



Fachhochschule Köln
Cologne University of Applied Sciences



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTADES DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA
PROGRAMAS MULTIDISCIPLINARIOS DE POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

AND

COLOGNE UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES
INSTITUTE FOR TECHNOLOGY AND RESOURCES MANAGEMENT IN THE TROPICS AND SUBTROPICS

LIPASAS COMO BIOMARCADORES EN LA DEGRADACIÓN DE ALCANOS Y AROMÁTICOS

THESIS TO OBTAIN THE DEGREE OF

MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES

DEGREE AWARDED BY

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

AND

MASTER OF SCIENCE

“TECHNOLOGY AND RESOURCES MANAGEMENT IN THE TROPICS AND SUBTROPICS

FOCUS AREA “ENVIRONMENTAL AND RESOURCES MANAGEMENT”

DEGREE AWARDED BY COLOGNE UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

PRESENTS:

BEATRIZ ZAMBRANO MONROY

CO-DIRECTOR OF THESIS PMPCA

DRA. ELSA CERVANTES GONZÁLEZ

CO-DIRECTOR OF THESIS ITT:

PROF. DR. ING. JACKSON ROEHRIG

ASSESSOR:

DR. CÉSAR A. GONZÁLEZ RAMÍREZ

PROYECTO FINANCIADO POR:

El proyecto "CARACTERIZACIÓN DE LAS LIPASAS DE *Pseudomonas* sp. Y SU PAPEL EN LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS DEL PETRÓLERO"

(C10-FAI-05-05.33).

PROYECTO REALIZADO EN:

**PROGRAMA MULTIDISCIPLINARIO DE POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES
(PMPCA)**

COORDINACIÓN ACADÉMICA REGIÓN ALTIPLANO (COARA)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ (UASLP)

CON EL APOYO DE:

DEUTSCHER AKADEMISCHER AUSTAUSCH DIENST (DAAD)

CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT)

**LA MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES RECIBE APOYO A TRAVÉS DEL PROGRAMA
NACIONAL DE POSGRADOS (PNPC - CONACYT)**

Erklärung / Declaración

Name / Nombre: Beatriz Zambrano Monroy

Matri.-Nr. / N° de matricula: 011074565 (CUAS); 0180208 (UASLP)

Ich versichere wahrheitsgemäß, dass ich die vorliegende Masterarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten und nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, sind als solche kenntlich gemacht.

Aseguro que yo redacté la presente tesis de maestría independientemente y no use referencias ni medios auxiliares a parte de los indicados. Todas las partes, que están referidas a escritos o a textos publicados o no publicados son reconocidas como tales.

Die Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form noch nicht als Prüfungsarbeit eingereicht worden.

Hasta la fecha, un trabajo como éste o similar no ha sido entregado como trabajo de tesis.

San Luis Potosí, den /el 5 de agosto de 2011

Unterschrift / Firma:



Ich erkläre mich mit einer späteren Veröffentlichung meiner Masterarbeit sowohl auszugsweise, als auch Gesamtwerk in der Institutsreihe oder zu Darstellungszwecken im Rahmen der Öffentlichkeitsarbeit des Institutes einverstanden.

Estoy de acuerdo con una publicación posterior de mi tesis de maestría en forma completa o parcial por las instituciones con la intención de exponerlos en el contexto del trabajo investigación de las mismas

Unterschrift / Firma:



AGRADECIMIENTOS

Al Programa Multidisciplinario de Posgrado en Ciencias Ambientales, modalidad internacional, por la oportunidad de seguir con mi preparación.

A la Dra. Elsa Cervantes González por su paciencia, apoyo y guía por este “sinuoso” camino.

DEDICATORIAS

A mis padres.

A mi hermano.

A Arturo.

A mis compañeros de maestría.

RESUMEN

En la presente investigación se evaluó el posible uso de la actividad de enzima lipasa de la cepa *Pseudomonas* sp. como biomarcador en el proceso de degradación de compuestos aromáticos y alcanos. Se emplearon los siguientes compuestos: n-Hexano, 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno, indeno, 9,10-dimetilantraceno, (identificados como parte de la fracción del queroseno); siete más seleccionados por su característica de ser monoaromáticos y heteroaromáticos: dioctilftalato, butil benceno, butil benzoato, benceno, ácido benzoico, tolueno y piridina; y la misma fracción de queroseno. En la primera fase se evaluó la inducción del sistema lipolítico mediante los hidrocarburos antes mencionados, registrándose actividad enzimática únicamente en cuatro ellos (butil-benceno, 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno, n-hexano y benceno); lo anterior al utilizar una concentración de 3000 ppm de cada hidrocarburo, no así cuando se utilizó 5000 ppm, por lo que se deduce que la concentración es determinante para la expresión de la enzima, por lo menos en las concentraciones utilizadas. Adicionalmente, se determinó el efecto de una fuente alterna de energía como lo es la sacarosa y el efecto de un tensoactivo como el Triton X-100, mostrando que su presencia puede beneficiar la inducción de la enzima o bien afectar negativamente y por lo tanto no expresarse, esto dependiendo del hidrocarburo del que se trate.

En la segunda fase se evaluó el efecto del pH (7,8,9), concentración de sacarosa (0.8, 0.9, 1.0 %) y concentración de tres hidrocarburos (1,2,3,4-tetrahidronaftaleno [1170, 1950, 2730 ppm], butil-benceno [860, 1550, 2240 ppm] y n-hexano [1300,1570, 1830 ppm]) sobre la actividad enzimática de lipasa de *Pseudomonas* sp. a través del diseño experimental de Box-Behnken. En las superficies de respuesta para la actividad de lipasa empleando 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno se observó que el efecto combinado de la concentración de sacarosa y del hidrocarburo ($p < 0.0172$) y el efecto del pH ($p < 0.0172$) influyeron significativamente sobre la respuesta enzimática. Se observó que al emplear butil-benceno el efecto de pH influyó de forma significativa. Con n-hexano, tanto la concentración de sacarosa y pH influyeron significativamente en lo obtenido en las superficies de

respuestas. La actividad de enzima lipasa parecer tener cierta especificidad para el tipo de hidrocarburo. Así mismo, la concentración de sacarosa y la presencia de surfactante parecen tener un efecto benéfico en la inducción de lipasa en los procesos de degradación por la cepa de *Pseudomonas* sp.

ABSTRACT

In the present study the activity of the enzyme lipase in the strain *Pseudomonas* sp. was assessed as a biomarker in the degradation of aromatic hydrocarbons and alkanes. The following compounds were used as carbon and energy source: n-Hexane, 1,2,3,4-tetrahydronaphthalene, indene, 9,10-dimethylantracene (identified as part of the kerosene fraction). Moreover, seven additional monoaromatic and heteroaromatic hydrocarbons were selected as carbon and energy source: dioctyl phthalate, butyl benzene, butyl benzoate, benzene, benzoic acid, toluene and pyridine, and the same fraction of kerosene. Also, the effect of the concentration of hydrocarbons, the presence and concentration of an alternate source of energy (sucrose), the presence of a nonionic surfactant (Triton X-100) and the effect of pH; were assessed. In the first phase the lipolytic system induction of *Pseudomonas* sp. was assessed, enzymatic activity was observed only in four of the analyzed compounds (butyl-benzene, 1,2,3,4-tetrahydronaphthalene, n-hexane and benzene) . This result suggests that hydrocarbon concentration is critical for the expression of the enzyme. In the second phase, the effect of pH (7,8,9), concentration of sucrose (0.8, 0.9, 1.0%) and concentration of hydrocarbons (1,2,3,4-tetrahydronaphthalene [1170, 1950, 2730 ppm] butyl benzene [860, 1550, 2240 ppm] and n-hexane [1300.1570, 1830 ppm])were assessed through growth kinetics and Box-Behnken designs.

In the response surfaces for lipase activity using 1,2,3,4-tetrahydronaphthalene was found that the combined effect of sucrose concentration and hydrocarbon ($p < 0.0421$) and the effect of pH ($p < 0.0172$) influenced significantly on enzymatic response. It was observed that by using butylbenzene effect of pH influenced significantly. With n-hexane, both sucrose concentration and pH significantly influenced the obtained response surfaces. Lipase enzyme activity seems to have some specificity for the type of hydrocarbon. Also sucrose concentration and the presence of surfactant appear to have a beneficial effect on the induction of lipase in the process of degradation by *Pseudomonas* sp strain.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Aktivität des Enzyms Lipase des Stammes *Pseudomonas* als "Biomarker" beim Abbau von Aromaten und Alkanen bewertet. Es wurden folgende Verbindungen verwendet: n-Hexan, 1,2,3,4-Tetrahydronaphthalin, Inden, 9-10-Dimethylantracen (identifiziert als Baustein der "Kerosin-Fraktion") sowie sieben weitere Verbindungen, die aufgrund ihrer monoaromatischen und heteroaromatischen Eigenschaften ausgewählt wurden: Dioctylphthalat, Butylbenzol, Butylbenzoat, Benzol, Benzoesäure, Toluol und Pyridin und der gleiche Anteil von Kerosin. Es wurde die Aktivität des Enzyms Lipase der Staemme von *Pseudomonas* analysiert, wobei als Kohlenstoff- und Energiequelle die schon genannten Verbindungen verwendet wurden. Es geht prinzipiell um die Wirkung der Konzentration, das Vorhandensein und die Konzentration einer alternativen Energiequelle (Saccharose), die Präsenz eines nicht-ionischen Tensid (Triton X-100) sowie um den bestimmten pH-Wert.

Während der ersten Phase wurde die Induktion des lipolytischen Systems bewertet, wobei nur bei 4 Verbindungen eine Enzymaktivität festgestellt werden konnte (Butylbenzol, 1,2,3,4-Tetrahydronaphthalin, n-Hexan und Benzol), woraus sich schliessen lässt, dass die Konzentration unter der sich der Kohlenwasserstoff befindet, ausschlaggebend für die Expression des Enzyms während des Abbauprozesses ist.

Während der zweiten Phase wurde die Wirkung des pH-Wertes (7,8,9), die Konzentration von Saccharose (0,8,0,9,1,0%), der Kohlenwasserstoffe (1,2,3,4-Tetrahydronaphthalin [1170, 1950, 2730 ppm] , Butyl-benzol [860, 1550, 2240 ppm] und n-Hexan [1300,1570, 1830 ppm]) mit Hilfe der "Kinetik des Wachstums" sowie des "Box-Behnken-Designs" festgestellt.

In der Antwort Oberflächen für Lipase-Aktivität mit 1,2,3,4-Tetrahydronaphthalin wurde festgestellt, dass die kombinierte Wirkung von Saccharose-Konzentration und Kohlenwasserstoff ($p < 0,0421$) und die Wirkung der pH-Wert ($p < 0,0172$) signifikant auf die enzymatische Reaktion beeinflusst. Es war, die mit Butylbenzol

Wirkung von pH-Wert beeinflusst deutlich beobachtet. Mit n-Hexan, sowohl Saccharose-Konzentration und pH-Wert signifikant beeinflusst die erhaltene Antwort Oberflächen. Lipase-Enzym-Aktivität scheint eine gewisse Spezifität für die Art von Kohlenwasserstoff zu haben. Auch Saccharose-Konzentration und der Anwesenheit von Tensid scheinen eine positive Wirkung auf die Induktion der Lipase in den Prozess der Abbau durch *Pseudomonas* sp.-Stamm haben.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Problemática por contaminación por hidrocarburos.....	1
1.2 Biomarcadores.....	2
1.2.1 Enzimas como biomarcadores.....	3
1.3 Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs).....	4
1.3.1 Origen y toxicidad.....	4
1.3.2 Degradación de HAPs.....	6
1.3.3 Participación de enzimas en la degradación de HAPs.....	8
1.4 Alcanos.....	9
1.4.1 Características y toxicidad	9
1.4.2 Participación de enzimas en la degradación de alcanos.....	10
1.5 Lipasas	12
1.5.1 Características	12
1.5.2 Actividad de lipasas y la degradación de hidrocarburos.....	13
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo general.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3. JUSTIFICACION.....	17
4. HIPÓTESIS.....	18
5. MATERIALES Y METODOS.....	19
5.1 FASE I. Evaluación de la inducción del sistema lipolítico de <i>Pseudomonas</i> sp. a través de compuestos aromáticos y alcanos.....	19
5.1.1 Cepa utilizada.....	19
5.1.2 Preparación del inóculo.....	19

5.1.3	Efecto de compuestos aromáticos y alcanos en la inducción del sistema de lipasas de <i>Pseudomonas</i> sp.....	20
5.1.4	Evaluación de la actividad de lipasa.....	22
5.2	FASE II. Cinéticas de producción de las lipasas de <i>Pseudomonas</i> sp y evaluación del efecto del pH, concentración de sacarosa y concentración de hidrocarburos.....	23
5.2.1	Cinéticas de producción de lipasas de <i>Pseudomonas</i> sp.....	23
5.2.2	Efecto del pH, concentración de sacarosa y concentración del hidrocarburo en la producción de lipasas de <i>Pseudomonas</i> sp a través del diseño experimental de Box-Behnken.....	25
5.2.3	Análisis estadístico.....	26
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
6.1	FASE I. Evaluación de la inducción del sistema lipolítico de <i>Pseudomonas</i> sp. mediante compuestos aromáticos y alifáticos.....	27
6.2	FASE II. Cinéticas de producción de las lipasas de <i>Pseudomonas</i> sp. y evaluación del efecto del pH, concentración de sacarosa y concentración de hidrocarburos.....	33
6.2.1	Cinéticas de crecimiento y de producción de lipasa de <i>Pseudomonas</i> sp.....	33
6.2.1	Efecto del pH, concentración de sacarosa y concentración del hidrocarburo sobre la producción de lipasas de <i>Pseudomonas</i> sp.....	41
6.2.1.1	Efecto del pH, concentración de sacarosa y concentración de 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno en la producción de lipasas de <i>Pseudomonas</i> sp.....	41
6.2.2.1	Efecto del pH, concentración de sacarosa y concentración de butilbenceno en la producción de lipasas de <i>Pseudomonas</i> sp.....	44
6.2.2.3	Efecto del pH, concentración de sacarosa y concentración de n-hexano en la producción de lipasas de <i>Pseudomonas</i> sp.....	46
7.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	50

7.1 Conclusiones.....	50
7.2 Recomendaciones.....	50
8. BIBLIOGRAFÍA.....	52
ANEXO 1. HIDROCARBUROS UTILIZADOS.....	67
ANEXO 2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de series experimentales para la evaluación de la inducción de lipasas de <i>Pseudomonas</i> sp.....	21
Tabla 2. Concentraciones de indeno y n-hexano utilizadas para evaluar la inducción de las lipasas de <i>Pseudomonas</i> sp.....	22
Tabla 3. Fuentes de carbono utilizadas en las cinéticas de producción de enzima lipasa.....	24
Tabla 4. Diseño experimental de Box-Behnken.....	25
Tabla 5. Valores de cada variable independiente y los valores máximo y mínimo de actividad de enzima lipasa observados para los tres hidrocarburos analizados.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Actividad de lipasa de <i>Pseudomonas</i> sp. en presencia de A) butilbenceno, B) 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno, C) 9,10-dimetilantraceno, D) n-hexano y E) benceno.....	29
Figura 2. Actividad de enzima lipasa de <i>Pseudomonas</i> sp. en presencia de A) n-Hexano y n-Hexano y sacarosa, B) indeno e indeno y sacarosa.....	32
Figura 3. Curvas de crecimiento y actividad de lipasa de <i>Pseudomonas</i> sp. durante 15 días de incubación a 30° C y 180 rpm, cultivada en 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno de acuerdo a la Tabla 3, cinéticas 1, 2, 3 y 4.....	35
Figura 4. Curvas de crecimiento y actividad de lipasa de <i>Pseudomonas</i> sp. durante 15 días de incubación a 30° C y 180 rpm cultivada en Triton X-100 y sacarosa de acuerdo a la Tabla 3, cinéticas 11 y 12.....	36
Figura 5. Curvas de crecimiento y actividad de lipasa de <i>Pseudomonas</i> sp. durante 15 días de incubación a 30° C y 180 rpm cultivada en butilbenceno de acuerdo a la Tabla 3, cinéticas 5, 6, 7 y 8.....	38
Figura 6. Curvas de crecimiento y actividad de lipasa de <i>Pseudomonas</i> sp. durante 15 días de incubación a 30° C y 180 rpm de cultivada en n-hexano acuerdo a la Tabla 3, cinéticas 9 y 10.....	40
Figura 7. Superficie de respuesta para actividad de lipasa de <i>Pseudomonas</i> sp. en presencia de 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno con relación a la concentración de sacarosa (%) y pH después de cinco días de incubación en obscuridad a 180 rpm y 28° C.....	42
Figura 8. Superficie de respuesta para actividad de lipasa de <i>Pseudomonas</i> sp. en presencia de 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno con relación a la concentración del hidrocarburo (ppm) y pH, después de cinco días de incubación en obscuridad a 180 rpm y 28° C.....	43
Figura 9. Superficie de respuesta para actividad de lipasa de <i>Pseudomonas</i> sp. en presencia de 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno con relación a la concentración del hidrocarburo (ppm) y de sacarosa (%), después de cinco días de incubación en obscuridad a 180 rpm y 28° C.....	43

Figura 10. Superficie de respuesta para actividad de lipasa de <i>Pseudomonas</i> sp. en presencia de butil-benceno con relación a la concentración de sacarosa (%) y pH, después de cinco días de incubación en obscuridad a 180 rmp y 28° C.....	44
Figura 11. Superficie de respuesta para actividad de lipasa de <i>Pseudomonas</i> sp. en presencia de butil-benceno con relación a la concentración del hidrocarburo (ppm) y pH, después de cinco días de incubación en obscuridad a 180 rmp y 28° C.....	45
Figura 12. Superficie de respuesta para actividad de lipasa de <i>Pseudomonas</i> sp. en presencia de butil-benceno con relación a la concentración de sacarosa (%) y del hidrocarburo (ppm), después de cinco días de incubación en obscuridad a 180 rmp y 28°C.....	45
Figura 13. Superficie de respuesta para actividad de lipasa de <i>Pseudomonas</i> sp. en presencia de n-hexano con relación a la concentración de sacarosa (%) y pH, después de cinco días de incubación en obscuridad a 180 rmp y 28° C.....	46
Figura 14. Superficie de respuesta para actividad de lipasa de <i>Pseudomonas</i> sp. en presencia de n-hexano con relación a la concentración del hidrocarburo (ppm) y pH, después de cinco días de incubación en obscuridad a 180 rmp y 28° C.....	47
Figura 15. Superficie de respuesta para actividad de lipasa de <i>Pseudomonas</i> sp. en presencia de n-hexano con relación a la concentración del hidrocarburo (ppm) y concentración de sacarosa (%), después de cinco días de incubación en obscuridad a 180 rmp y 28° C.....	48

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Problemática por contaminación por hidrocarburos

La presencia de sustancias con características nocivas o perjudiciales en el ambiente, producto de actividades humanas o por procesos naturales, afectan el desarrollo y bienestar de los organismos (Fraume, 2007). Como consecuencia de procedimientos y manejos deficientes dentro de la industria del petróleo en todas sus etapas: explotación, refinación, distribución y almacenaje, diversos procesos fisicoquímicos se desencadenan afectando a los diversos componentes del ambiente (suelo, agua, aire, biota), por ende, también repercute en los aspectos económicos, sociales y de salud (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2006; Benavides, 2006; Pardo, 2004). Sin embargo, esta situación no es exclusiva de países productores de petróleo, ya que este recurso y sus derivados son precursores de diversos procesos industriales alrededor del planeta. Como ejemplo de esto es el caso de México, que es uno de los mayores productores de petróleo a nivel mundial y para 2004 el volumen calculado de derrames accidentales de petróleo y sus derivados fue de 1.5 millones de T /año, afectando suelo, agua y atmósfera (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2006).

