de cada alcano tal como lo hicieron Sakai et.al. (1994), que obtuvieron los porcentajes del remanente de cada alcano en un tiempo específico. Sus resultados muestran diferencia con los de este trabajo en el sentido de que el porcentaje de sustrato remanente a las 12 horas fue menor en C_{16} , es decir, este alcano fue degradado más rápidamente por *Acinetobacter sp.* M-1, pero a las 36 horas la degradación o el sustrato remanente fue igual para C_{13} , C_{20} , C_{24} y C_{28} en el cultivo de M-1.

En el caso de la degradación del C_{16} por *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1, el porcentaje de degradación fue menor y aun a los 16 días pocos alcanos probados lograron acercarse al porcentaje de degradación obtenido con el C_{20} . Sin embargo, el intervalo de alcanos que *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1 utiliza es más grande, ya que esta cepa utiliza alcanos líquidos que tienen entre 11 y hasta 17 átomos de carbono y sólidos de entre 18 y 40 átomos de carbono, que fue el alcano probado con mayor cantidad de carbonos. Esta característica representa una ventaja competitiva al usarse en la recuperación de un sitio contaminado (ver tabla 2).

Conclusión

Pseudomonas aeruginosa MGP-1 es capaz de crecer en medios de cultivo con *n*-alcanos (C_{11} a C_{40}) como fuente de carbono y energía. Sin embargo, el C_{40} fue el alcano de cadena más largo probado, es decir, no se logró determinar en este trabajo cuál es el alcano más pesado que la cepa puede utilizar. *Pseudomonas aeruginosa* crece más rápido usando C_{20} como fuente de carbono y la velocidad de crecimiento disminuye al aumentar o disminuir el tamaño de la cadena hidrocarbonada.

Para demostrar y cuantificar la degradación de los alcanos y su oxidación, se establecieron dos métodos cromatográficos; un único método no bastó para cuantificar los alcanos, debido al intervalo amplio de puntos de evaporación que tienen estos compuestos. En los métodos cromatográficos usados fue necesario considerar el peso molecular del alcano, el disolvente, la solubilidad del alcano en el disolvente seleccionado, la temperatura de fusión y de evaporación, así como las temperaturas del puerto de inyección, del horno y del detector del cromatógrafo y el tipo de columna, para obtener resultados en la separación y resolución de las áreas bajo la curva de los *n*-alcanos y de los productos de oxidación de los mismos.

La remoción o degradación (%) de los *n*-alcanos por *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1 es directamente proporcional al crecimiento de la bacteria; con C_{20} se obtiene la velocidad de crecimiento y la degradación más alta y de igual manera, al aumentar o disminuir el tamaño de la cadena hidrocarbonada, la degradación disminuye hasta el porcentaje más bajo de 13% en los casos de C_{32} , C_{36} y C_{40} . 

Referencias

- Amat, Pfohl-Leszkwicz A., Burgeot, T. y Castegnaro, M. (2004). DNA adducts as a biomarker of pollution: field study on the genotoxic impact evolution of the Erika oil spill on mussels (*Mytilus edulis*) over a period of eleven months. *Polycyclic Aromatic Compounds*. 24: 713-732.
- Baxter, C., Andringa, A., Chalfin, K. y Miller, M. (1991). *Effect of tumor-promoting agents on density and morphometric parameters of mouse epidermal Langerhans and Thy-1+ cells*. *Carcinogenesis*. 12:1017-1021.
- Bossert, I. y Bartha, R. (1984). The fate of petroleum in soil ecosystems. In R. M. Atlas (ed), *Petroleum microbiology*. New York, N.Y.: Macmillan Publishing Co. pp. 453-474.
- Fish, N. M., Allenby, D. J. y Lilly, M. D. (1982). Oxidation of *n*-alkanes: Growth of *Pseudomonas putida*. *Eur. J. Appl Microbiol. Biotech.* 14: 259-262.