Como respuesta a la creciente necesidad de atender la contaminación ambiental, se han desarrollado diversas tecnologías para tratar suelos, sedimentos, aguas residuales y aguas subterráneas de varios contaminantes, incluyendo métodos *in situ* y *ex situ* (Khan *et al.*, 2004). Entre más preciso sea el conocimiento de la problemática ambiental, más eficaces serán las soluciones que se propongan además de que sean económicamente viables y que gocen de aceptación social (Cabrera-Cruz *et al.*, 2003).

Los problemas asociados con la limpieza de sitios contaminados por petróleo y sus productos han demostrado que es necesario desarrollar tecnologías de remediación que sean eficientes, rápidas y viables, tanto de forma económica como técnica.

Por otro lado, es importante apoyar las tecnologías de remediación en herramientas de monitoreo alternativas; así lo expresan Maila & Cloete (2005) basándose en el hecho de que el análisis y monitoreo de suelos contaminados por hidrocarburos regularmente se realiza con instrumentos analíticos, cuya utilización suele generar altos costos. Es por eso que se ha impulsado el uso de las actividades biológicas, como bioindicadores, para hacerse de información relevante que permita evaluar sitios contaminados con desechos químicos dañinos.

1.2 Biomarcadores

Los biomarcadores se definen como las respuestas o alteraciones bioquímicas, fisiológicas, morfológicas e histopatológicas de los organismos ocasionadas por la exposición a contaminantes (US NCR, 1989. En Vázquez, 2005). Suelen ser respuestas rápidas, sensibles y hasta específicas de los organismos a los contaminantes. Los biomarcadores potenciales en monitoreos ambientales son: alteraciones en el ADN o ARN, respuestas proteicas, productos del metabolismo, biomarcadores histo-patológicos, inmunológicos, fisiológicos y de comportamiento. Conti (2008) afirma que toda respuesta, a cualquier nivel de complejidad (bioquímica, fisiológica, etc.) puede considerarse un biomarcador.

Entre algunas de las ventajas del uso de los bioindicadores, se enlistan las siguientes (Maila & Cloete, 2005):

- Pueden detectar tanto la toxicidad de los compuestos parentales, como de los metabolitos.
- Requieren de materiales fácilmente disponibles para su evaluación.
- Su evaluación puede hacerse *in situ* o *ex situ*.
- En la mayoría de casos, el tiempo de evaluación es corto.
- Se sigue una metodología sencilla.

También habrá que señalar algunas de sus desventajas:

- No se puede detectar toxicidad resultado de compuestos parentales y metabolitos.
- La respuesta del bioindicador no siempre corresponde con la concentración del contaminante.
- Diferentes pruebas responde de forma diferente a tóxicos individuales.
- La sensibilidad depende del contaminante y del suelo.

1.2.1 Enzimas como biomarcadores

Las enzimas, y en específico su actividad en suelos, tienen gran relevancia por ser catalizadoras de procesos metabólicos, incluyendo la descomposición de flujos orgánicos y la detoxificación de xenobióticos. La degradación de hidrocarburos a moléculas más simples, como agua y dióxido de carbono, involucra varias reacciones químicas en las cuales proteínas catalíticas se ven involucradas. Debido al rol que desempeñan en la degradación de hidrocarburos, es por lo que se han convertido en importantes herramientas de monitoreo durante el proceso de biorremediación. Las respuestas o reacciones de proteínas que se registran en un organismo después de una exposición a diversas clases de contaminantes, son caracterizadas para determinar si la actividad de las proteínas funcionales se induce o inhibe. Este tipo de reacciones comprende los mecanismos de adaptación o protección relacionados con la detoxificación de compuestos xenobióticos (sistema mixto de función oxigenasa [MFO, por sus siglas en inglés], enzimas conjugadas) y mecanismos de detoxificación de metales pesados.

La actividad de las proteínas funcionales se utilizan como biomarcadores muy específicos desde un punto de vista cualitativo y pueden ser útiles también como una señal semi-cuantitativa de la presencia de un tipo particular de contaminantes (Conti, 2008). Entre las enzimas que han sido probadas se incluyen las lipasas,

deshidrogenasas, catalasas y ureasas (Malia & Cloete, 2005). Para el caso específico de lipasas, su actividad en suelos se considera un indicador valioso en los procesos de degradación biológica de petróleo, tanto en suelos atenuados naturalmente y en aquellos que con algún proceso de remediación biológica (fertilizados). Se describe una correlación negativa de la concentración residual de hidrocarburos en suelo con la actividad de lipasa en suelo y el número de microorganismos degradadores de hidrocarburos, independientemente del hecho de haber sido tratados (fertilizados) o no (Chauhan & Varma, 2009).

1.3 Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)

1.3.1 Origen y toxicidad

Estos compuestos se caracterizan por contener dos o más anillos de benceno unidos entre sí. La mayoría solo contiene carbono e hidrógeno y son siempre estructuras polinucleares de tipo aromático. También se les conoce como hidrocarburos polinucleares. Son sustancias inestables fotoquímicamente (fotooxidación). Generalmente son incoloros o blanquecinos (Albers, 1995).

Los HAPs se encuentran de forma natural en el petróleo a concentraciones muy bajas (alrededor del 1%); sin embargo, la principal fuente de generación es la combustión incompleta a altas temperaturas del petróleo, de sus derivados (500-800 °C) o de materia orgánica (100-300 °C) en periodos prolongados (Albers, 1995; Haritash & Kaushik, 2009). Esto es, por un proceso de pirolisis de compuestos orgánicos, en el que se descomponen por la acción del calor, y esto se puede observar en diferentes actividades cotidiana, como las que describen Wilson & Jones (1993):

- Gasificación/licuefacción de combustibles fósiles
- Generación de energía en base al uso de combustibles fósiles
- Producción de coque
- Producción y uso de carbón

- Producción y uso de asfalto
- Refinación y destilación de crudo y sus derivados
- Producción y uso de alquitrán
- Procesos de tratamiento para madera
- Producción de preservativos para madera (creosote/antraceno en aceite)
- Almacenaje, transportación, procesamiento, uso y eliminación de combustibles y aceite
- Vertederos, tiraderos
- Quema a cielo abierto (llantas, carbón, desperdicios)
- Incineración

Esto explica el por qué los HAP se pueden localizar en diversos componentes del ecosistema (aire, suelo, agua, sedimentos, tejidos biológicos), así como en alimentos. (Vives *et al.*, 2001). Las fuentes naturales de estos compuestos son los incendios de bosques y pastizales.

Aunque se han llegado a identificar más de 100 de estos compuestos, los que destacan por sus características físico-químicas y toxicológicas, son los siguientes:

- Acenafteno (Ace)
- Acenaftileno (Acy)
- Antraceno (Ant)
- Benzo[*a*]antraceno (BaA)
- Benzo[*a*]pireno (BaP)
- Benzo[*e*]pireno
- Benzo[*b*]fluoranteno (BbF)
- Benzo[*g,h,i*]perileno (Bghi)
- Benzo[*j*]fluoranteno
- Benzo[*k*]fluoranteno (BkF)
- Criseno (Cry)
- Dibenzo[*a,h*]antraceno (DaA)

- Fluoranteno (Fla)
- Fluoreno (Flu)
- Indeno[1,2,3-*c,d*]pireno (Ind)
- Fenantreno (Fen)
- Naftaleno (Nap)
- Pireno (Pyr)

Cabe destacar que los compuestos aromáticos fueron, tal vez, los primeros en ser considerados como carcinógenos ambientales.

Se distinguen 2 clases de HAP: los de bajo peso molecular que son aquellos que tienen de 2 a 3 anillos aromáticos (naftaleno, fluoreno, antraceno), y los de alto peso molecular, que tienen de 4 a 7 anillos aromáticos, como el criseno. Sus características físicas y químicas varían de acuerdo a su peso molecular, influyendo en su persistencia en el ambiente y sus efectos en los sistemas biológicos, ya que se distinguen por tener una baja volatilidad y solubilidad.

Las condicionantes de transporte, distribución y biodisponibilidad de estas compuestas están dadas por su partición entre el agua, la materia orgánica disuelta y el suelo o la materia orgánica en el sedimento (Mastrangelo *et al.*, 2005).

Estos compuestos tienen estructuras moleculares complejas y una baja solubilidad en agua y tienden a sorberse fuertemente a sólidos bajo la superficie (NRC, 2002).

1.3.2 Degradación de HAPs

Algunos estudios han demostrado que algunos organismos (bacterias, algas, hongos y cianobacterias) pueden metabolizar HAP de cinco anillos de benceno (NRC, 2002). Los microorganismos generalmente usan enzimas del tipo oxigenasas para iniciar la biodegradación. Sin embargo, la degradación

microbiana de HAP de bajo peso molecular puede llevarse a cabo en condiciones nitrato y sulfato reductoras (NRC, 2002). Debido a esta característica, la biorremediación es una opción de tratamiento atractiva para sitios contaminados. Sin embargo, existe un gran número de trabajos de investigación enfocados en la degradación de HAP de cuatro, cinco y seis anillos de benceno; no siendo así para los compuestos de mayor peso molecular (Powell, 2008).

El número de cepas descritas en los últimos años que utilizan HAPs de cuatro anillos como única fuente de carbono y energía, aún en ausencia de co-factores o surfactantes, y de aquellas identificadas por cometabolizar HAPs con más de cuatro anillos ha aumentado significativamente. Aunado a esto, numerosas rutas metabólicas han sido propuestas, para una vasta variedad de HAPs de alto peso molecular en bacterias (Kämpfer *et al.*, 1993). Además, se han descrito diversas capacidades de diferentes cepas para degradar HAPs (de bajo y alto peso molecular y metilados) que pueden ser atribuidas a la laxa especificidad enzimática inicial para estos compuestos, a la presencia de múltiples oxigenasas y de rutas metabólicas y genes que comparten capacidades degradadoras tanto para alcanos y aromáticos. (Budzinski *et al.*, 2000; Chen & Aitken, 1999; Dutta & Haramaya, 2001; Goyal & Zylstra, 1996; Kim & Zylstra, 1999; Maeda *et al.*, 2001; Mahajan *et al.*, 1994; McLellan, 2002; Moody *et al.*, 2001; Romine *et al.*, 1999; Romine *et al.*, 1999b; Sabaté *et al.*, 1999; Vila *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 1994.).

La degradación biológica de HAPs puede servir para tres funciones diferentes: i) degradación asimilativa que produce energía para los organismos degradadores y que va aunado con la mineralización de los compuestos o parte de estos; ii) los procesos intracelulares de detoxificación, cuyo propósito es hacer a los HAPs solubles en agua como prerrequisito para excreción de los compuestos. Generalmente, se percibe que la oxidación intracelular y la hidroxilación de HAPs en bacterias es un paso inicial para preparar la fisión de anillos y la asimilación de carbono. Este es un paso inicial en la detoxificación para el caso de hongos (Cerniglia, 1984). iii) promueve el co-metabolismo, que se define como una

reacción enzimática no-específica, donde un sustrato compite con otro de estructura primaria similar por el sitio activo de las enzimas. (Johnsen *et al.*, 2005).

Se han descrito que tanto la baja solubilidad en agua y la alta capacidad de sorción de los HAPs son las características que entorpecen en gran medida al proceso de biodegradación. Igualmente intervienen la producción de metabolitos tóxicos, represión de metabolitos, la presencia de otros sustratos, ausencia de sustratos inductores y falta de cometabolismo (Molina *et al.*, 1999; Juhasz *et al.*, 2002). En suelos, las bacterias suelen no utilizar una fuente de carbono en particular, sino que utilizan un número de los compuestos de carbono disponibles. Por lo que la expresión de enzimas que catalizan la degradación de contaminantes orgánicos (HAPs) puede verse restringida, aunque el nivel de expresión mínimo es comúnmente suficiente para el consumo inmediato del xenobiótico, cuando éste se vuelve disponible en pequeñas cantidades (Egli, 1995, 2002). Como consecuencia, cuando las células cuentan con diversas fuentes de carbono que les permite mantener su biomasa, el proceso de biodegradación se verá interrumpido. Hay que recalcar que el beneficio a largo plazo para la célula de mantener un nivel base de enzimas degradadoras de HAPs debe ser más alto que el costo de producir a dichas enzimas, por la característica para ser evolutivamente estable (Johnsen *et al.*, 2005).

1.3.3 Participación de enzimas en la degradación de HAPs

En años recientes se han descrito cuáles son las enzimas que participan en el proceso de biodegradación de compuestos aromáticos y son oxigenasas (di y monooxigenasas), deshidrogenasas y enzimas lignolíticas. Este último grupo lo componen las lignina-peroxidasas, lacasas y manganeso-peroxidasa (Haritash & Kaushik, 2009; Kanaly & Harayami, 2000).

El desarrollo en tecnología de proteínas en últimas fechas indica que las reacciones estereo- selectivas de los procesos biocatalíticos de hidroxilación, de enzimas monooxigenasas citocromo p450 dependientes, dioxigenasas,

lipooxigenasas, y peroxidasas tienen un gran potencial para las conversiones enantio-específicas donde están involucrados sustratos petroquímicos y sus derivados (Cheng *et al.*, 2002; Holland, 2000).

Un escenario de inhibición en la producción de enzimas en el proceso de biodegradación es cuando hay competencia entre las aquellas enzimas involucradas en la oxidación o transporte, acumulación de subproductos derivando en cototoxicidad, y el bloqueo de inducción de enzimas (Bouchez *et al.*, 1995; Juhasz *et al.*, 2002, Stingfellow & Aitken, 1995; Shuttleworth & Cerniglia, 1996). Determinar cuál mecanismo es el que interviene en cada situación puede resultar complicado por la presencia de metabolitos de diferentes HAPs (Van Hamme *et al.*, 2003).

1.4 Alcanos

1.4.1 Características y toxicidad

Se les conoce también como hidrocarburos saturados alifáticos, y como parafinas, por su poca afinidad química hacia otras sustancias; su fórmula general es C_nH_{2n+2} . Están constituidos por enlaces simples - C - C, y C - H. Estos compuestos se distinguen por ser los menos reactivos de los compuestos orgánicos, ya que para producir un cambio en su estructura se requieren temperaturas elevadas, que aumentan de acuerdo al incremento de sus pesos moleculares (McMurry, 2008). Los más ligeros (metano, etano, propano y butano) se encuentran en los gases naturales, los medios (del pentano hasta el hexano) en el petróleo y los más pesados en las ceras minerales (Fraume, 2007). Su densidad es menor que la del agua. Son insolubles en agua, pero son solubles en éter, alcohol y derivados halogenados e hidrocarburos. Estos son relativamente inertes biológicamente y no están comúnmente involucrados en la química de los organismos vivos; sin embargo reaccionan con oxígeno, halógenos y otras sustancias bajo condiciones apropiadas experimentando comúnmente reacciones de sustitución (McMurry, 2008).

Los alcanos lineales tienden a ser biodegradables debido a la simplicidad de su estructura molecular. Sin embargo, altas concentraciones de alcanos, de 5 a 10 carbonos, inhiben la biodegradación, ya que actúan como solventes de la capa lipídica de los microorganismos. Aquellos alcanos de C₂₀ a C₄₀ generalmente tienen muy baja solubilidad en agua, lo que interfiere con la degradación biológica. En general, la degradación de alcanos origina productos muy oxidados, los cuales son menos volátiles que sus compuestos parentales (Pellini, 2006).

Los hidrocarburos alifáticos son introducidos en el ambiente tanto por actividades humanas como por procesos naturales, por lo que no son calificados, en sí, como compuestos xenobióticos, aunque muchos casos de contaminación con altos niveles de alcanos en suelos son causados por procesos industriales relacionados con petróleo (Janssen *et al.*, 2005).

1.4.2 Participación de enzimas en la degradación de alcanos

Los microorganismos cuentan con una compleja maquinaria metabólica que les permite utilizar petróleo como fuente de carbono y energía. Los alcanos son una excelente fuente de carbono y energía, por lo que muchos organismos han desarrollado mecanismos que les permiten explotar este recurso. Estos compuestos requieren de ciertos procesos previos antes de que sean degradados y usados como fuente de carbono.

Desde un punto de vista genético, la ruta de degradación de alcanos mejor descrita es la del plásmido OCT de *Pseudomonas putida* Gpo1 (conocida anteriormente como *Pseudomonas oleovorans*), que degrada alcanos con 5 y hasta 12 carbonos (Janssen *et al.*, 2005). Dicha ruta se basa en una monooxigenasa ligada a membrana, una rubredoxina soluble y una enzima rubredoxina-reductasa que permiten el traslado de electrones por la vía NADH hacia las hidrolasas, que convierten los alcanos en alcohol. Estos pueden ser oxidados más adelante a aldehídos y en ácidos antes de proceder con los ciclos de β -oxidación y ácido tricarboxílico (van Beilen *et al.*, 1994; van Beilen *et al.*,

2001). Se especula que un factor primordial para que se pueda manifestar la enzima lipasa en los procesos de biodegradación, es el tipo de hidrocarburo, ya que la degradación microbiológica de hidrocarburos alifáticos generalmente desencadena la formación de acil-CoA, producto de la degradación de grasas, el cual es finalmente metabolizado en la célula para la formación de energía y crecimiento celular (Singer M.E. & Finnerty W.R., 1984).

El primer paso en la degradación aerobia de los alcanos es la introducción de átomos de oxígeno derivados del oxígeno molecular del sustrato, el cual es llevado a cabo por oxigenasas, enzimas de alto interés en biorremediación y en procesos biocatalíticos. Típicamente, los alcanos son hidrolizados al correspondiente alcohol primario y posteriormente oxidados por alcohol y aldehído- deshidrogenasas. Los alcanos de cadena corta son metabolizados vía oxidación terminal y subterminal. Los ácidos grasos resultantes se integran al ciclo β -oxidación o son incorporados como lípidos celulares. En algunos casos, ambos extremos de los sustratos de alcanos son oxidados, lo que ha sido explotado para la producción de ácidos dicarboxílicos (Van Beilen & Witholt, 2005; Fujita *et al.*, 2007).

Otras de las enzimas involucradas en la degradación de alcanos son: las alcano-hidroxilasas, las desahlogeninas (haloalcano deshalogeninas), las cuales poseen una α/β -hidrolasa principal como uno de sus dominios plegados y en ocasiones se ha encontrado en lipasas, acetilcolinesterasas, esterasas, lactonasas, epóxido hidrolasas y otras más, por lo que se considera que las haloalcano deshalogeninas pertenecen a una super familia de proteínas, cuyos miembros pueden llevar a cabo varias reacciones, la mayoría con compuestos no halogenados (Janssen *et al.*, 2005).

1.5 Lipasas

1.5.1 Características

Las lipasas (acilglicerolhidrolasas E.C.3.1.13) se desempeñan como catalizadoras en reacciones lipolíticas, a través de la hidrólisis de los enlaces éster en la interfase entre el sustrato de fase insoluble y la fase acuosa. Los sustratos naturales de las lipasas son triacilgliceroles de cadena larga, los cuales tienen muy poca solubilidad en agua. Sin embargo, existen un sin fin de lípidos simples y compuestos que son degradados por la acción de las lipasas, tales como ceras, terpenos, lipopolisacáridos, etc. Las lipasas se emplean para aplicaciones industriales diversas, tales como la producción de farmacéuticos, cosméticos, pieles, detergentes, alimentos, perfumes, diagnósticos médicos, etc. Son producidas por varias plantas, animales, de las grasas mismas, de forma sintética o generadas por diversos microorganismos: bacterias (*Pseudomonas* sp., *Burkholderia* sp., *Enterobacter* sp., *Staphylococcus*, *Streptococcus*, entre otras) y algunas levaduras. La temperatura óptima de producción de lipasas depende de la temperatura de crecimiento del respectivo microorganismo, sin embargo, se ha observado que en general, las lipasas son producidas entre 20 y 45 °C. Su periodo de producción llega a variar de pocas horas hasta algunos días (Des Abbayes *et al.*, 1989; Gupta *et al.*, 2004; Sinhg *et al.*, 2006).

Otra característica que hacen de las lipasas una enzima muy atractiva para la industria es que en el caso de aquellas producidas por *Pseudomonas pseudomallei*, se ha mostrado que llegan a tener una actividad máxima en pH 10, y en otros casos se ha detectado que llegan a mantener casi el 80 % de su actividad en pH 11 y mantenerse altamente estables en un intervalo de pH 7 a 10.5. (Watanabe *et al.*, 1977). Este género tiene una amplia capacidad enzimática para utilizar compuestos de diferente naturaleza química, incluyendo hidrocarburos alifáticos, como lo reportan Kanwar & Goswami, (2002), en donde describen la producción de enzima lipasa de *P. pseudomallei* 12Sm en un medio que contenía n-hexadecano como única fuente de carbono y energía.

1.5.2 Actividad de lipasas y la degradación de hidrocarburos

Los trabajos precursores en el uso de compuestos derivados del petróleo y producción de lipasas lo son Breuil *et al.* (1977) quienes describen los altos niveles de producción de lipasa en *Acinetobacter lwoffii* O16 en presencia de petróleo crudo, hexadecano, octadecano y otros alcanos como única fuente de carbono a 20°C, e igualmente mencionan que hay una relación positiva entre la producción de lipasas y la utilización de hexadecano en *Pseudomonas aeruginosa*.

Según Margesin *et al.* (2007) la actividad de las lipasas en suelos se ve favorecida en altas concentraciones de diesel, lo que indica una inducción en la actividad de estas con la contaminación en suelos. Esta inducción es atribuida a la aparición de productos derivados de la biodegradación de hidrocarburos, el cual es el sustrato para las hidrolasas, incluyendo esterases-lipasas. Se reporta que algunos factores de interferencia, como la composición del contaminante y el nivel de compuestos recalcitrantes, puede influenciar la actividad de las lipasas en suelos cuando la contaminación lleva algunos años, ya que dicha actividad es más fácilmente detectable en suelos recién contaminados por derivados del petróleo, debido al alto contenido de compuestos alifáticos (Margesin & Schinner, 2001; Margesin *et al.*, 2003). Además el tipo de suelo y la composición cualitativa y cuantitativa de los hidrocarburos puede ser una limitante para la actividad enzimática de las lipasas, llegando a inhibir su actividad (Margesin & Schinner, 2001).

Así también se ha detectado que los suelos contaminados con petróleo contienen cantidades importantes de sustancias solubles en mezclas alcohol-benceno (bitumen), las cuales son retenidas en las porciones poco profundas de los suelos, y dichas sustancias son probables estimuladores de la actividad de lipasas en el suelo (Kireeva *et al.*, 2006).

Las lipasas producidas por microorganismos adaptados a bajas temperaturas, han mostrado altas tasas de catálisis en comparación con aquellas producidas por

microorganismos mesófilos o termófilos, los cuales muestran poca o nula actividad en bajas temperaturas. Esas lipasas han desarrollado una amplia gama de características estructurales que les confieren un alto nivel de flexibilidad, particularmente se convierten en activación de baja entalpía sobre el sitio activo, tienen una baja afinidad por sustratos y cuentan con una alta actividad específica a bajas temperaturas. Por otra parte, el máximo nivel de actividad de estas enzimas es desplazado hacia bajas temperaturas con un concomitante decremento en la estabilidad térmica (Joseph *et al.*, 2008).

El potencial de las lipasas adaptadas a bajas temperaturas es de gran importancia en el rubro ambiental, particularmente en el campo de tratamiento de aguas residuales, biorremediación en ambientes de bajas temperaturas contaminados con grasas y en la síntesis de compuestos en condiciones frías (Buchon *et al.*, 2000). Se ha observado degradación máxima de resina de etanol por *Pseudomonas* sp., al igual que de *Rhodococcus* sp. en aceites de petróleo y resinas de benceno por parte de lipasas producidas por microorganismos psicrófilos. Además, estas enzimas han establecido un punto de partida para el uso de dichos microorganismos degradadores de aceites y sus derivados en ambientes templados.

De acuerdo con Margesin *et al.* (1999), la actividad de las lipasas en suelo se incrementa con el tiempo y permanece inalterable con la acumulación de compuestos recalcitrantes y menos biodisponibles. Se menciona además, la escasa literatura con información sobre la actividad de lipasas en suelos contaminados con petróleo, y se asume que los sistemas enzimáticos para la degradación de lípidos son similares a aquellos relacionados con la biodegradación del petróleo, y que la adición de nutrientes en suelo, como los fertilizantes, puede incrementar considerablemente tanto a la actividad metabólica, como la biomasa de los microorganismos capaces de degradar de igual manera tanto a hidrocarburos como a lípidos. También hace referencia al supuesto de la inducción de lipasas que fue confirmado por el hecho de que la actividad de

lipasas en suelo se incrementó con un aumento inicial de las concentraciones de petróleo (Margesin *et al.*, 1999).

En otros estudios, como en el de Del rio *et al.* (1990) se hizo una caracterización más detallada de la inhibición en la producción de lipasas en *Pseudomonas* sp. utilizando como única fuente de carbono n-hexadecano y se reportó que subproductos, como gliceroles y ácidos grasos son capaces de inhibir la actividad enzimática. Así también, se conoce según Makhzoum *et al.* (1995) que varios azúcares y sustratos más complejos, igualmente inhiben la actividad enzimática de *P. fluorescens*. Otro estudio más reciente describe la capacidad de la cepa de *P. aureginosa*, la PTz-5, capaz de utilizar benceno, tolueno e igualmente hexadecano como única fuente de carbono y capaz de producir lipasa extracelular que cataliza triglicéridos a ácidos grasos libre y glicerol (Mukherlee *et al.*, 2010)

Se ha señalado que el método más efectivo para evaluar la eficiencia de biorremediación de hidrocarburos es el monitoreo de las tasas de degradación. Margesin (*et al.*, 1999) propone evaluar la actividad de enzima lipasa para medir la degradación de derivados de petróleo en suelos. En este trabajo se recurre a dicha propuesta para evaluar la respuesta enzimática de lipasa en una cepa *Pseudomonas* sp. en la degradación de compuestos aromáticos y alifáticos contenidos en la fracción de queroseno.

2. OBJETIVOS

2.1 *Objetivo general*

Investigar la factibilidad de utilizar la actividad lipolítica como biomarcador en la biodegradación de compuestos aromáticos y alcanos del petróleo en sistemas en medio líquido mediante *Pseudomonas* sp.

2.2 *Objetivos específicos*

- Determinar el efecto de diversos compuestos aromáticos y alcanos sobre la expresión del sistema lipolítico de *Pseudomonas* sp.
- Determinar el efecto de la concentración de hidrocarburos aromáticos y alcanos, pH y fuentes de carbono adicionales sobre la expresión del sistema lipolítico de *Pseudomonas* sp.

3. JUSTIFICACION

Las lipasas son reconocidas como enzimas de interés biotecnológico en varias áreas. Sin embargo, no se ha llegado a estudiar con profundidad el papel que desempeñan en los sistemas de biorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos. Por lo que el estudio básico de estas enzimas en los sistemas se hace necesario, pues permitirá conocer su comportamiento en diferentes condiciones para poder ser asociadas a un determinado efecto. Aunado a ello, tampoco ha sido estudiada la participación de estas enzimas en la biodegradación de algún tipo de hidrocarburo.

4. HIPÓTESIS

Los hidrocarburos están clasificados como lípidos simples, pudiendo ser siendo entonces, degradados por enzimas lipolíticas (lipasas). La actividad de enzima lipasa puede ser utilizada como marcador biológico para establecer la reducción en la concentración de compuestos derivados del petróleo (aromáticos y alcanos) en los sistemas de biorremediación.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 FASE I. Evaluación de la inducción del sistema lipolítico de *Pseudomonas sp.* a través de compuestos aromáticos y alcanos.

Para el desarrollo de esta fase experimental se utilizaron como fuente de carbono 12 compuestos derivados del petróleo entre aromáticos y alifáticos; cuatro de ellos identificados como parte de la fracción del queroseno: n-Hexano, 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno, indeno, 9,10-dimetilantraceno, (Chilcott, 2006); siete más seleccionados por ser monoaromáticos y heteroaromáticos: dioctilftalato, butil benceno, butil benzoato, benceno, ácido benzoico, tolueno y piridina; y un último compuesto(s) más que fue la misma fracción de queroseno, (Todos los compuestos fueron de la marca Sigma-Aldrich, Co. con excepción del queroseno). Las características físico-químicas y toxicológicas de cada uno se describen en el Anexo 1.

5.1.1 Cepa utilizada

La bacteria utilizada fue *Pseudomonas sp.* previamente aislada del campo petrolero "Paredón 31", del estado de Tabasco, México (Cervantes- González *et al.*, 2008).

5.1.2 Preparación del inoculo

El inoculo se preparó en matraces Erlenmeyer de 125 ml, utilizando 25 ml de medio mineral (MM): 0.30 KNO₃, 0.0332 FeCl₃ 6H₂O, 0.2 MgSO₄ 7H₂O, 0.1 CaCl₂ y 1 K₂HPO₄ (g/l), pH 6.8. Se adicionó queroseno a una concentración de 20,000 mg/l. Finalmente el medio de cultivo se inoculó con una asada de la cepa *Pseudomonas sp.* y se incubó a 28 °C y 180 rpm durante tres días. En caso necesario se realizaron resiembras para contar con el inoculo fresco.

5.1.3 Efecto de compuestos aromáticos y alcanos en la inducción del sistema de lipasas de *Pseudomonas sp.*

Se prepararon seis series experimentales para evaluar el efecto de cada hidrocarburo sobre la expresión de las lipasas de *Pseudomonas sp.* Para esto se prepararon matraces Erlenmeyer de 125 ml conteniendo 25 ml de MM adicionados de cada hidrocarburo como se indica en la Tabla 1. Cabe destacar que de acuerdo a los resultados se evaluaron dos concentraciones de algunos de los hidrocarburos probados (5000 y 3000 ppm, serie experimental No. 1 y 3, respectivamente), así como la presencia de una fuente adicional de carbono (sacarosa 0.5 %) y/o la adición de un surfactante no-iónico (Triton X-100) (Series experimentales No. 2, 4, 5 y 6). Cada matraz fue inoculado con 0.1 ml de inóculo y posteriormente incubado durante cinco días a 28 °C y 180 rpm. Al término de este periodo se evaluó la actividad de enzima lipasa.

Tabla 1. Descripción de series experimentales para la evaluación de la inducción de lipasas de *Pseudomonas* sp.

Compuesto	Serie experimental No. 1	Serie experimental No. 2	Serie experimental No. 3	Serie experimental No. 4	Serie experimental No. 5	Serie experimental No. 6
n-Hexano	[5000 ppm]	[5000 ppm] + 500 ppm Triton X-100	[3000 ppm]	[3000 ppm] + 1000 ppm Triton X-100	[3000 ppm] + sacarosa 0.5 %	[3000 ppm] + sacarosa 0.5 % + 1000 ppm Triton X-100
1,2,3,4-tetrahidro-naftaleno	[5000 ppm]	[5000 ppm] + 500 ppm Triton X-100	[3000 ppm]	[3000 ppm] + 1000 ppm Triton X-100	[3000 ppm] + sacarosa 0.5%	[3000 ppm] + sacarosa 0.5 % + 1000 ppm Triton X-100
Butil-benceno	[5000 ppm]	[5000 ppm] + 500 ppm Triton X-100	[3000 ppm]	[3000 ppm] + 1000 ppm Triton X-100	[3000 ppm] + sacarosa 0.5 %	[3000 ppm] + sacarosa 0.5 % + 1000 ppm Triton X-100
Butil-benzoato	[5000 ppm]	[5000 ppm] + 500 ppm Triton X-100	[3000 ppm]	[3000 ppm] + 1000 ppm Triton X-100	[3000 ppm] + sacarosa 0.5 %	[3000 ppm] + sacarosa 0.5 % + 1000 ppm Triton X-100
Indeno	[5000 ppm]	[5000 ppm] + 500 ppm Triton X-100	[3000 ppm]	[3000 ppm] + 1000 ppm Triton X-100	[3000 ppm] + sacarosa 0.5 %	[3000 ppm] + sacarosa 0.5 % + 1000 ppm Triton X-100
9,10-dimetilantraceno	[5000 ppm]	[5000 ppm] + 500 ppm Triton X-100	[3000 ppm]	[3000 ppm] + 1000 ppm Triton X-100	[3000 ppm] + sacarosa 0.5 %	[3000 ppm] + sacarosa 0.5 % + 1000 ppm Triton X-100
Glucosa	[5000 ppm]	[5000 ppm] + 500 ppm Triton X-100	ND	ND	ND	ND
Queroseno	ND	ND	[3000 ppm]	[3000 ppm] + 1000 ppm Triton X-100	[3000 ppm] + sacarosa 0.5 %	[3000 ppm] + sacarosa 0.5 % + 1000 ppm Triton X-100
Benceno	ND	ND	[3000 ppm]	[3000 ppm] + 1000 ppm Triton X-100	[3000 ppm] + sacarosa 0.5 %	[3000 ppm] + sacarosa 0.5 % + 1000 ppm Triton X-100
Diocilftalato	ND	ND	[3000 ppm]	[3000 ppm] + 1000 ppm Triton X-100	[3000 ppm] + sacarosa 0.5 %	[3000 ppm] + sacarosa 0.5 % + 1000 ppm Triton X-100
Tolueno	ND	ND	[3000 ppm]	[3000 ppm] + 1000 ppm Triton X-100	[3000 ppm] + sacarosa 0.5 %	[3000 ppm] + sacarosa 0.5 % + 1000 ppm Triton X-100
Acido benzoico	ND	ND	[3000 ppm]	[3000 ppm] + 1000 ppm Triton X-100	[3000 ppm] + sacarosa 0.5 %	[3000 ppm] + sacarosa 0.5 % + 1000 ppm Triton X-100
Piridina	ND	ND	[3000 ppm]	[3000 ppm] + 1000 ppm Triton X-100	[3000 ppm] + sacarosa 0.5 %	[3000 ppm] + sacarosa 0.5 % + 1000 ppm Triton X-100

ND: No Determinado

De acuerdo a los resultados que más adelante se detallan, se evaluaron otras tres concentraciones adicionales de indeno y n-hexano y se realizó la comparación con la actividad de lipasa al utilizar al mismo tiempo sacarosa al 0.8 % como fuente adicional de carbono (Tabla 2).

Tabla 2. Concentraciones de indeno y n-hexano utilizadas para evaluar la inducción de las lipasas de *Pseudomonas* sp.

Compuesto	Concentración utilizada como única fuente de carbono	Concentración del compuesto + Fuente de carbono adicional
Indeno	800 ppm	800 ppm + sacarosa 0.8 %
	1200 ppm	1200 ppm + sacarosa 0.8%
	1600 ppm	1600 ppm + sacarosa 0.8%
n-hexano	800 ppm	800 ppm + sacarosa 0.8 %
	1050 ppm	1050 ppm + sacarosa 0.8 %
	1300 ppm	1300 ppm + sacarosa 0.8 %

5.1.4 Evaluación de la actividad de lipasa

La evaluación de la actividad de lipasa se realizó en base a la técnica reportada por Margesin *et al.* (2002) con algunas modificaciones. Se tomaron 2 ml de cada medio de cultivo en el que se evaluaría la enzima y se centrifugaron en tubos de polipropileno a 13,000 rpm a 4 °C por 8 min., se tomó 1.0 ml de extracto libre de células y se colocó en un tubo de vidrio al que se le adicionó 2.0 ml de regulador 0.1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ pH 7.2. Los tubos se sometieron a preincubación en un baño térmico de agua durante 10 min a 37 °C. Pasado este lapso de tiempo se adicionaron 20 μl del sustrato [100 mM *p*-nitrofenol butirato (pNPB) diluido en 2-

propanol y almacenado a -20 °C], el contenido se mezcló perfectamente y se mantuvo la reacción durante 15 minutos. El proceso de reacción de la enzima se detuvo introduciendo los tubos en un baño de hielo, la liberación del *p*-nitrofenol (pNP) fue medida espectrofotométricamente a 400 nm. La absorbancia fue extrapolada en una curva tipo de 0 a 100 µg pNP. La actividad de enzima lipasa se expresó en µg pNP/ml.

5.2 FASE II. *Cinéticas de producción de las lipasas de Pseudomonas sp y evaluación del efecto del pH, concentración de sacarosa y concentración de hidrocarburos.*

En esta fase se realizaron cinéticas de producción de la enzima utilizando como fuente de carbono los compuestos que mostraron mayor actividad en la inducción de la enzima (Fase I) y posteriormente se evaluó mediante el diseño experimental de Box-Behnken el efecto de la concentración de sacarosa, pH y concentración del hidrocarburo en la producción de la enzima y en la degradación del hidrocarburo utilizado.

5.2.1 *Cinéticas de producción de lipasas de Pseudomonas sp.*

Se prepararon matraces Erlenmeyer de 125 ml, conteniendo 25 ml de MM, a cada matraz le fue adicionado el hidrocarburo correspondiente: 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno (2700 ppm), butil-benceno (2250) ó n-hexano (1300 ppm), 0.1 ml de inóculo, y en algunas cinéticas se le adicionó Triton X-100 (2000 ppm) y sacarosa al 0.8 % (Tabla 3).

Tabla 3. Fuentes de carbono utilizadas en las cinéticas de producción de enzima lipasa.

Cinética No.	Hidrocarburo	Sacarosa 0.8 %	Triton X-100 (2000 ppm)
1	1,2,3,4-tetrahidronaftaleno	-	-
2	1,2,3,4-tetrahidronaftaleno	Si	-
3	1,2,3,4-tetrahidronaftaleno	-	si
4	1,2,3,4-tetrahidronaftaleno	Si	si
5	Butil-benceno	-	-
6	Butil-benceno	Si	-
7	Butil-benceno	-	si
8	Butil-benceno	Si	si
9	n-hexano	Si	-
10	n-hexano	Si	si
11	-	-	si
12	-	Si	-

(Si)-adición de la fuente de carbono, (-): no adición de la fuente de carbono

Los matraces fueron incubados durante 15 días a 30 °C y 180 rpm. Cada 24 h durante los primeros cuatro días de incubación y cada tres días durante los siguientes 11 días se retiró un matraz para evaluar crecimiento microbiano por dilución en placa; se midió el pH mediante el uso de un potenciómetro (PHS-3C) y actividad de lipasa con la técnica antes descrita.