- Foght, J. M., Fedorak, P. M. y Westlake, D. S. W. (1989). *Mineralization of [¹⁴C] hexadecane and [¹⁴C] Phenanthrene in crude oil: specificity among bacterial isolates. Can J. Microbiol.* 36:169-175.
- Grimaldo, J.C. (1997). *Pseudomonas* sp. MGP-1 como posible agente de recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto Politécnico Nacional: México.
- Haines, J.R. y Alexander, M. (1974). Microbial degradation of high molecular weight alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* 28: 1084-1085.
- Hamamura, N., Ryan, T. S., Lewis, S. y Arp, D. J. (1999). Diversity in Butane Monooxygenases among Butane-Grown Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4586-4593.
- Klug, M. J. y Markovetz, A. J. (1971). Utilization of aliphatic hydrocarbons by microorganisms. *Adv. Microbiol. Physiol.* 5:1-43.
- Koma, D., Hasumi, F., Yamamoto, E., Ohta, T., Chung, S. Y. y Kubo, M. (2001). *Biodegradation of long-chain n-paraffins from waste oil of car engine by Acinetobacter sp. J. Biosci. Bioengin.* 91: 94-96.
- Lai, B. y Khanna, S. (1996). *Mineralization of [¹⁴C] octacosane by Acinetobacter calcoaceticus S30. Can J. Microbiol.* 42:1225-1231.
- Leahy, J. G. y Colwell, R. R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environmental *Microbiol. Rev.* 54: 305-315.
- Maeng, J. H., Sakai, Y., Tani, Y. y Kato, N. (1996). Isolation and characterization of a novel oxygenase that catalyzes the first step of n-alkane oxidation in *Acinetobacter* sp. strain M-1. *J. Bacteriol.* 178: 3695-3700.
- Marín, M. M., Yuste, L., y Rojo, F. (2003). Differential expression of the components of the two alkane hydroxylases from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 185:3232-3237.
- Miller, T.L. y Johnson, M.J. (1966). *Utilization of normal alkanes by yeasts. Biotechnol. Bioeng.* 8: 549-565.
- Oudot, J. (2000). *Biodegradation of Erika fuel oil. C R Acad Sci III.* V. 323 N. 11 pp 945-950.
- Parekh, V. R., Traxler, R. W. y Sobek, J. M. (1977). N-Alkane oxidation enzymes of a pseudomonas. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 881-884.
- Radwan, S. S. y Sorkhoh, N. A. (1993). N-alkane-utilizing microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* 39: 28-90.
- Radwan S. S., Sorkhoh, N. A., Felzmann, H. y El-Desouky, A. F. (1996). Uptake and utilization of n-octacosane and n-nonacosane by *Arthrobacter nicotianae* KCC B35. *J. Appl. Bacteriol.* 80: 370-374.
- Ratajczak, A., Geißdörfer, W. y Hillen, W. (1998). Alkane hydroxylase from *Acinetobacter* sp. strain ADP-1 is encoded by *alkM* and belongs to a new family of bacterial integral-membrane hydrocarbon hydroxylases. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1175-1179.
- Rosenberg, E. (1992). *The hydrocarbon-oxidizing bacteria. In The prokaryotes, 2nd ed., Vol. I, p 446-459. A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K. H. Schleifer (eds.) New York, N.Y.: Springer-Verlag.*
- Sakai, Y., Maeng, J. H., Tani, Y. y Kato, N. (1994). *Use of long chain n-alkanes (C13-C44) by an isolate, Acinetobacter sp M-1. Biosci. Biotech. Biochem.* 58: 2128-2130.
- Salgado-Brito, R. (1998). *Consortio microbiano degradador de petróleo maya.* Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional: México.
- Salvayre, R., Negre, A., Rocchiccioli, F., Duboucher, C., Maret, A., Vieu, C., Lageron, A., Polonovski, J. y Douste-Blazy, L. (1988). *A new human pathology with visceral accumulation of long-chain n-alkanes; tissue distribution of the stored compounds and pathophysiological hypotheses. Biochim. Biophys. Acta,* 958: 477-483.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Short, J. W., Irvine, G. V., Mann, D. H., Maselko, J. M., Pella, J.J., Lindeberg, M. R., Payne, J. R., Driskell, W.B. y Rice, S. D. (2007) Slightly weathered Exxon Valdez oil persists in Gulf of Alaska beach sediments after 16 yrs. *Environ Sci. Technol.* 4: 1245-1250.
- Singer, M. E. y W.R. Finnerty (1984). *Petroleum Microbiology.* R. M. Atlas (Ed). USA: Mcmillan Publishing Co.
- Smits, C.A., O'Reilly, K.T. y Hyman, M.R. (2003). Cometabolism of methyl tertiary butyl ether and gaseous n-alkanes by *Pseudomonas mendocina* KR-1 grown on C5 to C8 n-alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:7385-7394.
- Wang, E.T., Van Berkum, P., Sui, X.H., Beyene, D., Chen, W.X. y Martínez-Romero, E. (2006). *Diversity of rhizobia associated with Amorpha fruticosa isolated from Chinese soils and description of Mesorhizobium amorphae sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol.,* 49: 51-65.
- Westlake, D. W. S., Jobson, A., Phillippe, R. y Cook, F. D. (1974). *Biodegradability and crude oil composition. Can. J. Microbiol.* 20:915-928.
- Whyte, L. G., Greer, C. W. y Inniss, W. E. (1996). *Assessment of the biodegradation potential of psychrotrophic microorganisms. Can. J. Microbiol.* 42:99-106.
- Whyte, L. G., Bourbonnière, L., Inniss, W.E. y Greer, C. W. (1997). Biodegradation of petroleum hydro carbons by psychrotrophic *Pseudomonas* strains possessing both alkane (alk) and naphthalene (nah) catabolic pathways. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3719-3723.
- Whyte, L. G., Hawari, J., Zhou, E., Bourbonnière, I., Inniss, W.E. y Greer, C. W. (1998). Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by a psychrotrophic *Rhodococcus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2578-2584.
- Yamamoto, T., Nakaoka, M., Komatsu, T., Kawai, H. y Takeno Ohwada, K. (2003). *Impacts by heavy-oil spill from the Russian tanker Nakhodka on intertidal ecosystems: recovery of animal community. Mar Pollut. Bull.* 47:91-98.