5.2.2 Efecto del pH, concentración de sacarosa y concentración del hidrocarburo en la producción de lipasas de *Pseudomonas sp* a través del diseño experimental de Box-Behnken.

Se utilizó el diseño experimental de Box-Behnken para evaluar el efecto de tres variables independientes sobre la actividad enzimática y la remoción del hidrocarburo. El diseño consistió en 15 experimentos (Tabla 4) con tres variables y tres niveles cada una; concentración del hidrocarburo, pH y concentración de sacarosa.

Tabla 4. Diseño experimental de Box-Behnken

Matraz No.	Concentración del hidrocarburo (ppm)	pH	Concentración de sacarosa %
1	-1	-1	0
2	-1	1	0
3	1	-1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	-1	0	1
7	1	0	-1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	-1	1
11	0	1	-1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

pH: "1" corresponde a pH 9; "0" corresponde a pH 8 y "-1" corresponde a pH 7.

Concentración de sacarosa: "1" corresponde a 1.0 %; "0" corresponde a 0.9 % y "-1" corresponde a 0.8%

1,2,3,4-tetrahidronaftaleno: "1" corresponde a 2730 ppm; "0" corresponde a 1950; "-1" corresponde a 1170.

Butil-benceno: "1" corresponde a 2240 ppm; "0" corresponde a 1550 ppm; "-1" corresponde a 860 ppm.

n-hexano: "1" corresponde a 1830 ppm; "0" corresponde a 1570 ppm; "-1" corresponde a 1300 ppm.

El diseño experimental se preparó por duplicado en matraces Erlenmeyer de 125 ml conteniendo 25 ml de MM y 2000 ppm de Triton X-100 acorde con los experimentos (Tabla 4), cada matraz fue posteriormente inoculado con 0.1 ml de inóculo fresco. Transcurridos cinco días de incubación en la oscuridad a 180 rpm y 28 °C, se evaluó la actividad enzimática de lipasa con la técnica antes descrita.

Además se prepararon tres controles sin inocular para cuantificar las pérdidas abióticas de los hidrocarburos. Este diseño se realizó utilizando 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno, butil-benceno y n-hexano por separado.

5.2.3 Análisis estadístico

La prueba estadística empleada para el análisis de las superficies de respuesta de los diseños Box-Behnken ANOVA por una prueba matriz de Fisher (prueba F). Para esto se utilizó el software estadístico DOE++ de Relia Soft, versión de evaluación, por medio de un diseño Método de Superficie de Respuesta.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 FASE I. Evaluación de la inducción del sistema lipolítico de *Pseudomonas sp.* mediante compuestos aromáticos y alifáticos.

Dentro de la primera etapa se analizó la inducción de lipasas por diversos hidrocarburos del petróleo. Los primeros resultados mostraron que ninguno de los compuestos fue capaz de inducir por si solo la actividad enzimática de *Pseudomonas sp.* al utilizar 5000 ppm (Serie experimental No. 1). De tal manera que se analizó el efecto de la presencia del surfactante Triton X-100 al utilizar la misma concentración de hidrocarburos (Serie experimental No. 2), encontrándose que se favoreció la inducción de las lipasas pero solo al utilizar butil benceno, 9,10-dimetilantraceno y n-hexano, cuantificando como máximo 2.6 µg pNP/ml con el 9,10-dimetilantraceno (Figura 1). Posteriormente, al utilizar los hidrocarburos como única fuente de carbono a una concentración de 3000 ppm (Serie experimental No. 3) se registró actividad enzimática en cuatro ellos (butil-benceno, 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno, n-hexano y benceno), lo anterior sugiere que la concentración a la que se encuentre el hidrocarburo es determinante para la expresión de la enzima durante el proceso de degradación. Además, también se observa que no todos los hidrocarburos ensayados fueron inductores de la lipasa de *Pseudomonas sp.* al menos no a la concentración de 3000 ó 5000 ppm. Lo anterior sugiere una alta especificidad de la enzima por el sustrato (hidrocarburo).

Adicionalmente, se analizó la expresión de la lipasa al utilizar el surfactante Triton X-100 adicionado a cada hidrocarburo a 3000 ppm (Serie experimental No. 4) y los resultados indicaron un incremento en la actividad enzimática en comparación con el uso de los diferentes hidrocarburos como únicas fuentes de carbono (Serie experimental No. 3).

Sin embargo, ésta actividad enzimática se registró en los mismos cuatro hidrocarburos que presentaron actividad y adicionalmente con el 9,10-dimetilantraceno (Figura 1).

El incremento de actividad enzimática por efecto del Triton X-100 en el cultivo, se especula que puede deberse a lo señalado por Li & Chen (2009) quienes mencionan que los surfactantes favorecen la solubilidad y disolución de hidrocarburos al disminuir la tensión superficial y con ello se incrementa el contacto entre los microorganismos y el hidrocarburo, conllevando a una mayor degradación del mismo. De tal manera que de acuerdo a los resultados una mayor degradación del hidrocarburo podría estar asociada a una mayor actividad de lipasa. Las actividades más altas que se produjeron fueron al utilizar 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno con 12.17 y con benceno con 12.33 $\mu\text{g pNP/ml}$ (Serie experimental No.4, Figura 1). Al respecto, Lin (*et al.*, 1995) describen que la adición de Triton X-100 a un medio de cultivo conteniendo como fuente de carbono aceite de oliva fue capaz de incrementar la producción de lipasa en *P. pseudoalcaligenes* F-111 hasta en 50 veces.

Conjuntamente se encontró que el uso del Triton X-100 como única fuente de carbono por *Pseudomonas* sp. indujo la actividad de lipasa, cuantificándose una actividad de 14 $\mu\text{g pNP/ml}$ a los cinco días de incubación; lo anterior sugiere la posibilidad de contar con un efecto aditivo o sinérgico en la producción de enzima al utilizarse el Triton X-100 en conjunto con cada uno de los cinco hidrocarburos antes mencionados, pero no así para los casos del butil-benzoato, dioctilftalato, indeno y piridina, en donde no se presentó actividad enzimática aunque se presentó crecimiento de la cepa, sugiriendo que la degradación de estos compuestos no se realiza por la acción de las lipasas.

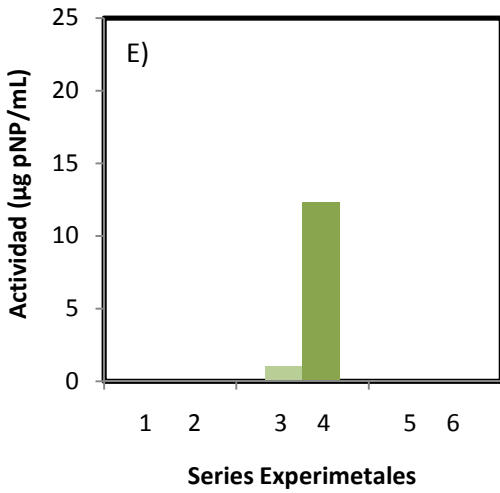
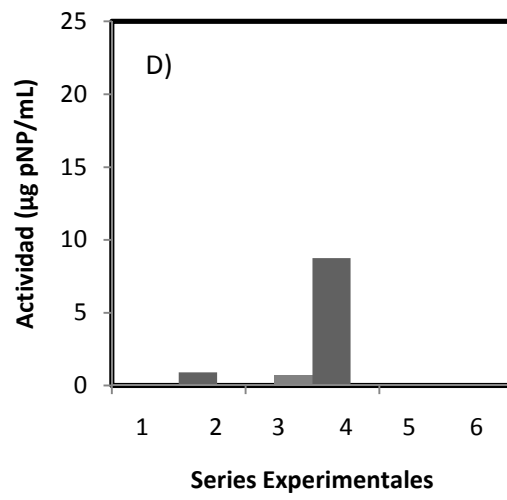
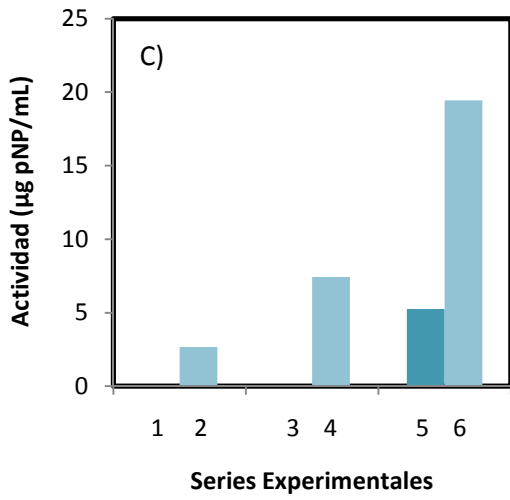
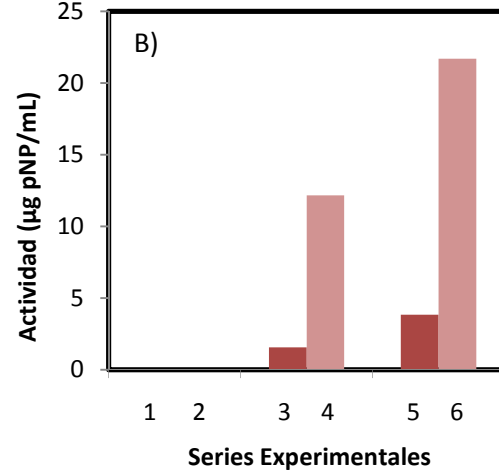
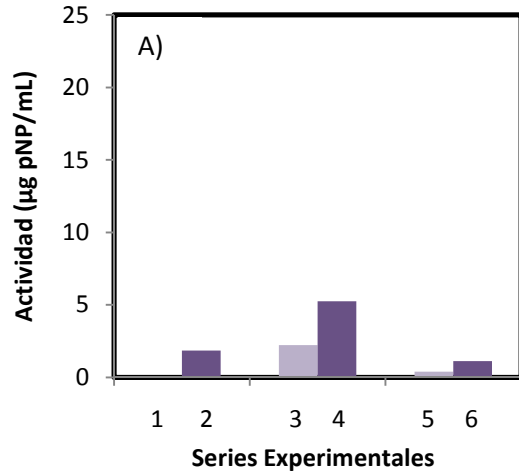


Figura 1. Actividad de lipasa de *Pseudomonas* sp. en presencia de A) butil-benceno, B) 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno, C) 9,10-dimetilantraceno, D) n-hexano y E) benceno.

En el caso de la utilización de ácido benzoico y tolueno no se presentó crecimiento de la cepa aun en presencia de Triton X-100, lo cual indica una nula tolerancia a éstos hidrocarburos.

Adicionalmente, se evaluó el efecto del uso de una fuente de carbono de fácil asimilación como lo es la sacarosa en la inducción del sistema lipolítico de *Pseudomonas* sp. Los resultados mostraron que sólo en dos compuestos la actividad se incrementó en comparación con el uso del hidrocarburo como única fuente de carbono: 9,10-dimetilantraceno y 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno, de 0.04 a 5.24 µg pNP/ml y 1.57 a 3.84 µg pNP/ml, respectivamente, (serie experimental No. 5, Figura 1). En el caso del uso del butil-benceno, n-hexano y benceno la actividad disminuyó de 2.22 a 0.38, de 0.74 a 0.0 y de 1.01 a 0 µg pNP/ml, respectivamente por efecto de la presencia de sacarosa (Figura 1), esto sugiere que la expresión de la lipasa es propensa a represión catabólica. Los restantes seis hidrocarburos evaluados no presentaron actividad aunque si crecimiento, lo cual corrobora la no participación de las lipasas extracelulares en el metabolismo de degradación. Al respecto, Boekema *et al.*, (2007) indican que la presencia de una fuente adicional de carbono como lo es la sacarosa favorece la actividad de las lipasas, no así la presencia de glucosa, esto en el sistema de degradación de aceite de oliva mediante *Burkholderia glumae*. Por el contrario Joseph *et al.* (2011) mencionan que *Micrococcus roseus* produce mayor actividad lipolítica teniendo como fuente de carbono alternativa glucosa en comparación con sacarosa, lactosa y maltosa. Es decir, que cada microorganismo presenta represión catabólica por carbono de acuerdo a su sistema de transporte de carbohidratos a diferentes niveles (transcripción, procesamiento de RNA, traducción y modificación de proteínas).

Por último, se evaluó el efecto combinado de una fuente de carbono alterna (sacarosa) y la presencia de un surfactante (Triton X-100) en la inducción de la enzima al utilizar los hidrocarburos. Los resultados mostraron que al igual que en la serie experimental donde se adicionó sacarosa, los mismos dos hidrocarburos fueron los que incrementaron la actividad enzimática hasta 19.44 µg pNP/ml en

9,10-dimetilantraceno y hasta 21.7 μg pNP/ml para el 1, 2, 3, 4-tetrahidronaftaleno; no así para el uso del hexano y benceno, en donde no se observó actividad enzimática de lipasa. Estos resultados confirman que la degradación de cada hidrocarburo es llevada a cabo mediante rutas diversas y que la presencia de surfactantes y fuentes de carbono adicionales tienen efectos diversos, de tal manera que el uso de la actividad de lipasa como marcador de la degradación de hidrocarburos es limitada. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Boekema *et al.*, (2007) quienes mencionan que la presencia del surfactante Triton X-100 no incrementa la actividad de la lipasa cuando la sacarosa o la glucosa se ha utilizado como fuente de carbono en una cepa de *Burkholderia glumae*, pero el uso de otro surfactante como lo es el Tween 80 si estimula la producción de lipasa cuando la sacarosa se utiliza como fuente de carbono.

Por otro lado, se estudió la actividad de lipasa de *Pseudomonas sp.* utilizando n-hexano como fuente de carbono a concentraciones menores que las dos evaluadas previamente (5000 y 3000 ppm), lo anterior debido a que se ha descrito que algunos n- alcanos como hexadecano y octadecano, inducen las lipasas (Breuil, *et al.*, 1978; Kanwar & Goswami, 2002; Boekema *et al.*, 2007) y en la presente investigación la actividad de lipasa fue nula al utilizar 5000 ppm y 0.74 μg pNP/ml al utilizar 3000 ppm. De tal manera que se evaluaron concentraciones de 800, 1050 y 1300 ppm como se indica en la Tabla 2, las actividades obtenidas cuando se utilizó este compuesto como única fuente de carbono fueron similares en las tres concentraciones (1 μg pNP/ml) (Figura 2A), de tal manera que no tuvo efecto la concentración, pero que tampoco se trata de una elevada actividad y tampoco tuvo diferencia con la cuantificada al usar la concentración de 3000 ppm de n-hexano. En los casos donde se adicionó sacarosa, las respuestas en las actividades de enzima lipasa fueron más altas, desde 2.35 para la concentración de 800 ppm y hasta 3.79 μg pNP/ml con 1300 ppm del hidrocarburo, lo cual indica que se tiene un efecto positivo por la presencia de la sacarosa y que además depende de la concentración a la que se encuentre el hidrocarburo, pues en el

caso de la utilización del n-hexano a 3000 ppm el efecto de la sacarosa fue inhibitorio para la enzima.

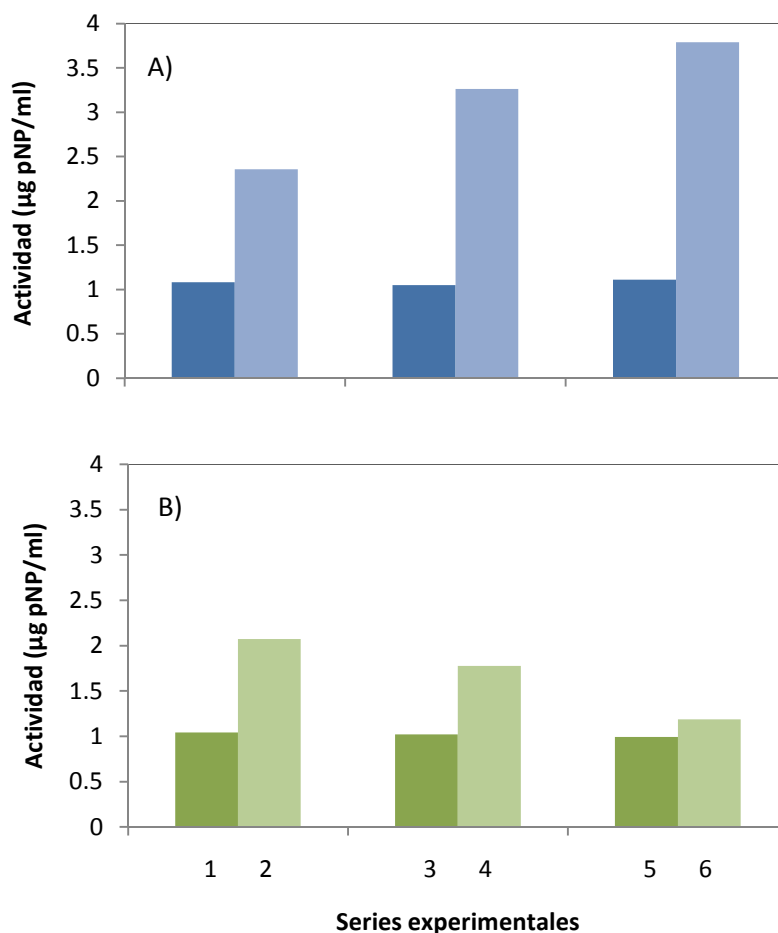


Figura 2. Actividad de enzima lipasa de *Pseudomonas* sp. en presencia de A) n-Hexano y n-Hexano y sacarosa, B) indeno e indeno y sacarosa.

A: Serie experimental 1: 800 ppm n-hexano; Serie 2: 800 ppm n-hexano + sacarosa 0.8 %; Serie 3: 1050 ppm n-hexano; Serie 4: 1050 ppm n-hexano + sacarosa 0.8 %; Serie 5: 1300 ppm n-hexano; Serie 6: 1300 ppm n-hexano + sacarosa 0.8 %.

B: Serie experimental 1: 800 ppm indeno; Serie 2: 800 ppm indeno + sacarosa 0.8 %; Serie 3: 1200 ppm indeno; Serie 4: 1200 ppm indeno + sacarosa 0.8 %; Serie 5: 1600 ppm indeno; Serie 6: 1600 ppm indeno + sacarosa 0.8 %).

Otro caso particular fue el estudio del uso del indeno como fuente de carbono para la inducción de la lipasa de *Pseudomonas* sp. por tratarse de un compuesto monoaromático similar al 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno, con la diferencia de tener unido un cicloalqueno en lugar de un cicloalcano. Como se menciono previamente el indeno fue uno de los hidrocarburos que no indujeron la enzima a 5000 ni a 3000 ppm, de tal forma que se evaluó posteriormente a 800, 1200 y 1600 ppm

registrándose una actividad prácticamente similar para las tres concentraciones utilizadas (1 μg pNP/ml), no así en los experimentos donde se adicionó sacarosa, en donde se cuantificó una actividad de 2.07 μg pNP/ml al usar la más baja concentración del hidrocarburo (800 ppm) y de 1.18 μg pNP/ml al utilizar 1600 ppm (Figura 2B). Como puede observarse la presencia de sacarosa favoreció la actividad enzimática mayoritariamente a menor concentración de indeno. Además, se observó que aunque la concentración del indeno fue disminuida hasta una tercera parte en comparación con la utilizada con el 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno (3000 ppm), la actividad de lipasa no alcanzó sus niveles, es decir que aunque los compuestos son muy similares estructuralmente, la lipasa aparentemente tiene cierta especificidad. Cabe mencionar que no se encuentra estudiada la inducción de lipasas mediante indeno.

6.2 FASE II. *Cinéticas de producción de las lipasas de Pseudomonas sp. y evaluación del efecto del pH, concentración de sacarosa y concentración de hidrocarburos.*

En esta fase se analizó la producción de lipasa y el crecimiento de *Pseudomonas* sp. al utilizar dos compuestos aromáticos (1,2,3,4-tetrahidronaftaleno y butil-benceno) y un compuesto alifático (n-hexano), los cuales fueron capaces de inducir la enzima de la cepa al utilizarse como únicas fuentes de carbono en la Fase I. Posteriormente, se evaluó por medio del diseño experimental de Box-Behnken el efecto del pH, el efecto de la concentración de sacarosa y de la concentración del hidrocarburo sobre la producción de la enzima; lo anterior al utilizar cada uno de los hidrocarburos.

6.2.1 *Cinéticas de crecimiento y de producción de lipasa de Pseudomonas sp.*

La velocidad de crecimiento de *Pseudomonas* sp. que mostró al utilizar el compuesto aromático 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno como única fuente de carbono, fue la menor (0.01679 h^{-1}) en comparación con las velocidades de crecimiento en

donde se contaba con un compuesto de carbono adicional (sacarosa y/o Triton X-100) (Figura 3A). El crecimiento que se presentó fue de 1.34×10^5 UFC/ml a 8.88×10^7 UFC/ml en un tiempo de siete días de incubación. Mientras que en los otros casos, el máximo crecimiento se obtuvo durante los primeros dos o tres días de incubación. Esto indica que las fuentes adicionales de carbono acortaron la fase exponencial de crecimiento de *Pseudomonas sp.* favoreciendo la velocidad de crecimiento, probablemente por efecto de una más fácil asimilación de las fuentes adicionales de carbono y/o por una disminución de la toxicidad del compuesto aromático dada por la adición de la sacarosa y/o Triton X-100.

Si se compara el efecto de la presencia del detergente contra el de la sacarosa al utilizar 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno, puede observarse que la velocidad de crecimiento de *Pseudomonas sp.* en ambas cinéticas fue similar, 0.064016 h^{-1} y 0.047083 h^{-1} , respectivamente. Sin embargo, si se comparan con la velocidad de crecimiento de la cepa cuando creció en presencia de ambas fuentes adicionales de carbono junto con el hidrocarburo 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno, se observa aparentemente un efecto sinérgico (0.21177 h^{-1}).

De forma paralela al crecimiento también, se evaluó la actividad de lipasa en las distintas cinéticas. Los resultados mostraron que cuando se adicionó sacarosa y Triton X-100 se obtuvo la mayor actividad de enzima lipasa ($45.23 \mu\text{g pNP/ml}$). Esto refleja un efecto sinérgico o aditivo sobre la cepa, ya que en comparación con la adición de sacarosa o Triton X-100, o la sola presencia del hidrocarburo, la actividad de enzima lipasa expresada a los cuatro días de incubación fue de 27.4, 28.19 y $3.13 \mu\text{g pNP/ml}$, respectivamente (Figura 3B).

El efecto positivo que provoca la presencia de fuentes adicionales de carbono básicamente proteínas o polímeros sobre la mejora en algún proceso de biodegradación y de crecimiento de la biota se encuentra poco documentada en sistemas líquidos, la mayoría de los reportes donde se menciona la degradación preferencial de un grupo específico de hidrocarburos se ha estudiado en sistemas

sólidos en procesos de composteo, básicamente por la adición de materia orgánica, que sirve como fuente de nutrientes, aireación y otros procesos.

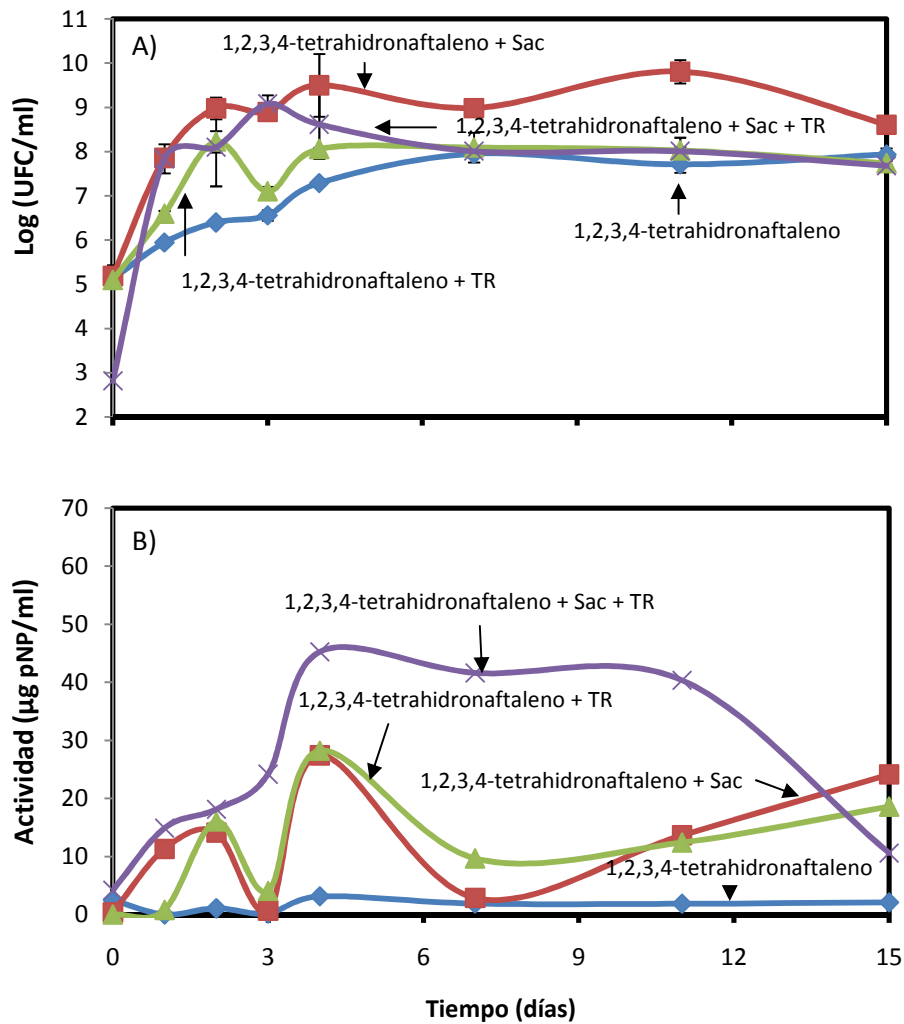


Figura 3. Curvas de crecimiento y actividad de lipasa de *Pseudomonas* sp. durante 15 días de incubación a 30 °C y 180 rpm, cultivada en 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno de acuerdo a la Tabla 3, cinéticas 1, 2, 3 y 4.

Adicionalmente, se analizó el crecimiento y la actividad de enzima lipasa de la cepa de *Pseudomonas* sp. al utilizar únicamente el surfactante ó la sacarosa como únicas fuentes de carbono y energía (Figura 4A y 4B). Cuando se utilizó el

surfactante no iónico Triton X-100 como única fuente de carbono la velocidad de crecimiento alcanzada fue de 0.089962 h^{-1} , con un incremento de la población de 1.13×10^5 hasta 1.63×10^7 UFC/ml durante los dos días de incubación. Mientras que la expresión de la actividad de lipasa fue de 0.33 a $21.31 \mu\text{g pNP/ml}$ alcanzada a los quince días de incubación. El efecto que parece tener el surfactante no iónico, Triton X-100, sobre la expresión enzimática y en el crecimiento de la cepa es inductor, sin embargo no se conoce el mecanismo por el cual este compuesto es aprovechado por la cepa.

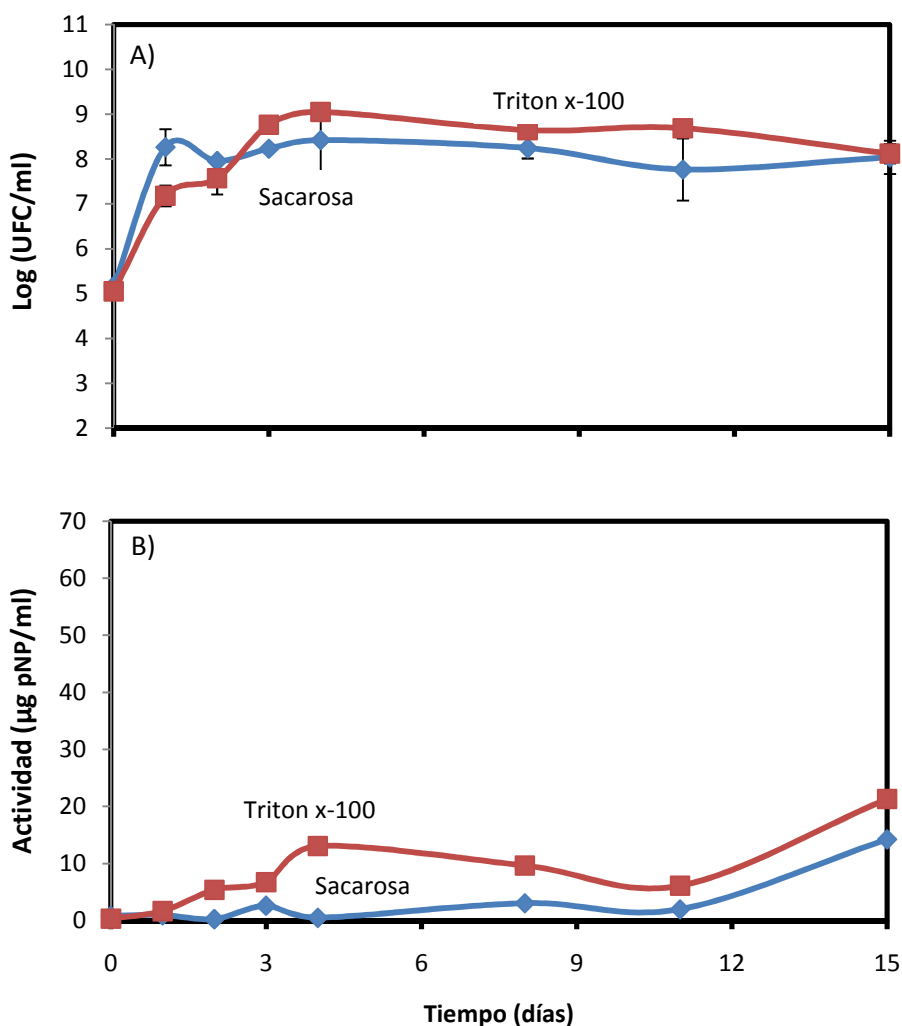


Figura 4. Curvas de crecimiento y actividad de lipasa de *Pseudomonas* sp. durante 15 días de incubación a 30°C y 180 rpm cultivada en Triton X-100 y sacarosa de acuerdo a la Tabla 3, cinéticas 11 y 12.

Respecto al uso de sacarosa como única fuente de carbono y energía por la cepa, la velocidad de crecimiento fue de 0.14974 h^{-1} , el incremento en la población fue de 1.48×10^5 llegando hasta 5.81×10^8 UFC/ml en un periodo de 24 horas y la actividad de lipasa de 0.83 y 0.95 $\mu\text{g pNP/ml}$.

El mecanismo por el cual la cepa de *Pseudomonas* sp. asimila estos dos compuestos (Triton X-100 y sacarosa) como únicas fuentes de carbono no ha sido descrito, por lo que la finalidad de estas cinéticas fue determinar si por sí solos estos compuestos podrían favorecer tanto el incremento en la población en la cepa, como la inducción de actividad de enzima lipasa. Ambos compuestos favorecieron el crecimiento de la cepa de *Pseudomonas* sp. (Figura 4A), pero la mayor expresión de enzima lipasa (Figura 4B) se obtuvo al utilizar Triton X-100 como fuente de carbono. Al parecer la sacarosa tiene un efecto represor sobre la actividad enzimática. Makhzoum *et al.* (1995) se señala que los azúcares tienen un efecto represor en la producción de lipasa en la cepa de *P. fluorescens* 2D, donde la glucosa favoreció el crecimiento de la cepa pero reprimió la producción de lipasa.

El segundo compuesto analizado fue el monoaromático butil-benceno. Primeramente se monitoreo el crecimiento y la actividad de lipasa de *Pseudomonas* sp. al utilizar dicho hidrocarburo como única fuente de carbono y energía, la velocidad de crecimiento registrada fue de 0.03022 h^{-1} , mientras que la fase exponencial se alcanzó durante los primeros cuatro días de incubación con un incremento de la población de 1.13×10^5 hasta 9×10^7 UFC/ml. Por otro lado, en los casos donde se adicionó sacarosa y/o Triton X-100, se observó un máximo crecimiento en la población al primer o segundo día de incubación, sin embargo no se puede señalar que la presencia de estas fuentes adicionales de carbono hayan facilitado la asimilación del monoaromático por parte de la cepa como fuente de energía o si estos pudieron inducir por sí mismos la respuesta de la lipasa.

El efecto de la sacarosa sobre la velocidad de crecimiento en la cepa en comparación con el del surfactante, fue aparentemente sinérgico, ya que la

velocidad máxima de crecimiento se alcanzó al primer día de incubación (0.104281 h^{-1}), mientras que en presencia del Triton X-100 se alcanzó al segundo día (0.063641 h^{-1}). Por otro lado, teniendo las dos fuentes alternas de carbono en la cepa cultivada en butil-benceno, se observó un efecto sinérgico (0.223781 h^{-1}), cuya fase exponencial de crecimiento se observó al primer día de incubación, de 6.43×10^2 hasta 1.51×10^8 UFC/ml (Figura 5A).

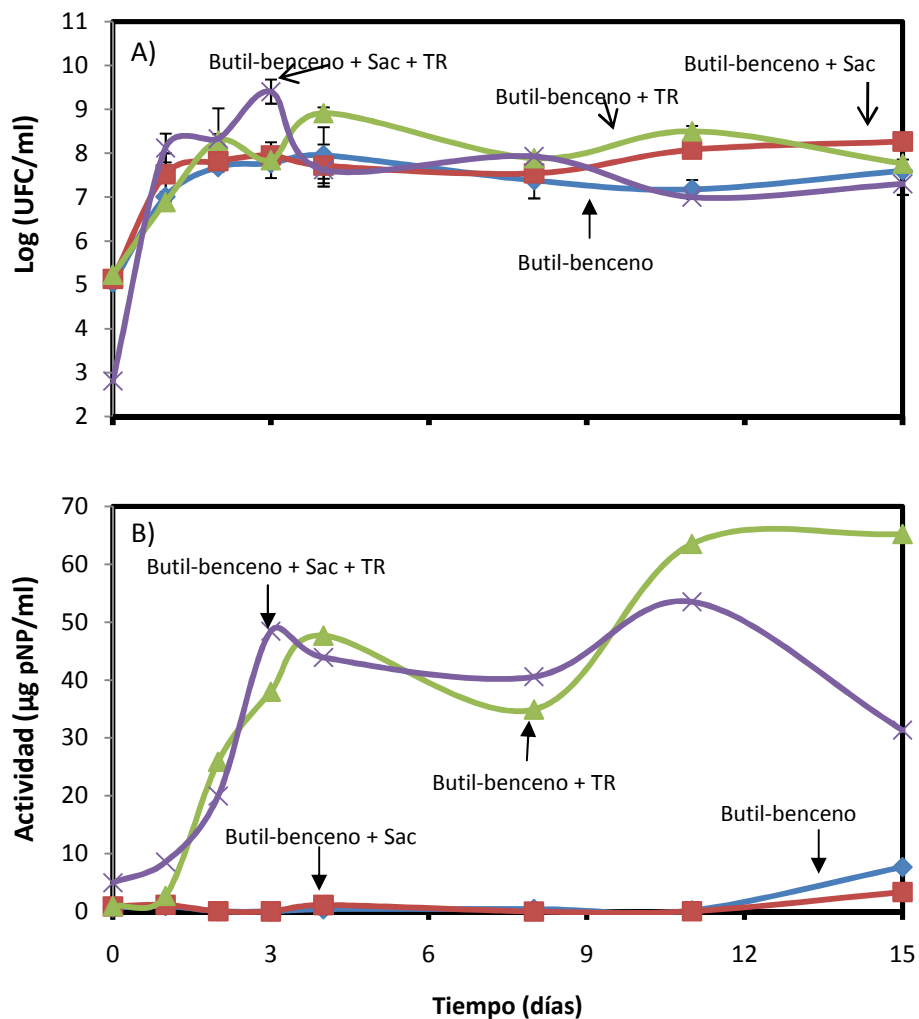


Figura 5. Curvas de crecimiento y actividad de lipasa de *Pseudomonas* sp. durante 15 días de incubación a 30°C y 180 rpm cultivada en butil-benceno de acuerdo a la Tabla 3, cinéticas 5, 6, 7 y 8.

La expresión de la actividad de enzima lipasa en la cepa de *Pseudomonas* sp. descrita en la Figura 5B, registró una actividad de 0.66 a 7.67 $\mu\text{g pNP/ml}$ teniendo solamente al hidrocarburo como fuente de carbono. Mientras que la presencia de la sacarosa inhibió la respuesta de la lipasa en la cepa hasta el onceavo día de incubación. A los quince días de incubación se registró una actividad de 0.88 a 3.34 $\mu\text{g pNP/ml}$, que en comparación con la presencia del surfactante la respuesta observada aumentó en casi 20 veces (de 0.95 a 65.22 $\mu\text{g pNP/ml}$), en el mismo periodo de incubación.

Al contar la cepa con ambas fuentes adicionales de carbono la máxima respuesta de la enzima fue de 4.96 a 53.53 $\mu\text{g pNP/ml}$, a los once días de incubación. Al parecer la presencia de la sacarosa inhibió la respuesta de la actividad de lipasa en la cepa de *Pseudomonas* sp, ya fuese con la presencia adicional de Triton X-100 o sólo con la cepa cultivada en el compuesto monoaromático.

Finalmente se observa en la Figura 6A la serie de cinéticas de crecimiento de la cepa cultivada en n-hexano como fuente de carbono en combinación con sacarosa y/o Triton X-100. En estas se observa que para ambos casos la fase exponencial de crecimiento se alcanzó en los primeros dos días de incubación: contando con sacarosa como fuente alterna de carbono la velocidad de crecimiento alcanzada fue de 0.215726 h^{-1} ; un incremento en la población de 6.46×10^2 a 9.72×10^7 UFC/ml, con una actividad de lipasa nula durante la cinética de 15 días (Figura 6B); en el cultivo donde se contó con ambas fuentes alternas de carbono (sacarosa y Triton X-100) la velocidad de crecimiento fue 0.21917 h^{-1} , el aumento de población fue 7.88×10^2 a 1.43×10^8 UFC/ml, mientras que la actividad de enzima lipasa de 2.22 a 24.8 $\mu\text{g pNP/ml}$.

Una posible baja toxicidad producto de la adición de la sacarosa y del surfactante le permitió a la cepa de *Pseudomonas* sp. aumentar su población rápidamente y utilizar el compuesto alifático como fuente de carbono y energía, respuesta que no se observó con la sola presencia del surfactante. De manera

similar, la presencia de ambas fuentes alternas de carbono tuvo un efecto sinérgico en la respuesta de enzima lipasa de la cepa.

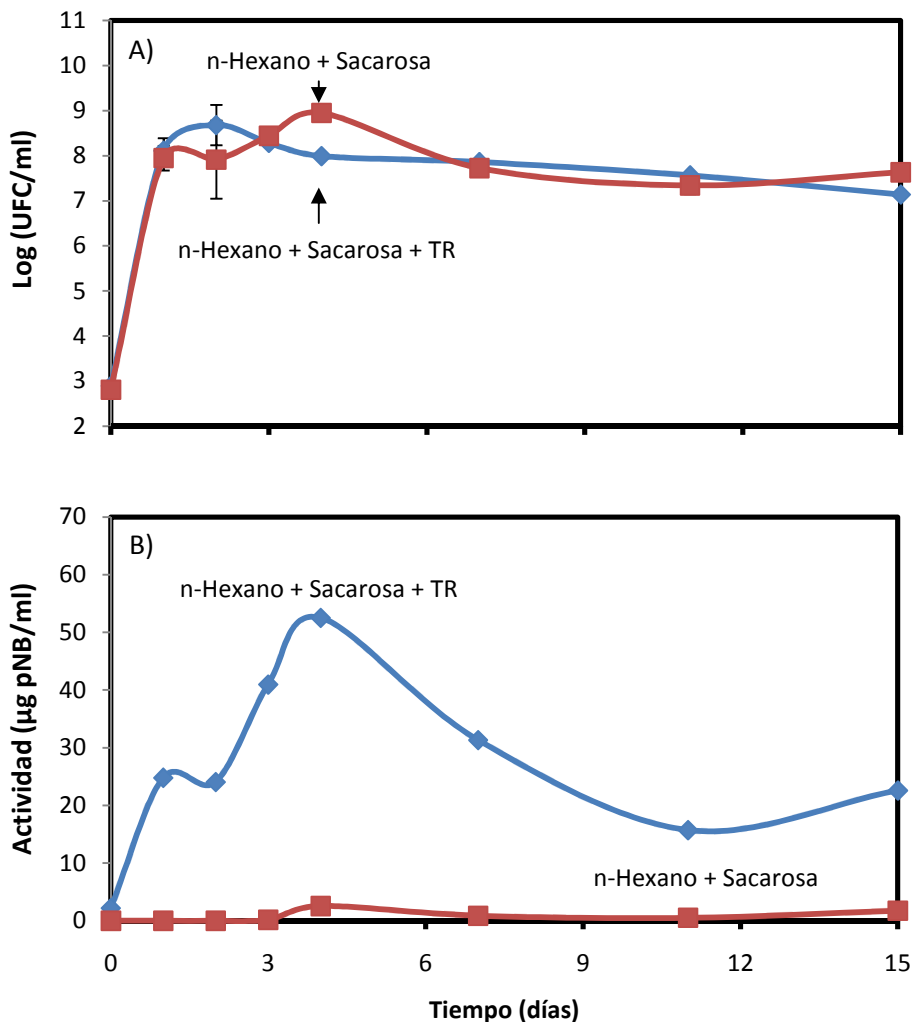


Figura 6. Curvas de crecimiento y actividad de lipasa de *Pseudomonas* sp. durante 15 días de incubación a 30° C y 180 rpm de cultivada en n-hexano acuerdo a la Tabla 3, cinéticas 9 y 10.

En base a lo observado en esta fase de la investigación, se puede sugerir que la presencia de una fuente alterna de carbono, en este caso sacarosa y del surfactante no iónico (Triton X-100) favorecen el incremento en la población de la cepa de *Pseudomonas* sp. al facilitarle aparentemente la asimilación de los compuestos aromáticos y alifáticos como fuente de carbono y energía. Por otro

lado, el efecto que estas fuentes alternas de carbono tienen sobre la respuesta de la actividad de la enzima lipasa tiene que estudiarse de manera particular, ya que el efecto de la presencia de sacarosa no pudo ser comparable para todos los experimentos realizados. Sin embargo cuando se contaba también con el surfactante, el efecto observado en la actividad de lipasa, fue sinérgico. Por lo que identificar el mecanismo por el que la sacarosa repercute sobre esta respuesta es importante para determinar cómo es que promueve un efecto sinérgico en la degradación de los hidrocarburos analizados.

6.2.1 Efecto del pH, concentración de sacarosa y concentración del hidrocarburo sobre la producción de lipasas de Pseudomonas sp.

Como se mencionó previamente, se estudió el efecto sobre la producción de enzima lipasa utilizando tres variables independientes con tres niveles cada una y el resultado fue la obtención de superficies de respuesta generadas por el diseño experimental de Box-Behnken. A continuación se describen las superficies de respuesta de forma individual para cada hidrocarburo analizado (1, 2, 3, 4-tetrahidronaftaleno, butil-benceno y n-hexano).

6.2.1.1 Efecto del pH, concentración de sacarosa y concentración de 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno en la producción de lipasas de Pseudomonas sp.

Después de cinco días de incubación se midió la actividad de enzima lipasa para observar la influencia de la concentración de sacarosa, pH y concentración de 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno en los diferentes sistemas del diseño experimental obteniendo las siguientes superficies de respuesta.

En la Figura 7 se puede observar que se obtuvo una respuesta mayor en la actividad de lipasa cuando convergen el valor más bajo de la variable pH (7), y el valor medio de la variable de concentración de sacarosa (0.9 %). En la siguiente interacción de factores, la mayor actividad enzimática de lipasa se registró en el

valor bajo de pH (7) y la menor concentración del hidrocarburo (1170 ppm), (Figura 8). Finalmente, en la tercera superficie de respuesta, donde se describe la actividad enzimática de lipasa con relación a las concentraciones de sacarosa y de hidrocarburo la mayor actividad de lipasa (11.98 $\mu\text{g pNP/ml}$) se obtuvo empleando una concentración de sacarosa del 0.9% y se utilizó la menor concentración de 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno, correspondiente a 1170 ppm (Figura 9).

Analizando conjuntamente estas respuestas se deduce entonces que las condiciones que favorecen una mejor respuesta de la enzima lipasa son aquellas donde el pH es de 7, el contenido de sacarosa es de 0.9% y la concentración del hidrocarburo es la más baja (1170 ppm), ya que es donde se observó una actividad de enzima lipasa de 48.1 $\mu\text{g pNP/ml}$. En cambio, los valores de las variables independientes en las que se observó una menor actividad de lipasa en este diseño fueron: el valor alto de concentración de sacarosa (1.0 %), el valor intermedio de pH (8) y el más alto para la concentración de 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno (2730 ppm), que arrojó una actividad de 1.27 $\mu\text{g pNP/ml}$.

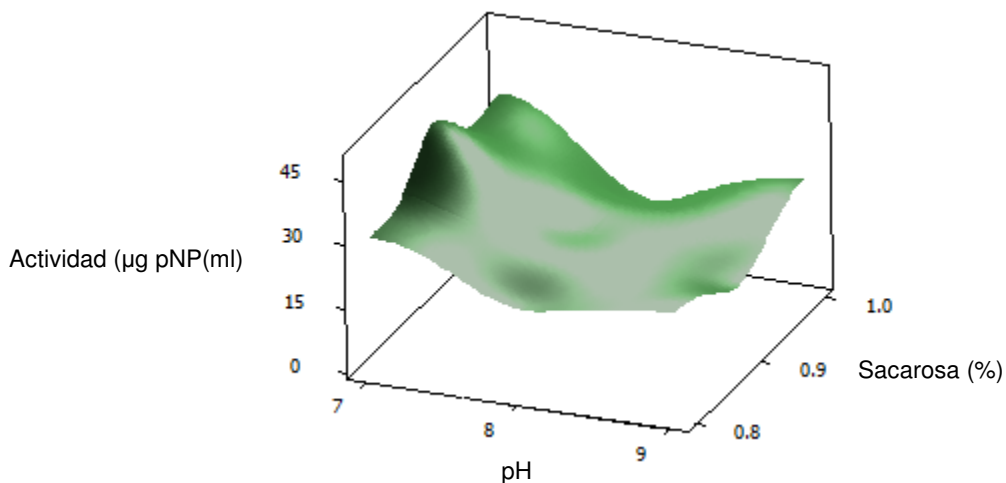


Figura 7. Superficie de respuesta para actividad de lipasa de *Pseudomonas* sp. en presencia de 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno con relación a la concentración de sacarosa (%) y pH después de cinco días de incubación en obscuridad a 180 rpm y 28° C.

El análisis estadístico ANOVA (Anexo 2) para este diseño, indicó que el efecto de la variable pH ($p < 0.0172$), y el efecto combinado de la concentración de sacarosa

y del 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno ($p < 0.0421$) influyeron significativamente sobre la respuesta de actividad lipasa en la cepa de *Pseudomonas* sp. Mientras que el efecto particular de la concentración de sacarosa ($p > 0.8482$) y de concentración del hidrocarburo ($p > 0.3212$) sobre la respuesta de actividad de lipasa no fue significativo.

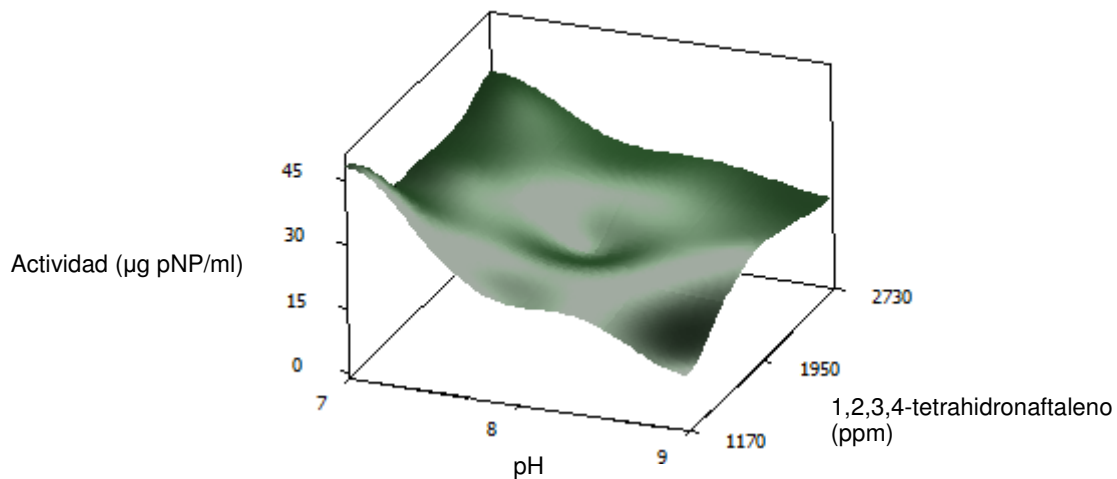


Figura 8. Superficie de respuesta para actividad de lipasa de *Pseudomonas* sp. en presencia de 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno con relación a la concentración del hidrocarburo (ppm) y pH, después de cinco días de incubación en oscuridad a 180 rpm y 28 °C.

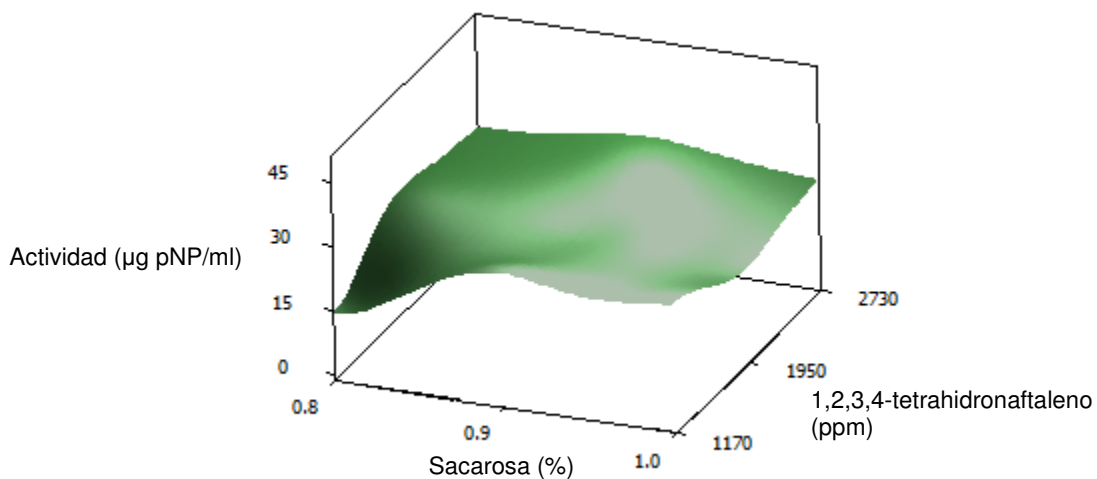


Figura 9. Superficie de respuesta para actividad de lipasa de *Pseudomonas* sp. en presencia de 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno con relación a la concentración del hidrocarburo (ppm) y de sacarosa (%), después de cinco días de incubación en oscuridad a 180 rpm y 28 °C.

6.2.2.1 Efecto del pH, concentración de sacarosa y concentración de butil-benceno en la producción de lipasas de *Pseudomonas sp.*

En la Figura 10, se describe la superficie de respuesta de la cepa de *Pseudomonas sp.* cultivada en el compuesto monoaromático butil-benceno y su respuesta de actividad enzimática con relación a la concentración de sacarosa y del pH. Es esta figura se percibe que la mayor actividad enzimática se obtuvo al emplear la concentración media de sacarosa (0.9 %) y el menor valor de la variable de pH (7), mientras que en la Figura 11 se muestra que la mayor actividad de lipasa se alcanzó en pH 7 con respecto a la menor concentración empleada de butil-benceno. La actividad de lipasa disminuyó al aumentar el pH. Finalmente al observar la superficie de respuesta obtenida de *Pseudomonas sp.* con relación a la concentración de sacarosa y del hidrocarburo (Figura 12) la mayor actividad de lipasa se alcanzó al utilizar la concentración media de la variable sacarosa (0.9%) y la menor concentración de la variable butil-benceno (860 ppm), la cual fue de 36.86 $\mu\text{g pNP/ml}$. Por otro lado, los niveles de las variables en las que se observó la menor actividad de enzima lipasa fueron: nivel alto de pH (9), nivel medio de concentración de sacarosa (0.9 %) y nivel bajo de concentración de butil-benceno con 6.33 $\mu\text{g pNP/ml}$.

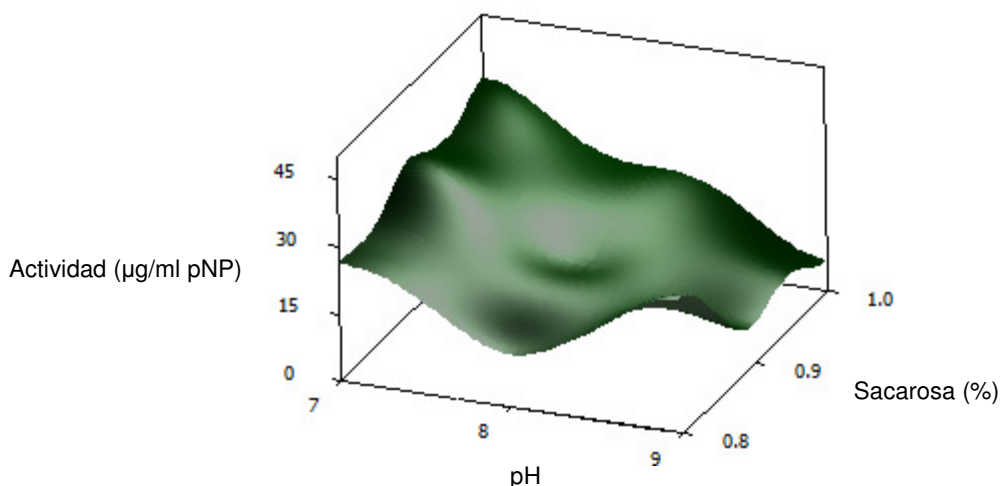


Figura 10. Superficie de respuesta para actividad de lipasa de *Pseudomonas sp.* en presencia de butil-benceno con relación a la concentración de sacarosa (%) y pH, después de cinco días de incubación en obscuridad a 180 rpm y 28 °C.

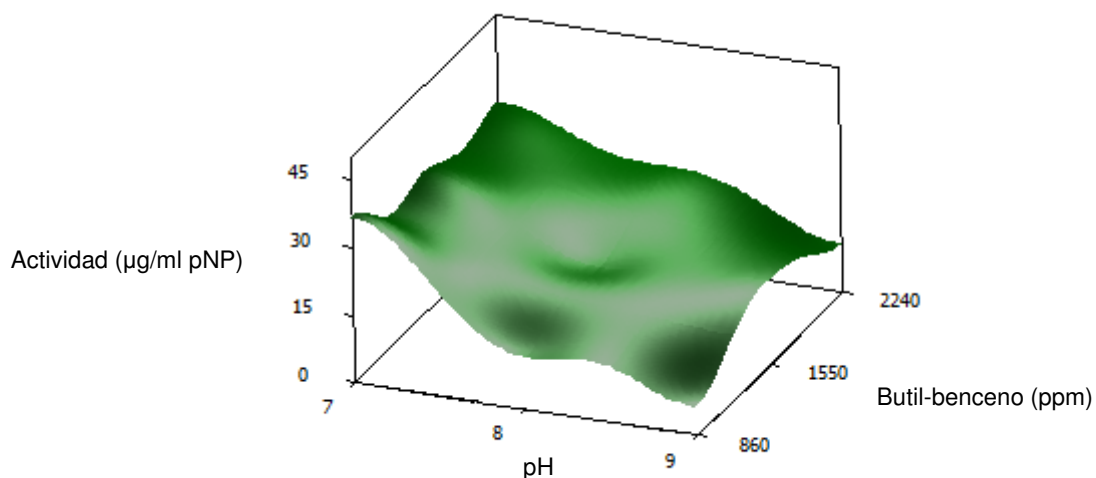


Figura 11. Superficie de respuesta para actividad de lipasa de *Pseudomonas* sp. en presencia de butil-benceno con relación a la concentración del hidrocarburo (ppm) y pH, después de cinco días de incubación en obscuridad a 180 rpm y 28 °C.

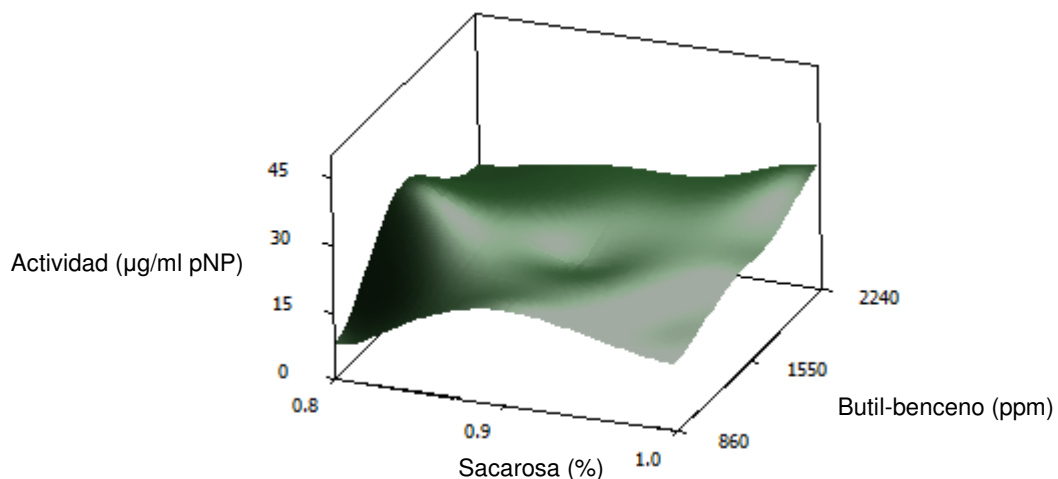


Figura 12. Superficie de respuesta para actividad de lipasa de *Pseudomonas* sp. en presencia de butil-benceno con relación a la concentración de sacarosa (%) y del hidrocarburo (ppm), después de cinco días de incubación en obscuridad a 180 rpm y 28 °C.

Al ejecutar el análisis estadístico (ANOVA) para las superficies de respuesta obtenidas para este diseño, se obtuvo que la variable de pH ($p < 0.0227$) influyó significativamente sobre la respuesta de la enzima lipasa, mientras que las

variables de la concentración de sacarosa y del hidrocarburo no influyeron de forma significativa en dicha respuesta ($p > 0.8349$, $p > 0.4576$ respectivamente).

6.2.2.3 Efecto del pH, concentración de sacarosa y concentración de n-hexano en la producción de lipasas de *Pseudomonas* sp.

Al analizar individualmente las superficies de respuestas obtenidas de los efectos de la variable del pH, concentración de sacarosa y del compuesto alifático n-hexano sobre la actividad de la enzima lipasa en la cepa de *Pseudomonas* sp. se observa en la Figura 13 que con relación a la concentración de sacarosa y del pH, la mayor respuesta de lipasa se obtuvo al utilizar la mayor concentración dada para sacarosa (1 %) y el nivel medio de pH (8), en cambio con la concentración menor de sacarosa y el mismo nivel de pH se obtuvo la menor actividad de lipasa.

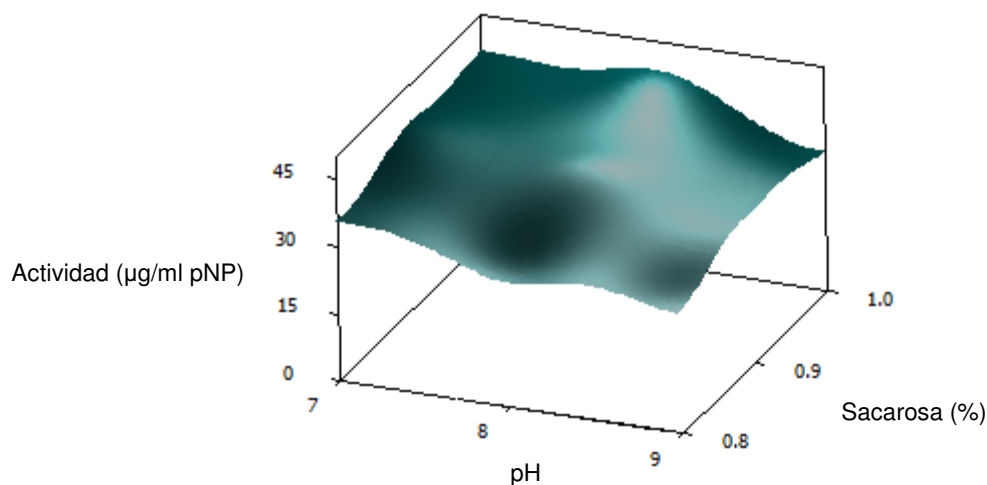


Figura 13. Superficie de respuesta para actividad de lipasa de *Pseudomonas* sp. en presencia de n-hexano con relación a la concentración de sacarosa (%) y pH, después de cinco días de incubación en oscuridad a 180 rmp y 28° C.

En el caso de la relación del efecto del pH y concentración de hidrocarburo (Figura 14) sobre la actividad de enzima lipasa, la mayor respuesta se obtuvo al usar la mayor concentración de n-hexano (1830 ppm) y pH (8), mientras que la menor actividad se obtuvo en el mismo nivel de pH pero con la concentración media del hidrocarburo (1570 ppm).

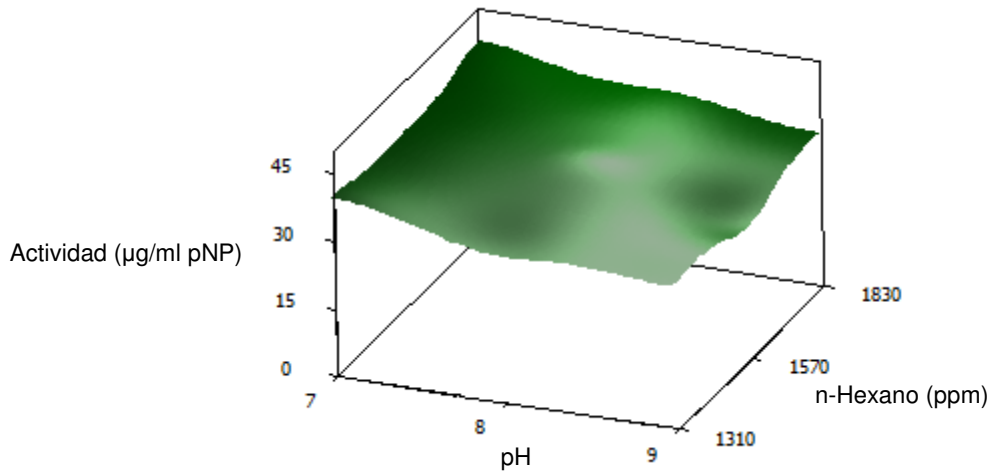


Figura 14. Superficie de respuesta para actividad de lipasa de *Pseudomonas* sp. en presencia de n-hexano con relación a la concentración del hidrocarburo (ppm) y pH, después de cinco días de incubación en oscuridad a 180 rpm y 28° C.

En la Figura 15 se muestra la superficie de respuesta para actividad lipasa con relación a la variable de concentración de sacarosa y del hidrocarburo, donde la mayor actividad de lipasa se alcanzó al emplear la mayor concentración de sacarosa (1 %) y la mayor concentración de n-hexano. En contra parte la menor respuesta se dio en la concentración más baja de sacarosa empleada (0.8 %) y la menor concentración del alifático (1310 ppm). También se percibe en la Figura 15 que la respuesta de lipasa disminuye con respecto a la concentración de la fuente alterna de carbono (sacarosa).

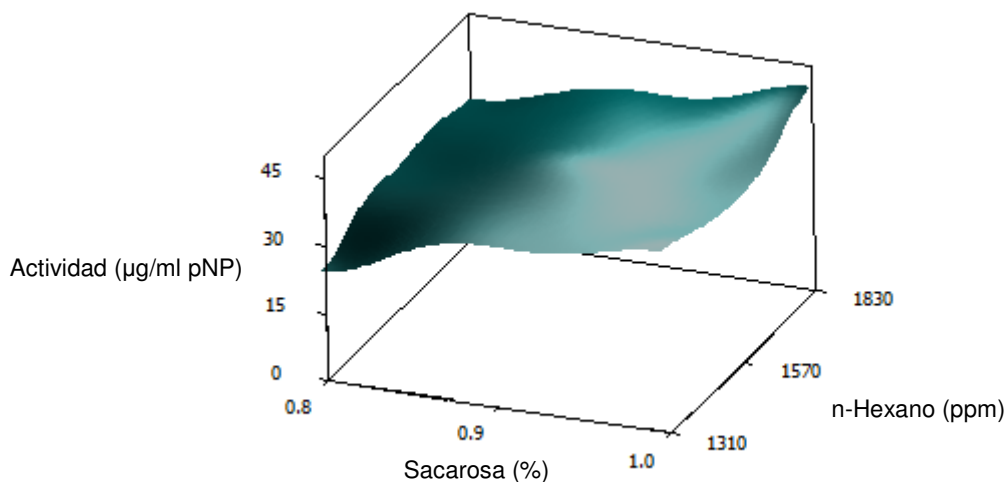


Figura 15. Superficie de respuesta para actividad de lipasa de *Pseudomonas* sp. en presencia de n-hexano con relación a la concentración del hidrocarburo (ppm) y concentración de sacarosa (%), después de cinco días de incubación en obscuridad a 180 rpm y 28° C.

Conforme a lo obtenido por el análisis estadístico (ANOVA) para las superficies de respuesta relacionadas con el efecto del pH, concentración de sacarosa y de n-hexano sobre la actividad de enzima lipasa en la cepa de *Pseudomonas* sp., las variables que tuvieron un efecto significativo sobre la respuesta de actividad enzimática fueron la concentración de sacarosa ($p < 0.0137$) y del pH ($p < 0.0246$), mientras que la variable de concentración del alifático n-hexano no tuvo un efecto significativo ($p > 0.2978$).

Finalmente, las condiciones que tuvieron un efecto significativo sobre la respuesta de la actividad de la enzima lipasa en la cepa de *Pseudomonas* sp. cultivadas en los diferentes hidrocarburos analizados fueron diferentes para cada uno. Sin embargo, el nivel de pH tuvo efecto significativo en los tres diseños Box-Behnken realizados. En la Tabla 5 se muestran los valores de cada variable en los que se obtuvieron las mayores y menores actividades de enzima lipasa para cada hidrocarburo empleado. Gupta *et al.* (2004) describen que las lipasas actúan en amplios rangos de pH (desde 6.8 a 10.6) y que esta variable juega un rol importante en la producción de lipasas en diversos microorganismos.

Tabla 5. Valores de cada variable independiente y los valores máximo y mínimo de actividad de enzima lipasa observados para los tres hidrocarburos analizados.

Hidrocarburo	pH	Concentración de sacarosa (%)	Concentración del hidrocarburo (ppm)	Actividad de lipasa ($\mu\text{g pNP/ml}$)
1,2,3,4-tetrahidronaftaleno	7	0.9	1170	48.10
	8	1.0	2730	1.27
Butil-benceno	7	0.9	860	36.86
	9	0.9	860	6.33
n-Hexano	8	1.0	1830	45.43
	8	0.8	1300	25.43

Al analizar los tres diseños experimentales, se plantea entonces que las diversas concentraciones de una fuente alterna de carbono, como sacarosa, de pH y de hidrocarburo que favorecen en la actividad de la enzima lipasa, son de alta especificidad para cada compuesto de hidrocarburo que esté bajo un proceso de degradación por la cepa de *Pseudomonas* sp. Por lo que se señala nuevamente, que es necesario un replanteamiento de la actividad de esta enzima usada como una herramienta de biomarcación en la degradación de compuestos aromáticos y alifáticos, como lo propusieron Margesin *et al.* (1999), ya que el tipo de hidrocarburo es determinante para su inducción.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 Conclusiones

- La expresión de la actividad lipasa en la cepa de *Pseudomonas* sp. está asociada a la concentración y tipo de hidrocarburo empleado. Así como la presencia de surfactante y/o una fuente alterna de carbono.
- La presencia del surfactante Triton X-100 tuvo un efecto favorecedor en la expresión de lipasa en butil-benceno, 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno, 9,10-dimtilantraceno, n-hexano y benceno.
- La presencia de una fuente alterna de carbono (sacarosa) inhibió la actividad de lipasa en 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno, butil-benceno y 9,10-dimetilantraceno.
- La presencia del surfactante no iónico (Triton X-100) y de la sacarosa, provocaron efectos sinérgicos en las cinéticas de crecimiento de la cepa de *Pseudomonas* sp. cultivada en butil-benceno y 1,2,3,4-tetrahidronafteno. Mientras que el efecto de la concentración de sacarosa y de 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno fue significativo sobre la expresión de la enzima lipasa. En butil-benceno la variable del pH fue el factor que influyó en la actividad enzimática. Para n-hexano tanto la concentración de sacarosa y el pH y repercutieron en dicha expresión enzimática.
- No se siguiere el uso de la actividad de enzima lipasa como herramienta de biomarcación en los procesos de biodegradación en la cepa de *Pseudomonas* sp. de compuestos aromáticos y alcanos.

7.2 Recomendaciones

- Caracterizar mediante electroforesis en gel desnaturalizante (SDS-PAGE) las lipasas producidas por la cepa de *Pseudomonas* sp al utilizar compuestos aromáticos y alcanos como únicas fuentes de carbono y con fuentes alternas de energía.

- Determinar la concentración residual de hidrocarburos mediante cromatografía de gases (CG) y caracterizar los compuestos (CG-EM). Además de caracterizar la modificación de enlaces mediante espectroscopia infrarroja (IR), y con ello proponer una ruta de degradación y los compuestos resultantes de la degradación de compuestos aromáticos y alcanos por lipasas de *Pseudomonas* sp.
- Obtener lipasa en crudo para emplearla directamente sobre los hidrocarburos y con esto evaluar la acción de la enzima sobre el compuesto, la velocidad de reacción y su efectividad como alternativa para la degradación de hidrocarburos.

8. BIBLIOGRAFÍA

Angene International. 2010. <http://an-gene.com/index.php> Products <http://an-gene.com/products.php> Consultado en línea el 14 de marzo de 2011.

Ash I. & Ash M. 2004. *Handbook of green chemicals*. Compilation. 2a. Edition. Synapse Info Resurces. Estados Unidos de América.

Aulton M.E. 2004. *Farmacía: ciencia y diseño de formas farmacéuticas*. 2ª. Edición. Elsevier. España.

Beyer H., Mur J.B., Walter W. 1986. *Manual de química orgánica*. Reverte. España. Benavides L. de M. J., Quintero, G., Guevara V., A.L., Jaimes C., D.C., Gutiérrez R. S.M., Miranda G. J. 2006. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. Nova – Publicación Científica Vol. 4 Núm. 5 Enero – Junio de 2006:1 – 116. http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/ARTREVIS1_5.pdf Consultado en línea el 22 de junio de 2010.

Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB). 2011. The Board of Regents of the University of Wisconsin System. www.bmrwisc.edu/Bmse000530 1,2,3,4-tetrahydronaphthalene at BMRB http://www.bmrwisc.edu/metabolomics/mol_summary/?molName=1_2_3_4_tetrahydronaphthalene Consultado en línea el 11 de marzo de 2011.

Boekema B.H.L., Beselin A., Breuer M., Hauer B., Koster M., Rosenau F., Jaeger K.-E., Tommanssen J. 2007. Hexadecane and tween 80 stimulate lipase production in *Burkholderia glumae* by different mechanisms. *Applied and Environmental Microbiology* 73:3838-3844.

Bouchez M., Blanchet D., Vandecasteele J.-P. 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolismo. *Appl Microbiol Biotechnol* 45:156-164.

Breuil C. Shindler D.B., Sijher J.S. & Kushner D.J. 1977. Stimulation of lipase production during bacterial growth on alkanes. *Journal of Bacteriology*. Vol. 133,2: 601-606.

Buchon L. Laurent P., Gounot A.M., Guespin M.J.F.2000. Temperature dependence of extracellular enzyme production by psychrotrophic and psychrophilic bacteria. *Biotechnol Lett* 22:1577-1581.

Budzinski H., Nadalig T., Raymond N., N'Matuzahroh., Gilewicz M. 2000. Evidence of two metabolic pathways for degradation of 2-methyl-phenanthrene by *Shingomonas* sp. strain (2MPLI). *Environ Toxicol Chem* 19: 2672-2677.

Cabrera-Cruz R.B.E., Gordillo M. A.J., Cerón B. A. 2003. Inventario de contaminación emitida a suelo, agua y aire en 14 municipios del estado de Hidalgo, México. *Rev. Int, Contam. Ambient.* 19 (4) 171-181, <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/370/37019402.pdf> Consultado en línea el 18 de mayo de 2010.

Cerniglia C.E. 1984. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Adv Appl Microbiol* 30: 31-71.

Cervantes-González E., Rojas-Avelizapa N.G., Cruz-Caramillo R., García-Mena J., Rojas-Avelizapa L.I. 2008. Oil-removal enhancement in media with keratinous or chitinous wastes by hydrocarbon-degrading bacteria isolated from oil-polluted soils. *Environ Technol* 29:171-182.

Chauhan A.K., Varma A.2009. *A textbook of molecular biotechnology*. I.K. International Pvt Ltd. India.

chemBlink . 2011. www.chemblink.com/index.htm Butylbenzene, n-Butylbenzene, 1-Phenylbutane, 104-51-8. <http://www.chemblink.com/products/104-51-8.htm> Consultado en línea el 11 de marzo de 2011.

ChemExper Inc. Chemical Directory: catalog of chemical and suppliers. 2011. <http://www.chemexper.com/> 1,2,3,4-Tetrahydronaphthalene

<http://www.chemexper.com/chemicals/supplier/cas/119-64-2.html>. Consultado en línea el 11 de marzo de 2011.

ChemExper Inc. Chemical Directory: catalog of chemical and suppliers. 2011.
<http://www.chemexper.com/> 9,10-Dimethylantracene.
<http://www.chemexper.com/chemicals/supplier/cas/781-43-1.html> Consultado en línea el 12 de marzo de 2011.

ChemicalBook, 2010. www.chemicalbook.com 9,10-DIMETHYLANTRACENE
http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB3433315.htm
Consultado en línea el 12 de marzo de 2011.

Chen S.H. Aitken M.D. 1999. Salicylate stimulates the degradation of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas saccharophila* P15. *Environ Sci Technol* 33:435-439.

Cheng Q., Thomas S.M., Rouviere P. 2002. Biological conversion of cyclic alkanes and cyclic alcohols into dicarboxylic acids: biochemical and molecular basis. *Appl Microbiol Biotechnol* 58: 704-711.

Chillcott R.P. 2006. Compendium of Chemical Hazards: Kerosene (Fuel Oil). Version 1. Health Protection Agency (HPA). Chemical Hazards and Poisons Division (CHAPD HQ). Reino Unido. www.who.int/ipcs/emergencies/kerosene.pdf

Conti M.E. 2008. *Biological monitoring: theory & applications: bioindicators and biomarkers for environmental quality and human exposure assessment*. Volume 17, Sustainable World. WIT Press. Gran Bretaña.

Del rio J.L., Serra P., Valero F. *et al.* 1990. Reaction scheme of lipase production by *Candida rugosa* by a biochemical engineering approach. *Chemistry and Physics of Lipids* 93:131-142.

Des Abbayes H., Chadefaud M., Feldmann J., De Ferré Y., Gausson H., Grassé P.P., Prévot A.R. 1999. *Botánica. Vegetales inferiores*. 2da. Edición. Editorial Reverte. Barcelona, España.

Dutta T.K., Haramaya S. 2001. Biodegradation of *n*-alkylcycloalkanes and *n*-alkylbenzenes via new pathways in *Alcanivorax* sp. strain MBIC 4326. *Appl Environ Microbiol* 67:1970-1974.

Egli T. 1995. The ecological and physiological significance of the growth of heterotrophic microorganisms with mixtures of substrates. *Adv Microb Ecol* 14:305-386.

Egli T. 2002. Microbial degradation of pollutants at low concentrations and in the presence of alternative carbon substrates: emerging patterns. *En Agathos* S.N. Reineke W. (Eds.), *Focus on Biotechnology. Biotechnology for the Environment: Strategy and Fundamentals*, vol. 3A. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 131:139.

Ferrera-Cerrato R., Rojas-Avelizapa N.G., Poggi-Varaldo H.M., Alarcón A., Cañizares-Villanueva R.O. 2006. Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Vol.48, No. 2. Abril- Junio 2006 pp. 179-187.

Formerly West Coast Analytical Service (WASC) and Bodycote Testing Group, 2005. <http://www.wcaslab.com/default.htm> Analysis of DEHP for California Proposition 65 <http://www.wcaslab.com/tech/dehp.htm> Consultado en línea el 12 de marzo de 2011.

Fouassier J.P. 1998. *Photoinitiated polymerisation: theory and applications*. Rapra review reports. Volumen 100 de Rapra report. iSmithers Rapra Publishing. Reino Unido.

Fraume R., N.J. 2007. *Diccionario ambiental*. Ecoe ediciones.

Gilbert E.J. 1993. *Pseudomonas* lipase: biochemical properties and molecular cloning. *Enzyme Microb Technol* 15:634-645.

Goswami P. & Singh H.D. 1991. Different modes of hydrocarbon uptake by two *Pseudomonas* species. *Biotechnol Bioeng* 37:1-11.

Goyal A.K., Zylstra G.J., 1996. Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GZ39. *Appl Environ Microbiol* 62:230-236.

Gupta R., Gupta N., Rathi P. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology Biotechnology*. 64:763-781.

Haritash A.K. & Kaushik C.P. 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of Hazardous Materials*. 169: 1-15.

Hartman D.E. 1995. *Neuropsychological toxicology: identification and assessment of human neurotoxic syndromes*. 2a. Edition. Springer. Estados Unidos de América.

Hernández M.J., Floriano B., Ríos J.J., Santero E. 2002. Identification of a hydratase and a class II aldolase involved in biodegradation of the organic solvent tetralin. *Applied and Environmental Microbiology* 68:4841-4846.

Holland H.L. 2000. Stereoselective hydroxylation reactions, pp 131-152. En Patel R.N. (Ed.), *Stereoselective biocatalysis*. Marcel Dekker, New York, N.Y. Estados Unidos.

International Programme on Chemical Safety (IPCS) INCHEM, Canadian Centre for Occupational Health and Safety (CCOHS), 2001. www.inchem.org BENZENE <http://www.inchem.org/documents/icsc/icsc/eics0015.htm> Consultado en línea el 12 de marzo de 2011.

International Programme on Chemical Safety (IPCS) INCHEM, Canadian Centre for Occupational Health and Safety (CCOHS), 2001. www.inchem.org BENZOIC ACID <http://www.inchem.org/documents/icsc/icsc/eics0103.htm> Consultado en línea el 12 de marzo de 2011.

International Programme on Chemical Safety (IPCS) INCHEM, Canadian Centre for Occupational Health and Safety (CCOHS), 2001. www.inchem.org KEROSENE <http://www.inchem.org/documents/icsc/icsc/eics0663.htm> Consultado en línea el 12 de marzo de 2011

International Programme on Chemical Safety (IPCS) INCHEM, Canadian Centre for Occupational Health and Safety (CCOHS), 2001. www.inchem.org n-HEXANE <http://www.inchem.org/documents/icsc/icsc/eics0279.htm> Consultado en línea el 12 de marzo de 2011.

International Programme on Chemical Safety (IPCS) INCHEM, Canadian Centre for Occupational Health and Safety (CCOHS). www.inchem.org PYRIDINE <http://www.inchem.org/documents/icsc/icsc/eics0323.htm> Consultado en línea el 12 de marzo de 2011.

International Programme on Chemical Safety (IPCS) INCHEM, Canadian Centre for Occupational Health and Safety (CCOHS), 2001. www.inchem.org TOLUENE <http://www.inchem.org/documents/icsc/icsc/eics0078.htm> Consultado en línea el 14 de marzo de 2011.

Jaeger K., Schneidinger B., Rosenau F., Werner M., Lang D., Dijkstra B.W. et al. 1997. Bacterial lipases for biotechnological applications. *J Mol Catalysis B: Enzymatic* 3:3-12.

Johnsen A.R., Wick L.Y., Harms H. 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*. 133:71-84.

Joseph B., Ramteke P.W., Thomas G. 2008. Cold active microbial lipases: some hot issues and recent developments. *Biotechnology Advances* 26:457-470.

Juhasz A.L., Stanley G.A., Britz M.L. 2002. Metabolite repression inhibits degradation of benzo[a]pyrene and debenz[a, h] anthracene by *Stenotrophomonas maltophilia* VUN 10,003. *Ind Microbiol Biotechnol* 28: 88-96.

Kämpfer P., Steiof M., Becker P.M., Dott W. 1993. Characterization of chemoheterotrophic bacteria associated with the in situ bioremediation of a waste-oil contaminated site. *Microb Ecol* 26:161-188.

Kanali R.A. & Harayama S. 2000. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology* Vol. 182; 8: 2059-2067.

Khan F.I., Husain T., Hejazi R. 2004. An overview and analysis of site remediation technologies. *Journal of Environmental Management* 71: 95-122.

Kim E. & Zylstra G.J. 1999. Functional analysis of genes involved in biphenyl, naphthalene, phenanthrene, and m-xylene degradation by *Shingomonas yanoikuyae* B1. *J Ind Microbiol Biotechnol* 23: 294-302.

Kireeva N.A., Tarasenko E.M., Shamaeva A.A., Novoselova E.I. 2006. Effect of oil and oil products on lipase activity in gray forest soil. *Eurasian Soil Science*. Vol. 39, 8: 905-910.

Koleske J.V. 1995. *Paint and coating testing manual: fourteenth edition of the Gardner-Sward handbook*. 14a. Edition. ASTM International. Estados Unidos de América.

Li J.L. & Chen B.H. 2009. Surfactant-mediated biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Materials* 2:76:94.

Lin S.-F., Chiou C.-M., Tsai Y.-C. 1995. Effect of triton X-100 on alkaline lipase production by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Biotechnology Letters*. 17 (9):959-962.

Macrae A.R. 1983. Extracellular microbial lipases. En: Forgyarty WH (Ed.) 1983. *Microbial enzymes and biotechnology*. New York: Applied Science Publishers pp. 225-250.

Maeda T., Takahashi Y., Suenaga H., Suyama A., Goto M., Furukawa K. 2001. Functional analyses of Bph-Tod hybrid dioxigenase, which exhibits high degradarion activity toward trichloroethylene. J Biol Chem 276: 29833-29838.

Mahajan M.C., Phale P.S., Vaidyanathan C.S. 1994. Evidende for the involvement of multiple pathways in the biodegradation of 1- and 2-methylnaphthalene by *Pseudomonas putida* CSV86. Arch Microbiol 161: 425-433.

Makhzoum A., Knapp J.S., Owusu R.K. 1995. Factor affecting growth and lipase production by *Pseudomonas fluorescens* 2D. Food Microbiol 12:277-290.

Malia M.P. & Cloete, T.E. 2005. The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants-perspective for monitoring hydrocarbon contamination: a review. International Biodeterioration & Biodegradation 55: 1-8.

Margesin R. & Schinner F. 1997. Efficiency on indigenou and inoculated cold-adapted soil microorganisms for biodegradation of diesel oil in alpine soils. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 67, 7: 2660-2664.

Margesin R., Zimmerbauer A., Schinner F. 1999. Soil lipase activity – a useful indicator of oil biodegradation. Biotechnology Techniques 13: 859-863.

Margesin R. & Schinner F. 2001. Bioremediation (Natural attenuation and biostimulation) of dieses-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 67, 7: 3127-3133.

Margesin R., Labbé D., Schiner F., Greer C.W., Whyte L.G. 2003. Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soil. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 69, 6: 3085-3092.

Margesin R., Gander S., Zacke G., Gounot A.M., Schinner F. 2003b. Hydrocarbon degradation and enzyme activities of cold-adapted bacterial and yeasts. Extremophiles. 7: 451-458.

Margesin R., Hämmerle M., Tschërko D. 2007. Microbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil-contaminated soil: effects of

hydrocarbon concentration, fertilizers and incubation time. *Microbial Ecology*. 53: 259-269.

Mastrangelo M., Topalian M., du Mortier C., Fernandez Cirelli A., 2005. Coeficientes de partición de hidrocarburos aromáticos policíclicos con sustancias húmicas: un método simple para su determinación. *Revista de Toxicología. Asociación Española de Toxicología*. 22, 003: 169-174.

McLellan S.L., Warshawsky D., Shann J.R. 2002. The effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on de degradarion of benzo[a]pyrene by *Mycobacterium* sp. strain RJGII-135. *Environ Toxicol Chem* 21:253-259.

McMurry J. 2008. *Química orgánica/Organic Chemistry*. 7a. Edición. Cengage Learning Editores. México.

Molina M., Araujo R., Hodson R.E. 1999. Cross-induction of pyrene and phenanthrene in a *Mycobacterium* sp. isolated from polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated river sediments. *Can J Microbiol* 45: 520-529.

Moody J.D., Freeman J.P., Doerge D.R., Cerniglia C.E. 2001. Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. *Appl Environ Microbiol* 67:1476-1483.

Murhejee S., Bardolui N.K., Karim S., Patnaik W, Nandy R.K. & Bag P.K. 2010. Isolation and characterization of a monoaromatic hydrocarbon-degrading bacterium, *Pseudomona aeruginosa* from crude oil. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*. 45 (9): 1048-1053.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; 2011. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> 9,10-dimetylanthracene <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=13076> Consultado en línea el 12 de marzo de 2011.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; 2011. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> Benzoic Acid.

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=243> Consultado en línea el 12 de marzo de 2011.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; 2011. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> Toluene. http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=1140&loc=ec_rcs Consultado en línea el 14 de marzo de 2011.

National Library of Medicine (NLM) CCRIS Database. (Chemical Carcinogenesis Research Information System). 1991. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?CCRIS> 9, 10-DIMETHYLANTHRACENE. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+ccris:@term+@rn+781-43-1> Consultado en línea el 22 de marzo de 2011.

National Library of Medicine (NLM) CCRIS Database. (Chemical Carcinogenesis Research Information System). 2009. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?CCRIS> BENZENE <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~om1RNI:1> Consultado en línea el 23 de marzo de 2011.

National Library of Medicine (NLM) CCRIS Database. (Chemical Carcinogenesis Research Information System). 1991. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?CCRIS> BENZOIC ACID <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~uTv2DC:1> Consultado en línea el 23 de marzo de 2011.

National Library of Medicine (NLM) CCRIS Database. (Chemical Carcinogenesis Research Information System). 2010. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?CCRIS> JP-5 NAVY FUEL <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~RG8lqT:1> Consultado en línea el 22 de marzo de 2011.

National Library of Medicine (NLM) CCRIS Database. (Chemical Carcinogenesis Research Information System). 1995. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?CCRIS> N-HEXANE <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~l6kku7:1> Consultado en línea el 22 de marzo de 2011.

National Library of Medicine (NLM) CCRIS Database. (Chemical Carcinogenesis Research Information System). 1991. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?CCRIS> PYRIDINE <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+110-86-1> Consultado en línea el 23 de marzo de 2011.

National Library of Medicine (NLM) CCRIS Database. (Chemical Carcinogenesis Research Information System). 2008. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?CCRIS> STRAIGHT-RUN KEROSINA <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~RG8lqT:2> Consultado en línea el 22 de marzo de 2011

National Library of Medicine (NLM) CCRIS Database. (Chemical Carcinogenesis Research Information System). 2009. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?CCRIS> TETRAHYDRONAPHTHALENE <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search> Consultado en línea el 22 de marzo de 2011.

National Library of Medicine (NLM) CCRIS Database. (Chemical Carcinogenesis Research Information System). 2010. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?CCRIS> TOLUENE <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~SsO8A2:1> Consultado en línea el 23 de marzo de 2011.

National Research Council (NRC). 2002. Natural Attenuation for Groundwater Remediation. Committee on Intrinsic Remediation, Water Science and Technology Board, Board on Radioactive Waste Management, National Research Council. National Academy of Sciences.

Pardo C. J.L., Perdomo R. M.C., Benavides L. de M. J. 2004. Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. Nova – Publicación científica Vol. 2 No. 2 Enero – Diciembre de 2004: 1 -108.

Pellini L. 2006. Biorremediación estimulada por efluentes cloacales tratados de suelos contaminados con hidrocarburos. Escuela Superior de Salud y Ambiente.

Departamento de Química de la Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional del Comahue. <http://www.tesis.bioetica.org/lp1.htm> Consultado en línea el 22 de junio de 2010.

Pikovskii Y.I. 1993. Natural and Technogenic hydrocarbon fluxes in the environment. Mosk Gos Univ.

Powell S.N., Singleton D.R., Aitken M.D. 2008. Effects of enrichment with salicylate on bacterial selection and PAH mineralization in a microbial community from a bioreactor treating contaminated soil. *Environmental Science and Technology*. No. 11, 42: 4099-4105.

Repetto M., Repetto Kuhn G. 2009. *Toxicología fundamental*. 4a. Edición. Ediciones Díaz de Santos. Madrid, España.

Romine M.F., Fredrickson J.K., W. Li S.-M. 1999. Induction of aromatic catabolic activity in *Sphingomonas aromaticivorans* strain F199. *J Ind Microbiol Biothechnol* 23:303-313.

Romine M.F., Stillwell L.C., Wong K.-K. Thurston S.J., Sisk E.C., Sensen C., Gaasterland T., Fredrickson J.K., Saffer J.D. 1999b. Complete sequence of 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. *J Bacteriol* 181:1585-1602.

Sabaté J., Grifoll M., Viñas M. Solanas A.M. 1999. Isolation and characterization of a 2-methylphenanthrene utilizing bacterium: identification of ring cleavage metabolites. *Appl Microbiol Biotechnol* 52:704-712.

Saudi Basic Industries Corporation (SABIC) 2011. <http://www.sabic.com/> DOP (Diocetyl Phthalate) <http://www.sabic.com/me/en/productsandservices/chemicals/dop.aspx> Consultado en línea el 11 de marzo de 2011.

ScienceLab.com. 2010. MSDS for 1,2,3,4-Tetrahydronaphthalene. www.sciencelab.com/xMSDS-1_2_3_4_Tetrahydronaphthalene-9927295
Consultado en línea el 6 de abril de 2011.

ScienceLab.com. 2010. MSDS for Indene. www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9924356 Consultado en línea el 6 de abril de 2011.

Sigma-Aldrich. 2009. Material safety data sheet. 9,10-Dimethylantracene. www.sigma-aldrich.com Consultado en línea el 6 de abril de 2011.

Sigma-Aldrich. 2010. Material safety data sheet. Butylbenzene. www.sigma-aldrich.com Consultado en línea el 6 de abril de 2011.

Sigma-Aldrich. 2010. Material safety data sheet. Butylbenzoate. www.sigma-aldrich.com Consultado en línea el 6 de abril de 2011.

Sigma-Aldrich. 2011. Material safety data sheet. Dioctyl phthalate. www.sigma-aldrich.com Consultado en línea el 6 de abril de 2011.

Sikkema J. & de Bont J.A.M. 1993. Metabolism of tetralin (1,2,3,4-tetrahydronaphthalene) in *Corynebacterium* sp. strain C125. *Applied and Environmental Microbiology* 59:567-572.

Singh R., Gupta N., Goswami V.K., Gupta R. 2006. A simple activity staining protocol for lipases and esterases. *Appl Microbiol Biotechnology*. 70: 679-682.

Stringfellow W.T. & Aitken M.D. 1995. Competitive metabolism of naphthalene, methylnaphthalenes, and fluorene by phenanthrene-degrading pseudomonads. *Appl Environ Microbiol* 61:357-362.

The Physical and Theoretical Chemistry Laboratory. Oxford University. Material Safety Data Sheet (MSDS) Safety Officer in Physical Chemistry at Oxford University .2007. <http://msds.chem.ox.ac.uk/> Safety (MSDS) data for butylbenzene <http://msds.chem.ox.ac.uk/BU/butylbenzene.html> Consultado en línea el 11 de marzo de 2011.

The Physical and Theoretical Chemistry Laboratory. Oxford University. Material Safety Data Sheet (MSDS) Safety Officer in Physical Chemistry at Oxford University .2008. <http://msds.chem.ox.ac.uk/> Safety (MSDS) data for dioctyl phthalate http://msds.chem.ox.ac.uk/DI/dioctyl_phthalate.html Consultado en línea el 11 de marzo de 2011.

The Physical and Theoretical Chemistry Laboratory. Oxford University. Material Safety Data Sheet (MSDS) Safety Officer in Physical Chemistry at Oxford University .2008. <http://msds.chem.ox.ac.uk/> Safety (MSDS) data for indene <http://msds.chem.ox.ac.uk/IN/indene.html> Consultado en línea el 14 de marzo de 2011.

United States Environmental Protection Agency (EPA) 2011. http://iaspub.epa.gov/sor_internet/registry/substreg/searchandretrieve/advancedsearch/search.do;jsessionid=19dad3908737dc0ef33dce529b552a51bd2f819dc926338f6c6e8d28d7ad722?details=displayDetails Consultado en línea el 11 de marzo de 2011.

van Beilen J.B., Wubbolts M.G., Witholt. 1994. Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*. *Biodegradation* 5:161-174.

van Beilen J.B., Panke S., Lucchini S., Franchini A.g., Röthlisberger M. Witholt. 2001. Analysis of *Pseudomonas putida* alkane degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the *alk* genes. *Microbiology* 147:1621-1630.

van Beilen J.B. & Witholt B. 2005. Diversity, function, and biocatalytic applications of alkane oxygenases pp. 259-275. *En* Ollivier B. & Magot (Eds.). *Petroleum microbiology*. ASM Press, Washington DC, Estados Unidos de América.

Van Hamme J.D., Singh A., Ward O.P. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and molecular biology reviews*. Vol. 67, 4: 503-549.

Vázquez B. A. 2005. *Golfo de México: contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias*. 2a. Edición. Univ. J. Autónoma de Tabasco. México.

Vila J, López Z., Sabat J., Minguillón C., Solanas A.M., Grifoll M. 2001. Identification of a novel metabolite in the degradation of pyrene by *Mycobacterium* sp. Strain AP1: actions of the isolate on two- and three-ring polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol* 67:5497-5505.

Vives I., Grimalt J.O., Guitart R. 2001. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos y la salud humana. *Apuntes de Ciencia y Tecnología. Asociación para el Avance de la Ciencia y la Tecnología en España (AACTE):* 2: 45-51.

Watanabe N. Ota Y., Minoda Y., Yamada K. 1977. Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganism, culture conditions and some properties of crude enzymes. *Agric Biol Chem* 41:1353-1358.

Wilson S.C. & Jones K.C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environmental Pollution.* 81: 229-249.

Yang Y., Chan R.F., Shiaris M.P. 1994. Metabolism of naphthalene, fluorene, and phenanthrene: preliminary characterization of a cloned gene cluster from *Pseudomonas putida* NCIB 9816. *J Bacteriol* 176:2158-2164.

ANEXO 1. HIDROCARBUROS UTILIZADOS

Se decidió trabajar con estos compuestos en base a lo descrito en Chilcott-HPA (2006), donde se enlistan los principales constituyentes del queroseno. Se eligió uno de cada clase para establecer cuál es el que está directamente implicado en la expresión de lipasa.

- **1,2,3,4-Tetrahidronaftaleno** (99% Sigma)

Sinónimos: naftaleno 1,2,3,4 tetrahídrido; Bacticin; benzociclohexano; solvente tetralin; tetraleno; (C4-C5) Alquiltetrahidronaftalenos (BMRB, 2011); tetranap.

Fórmula molecular: $C_{10}H_{12}$. Masa molecular: $132.20528 \text{ g mol}^{-1}$.

Punto de ebullición: 207°C

Punto de fusión: -35°C

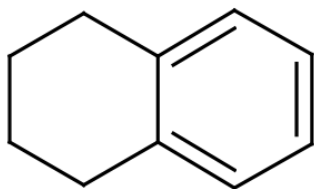
Densidad: 0.973 g cm^{-3} a 25°C .

Insoluble en agua.

Referencia CAS: 119-64-2.

Sistema de registro de sustancias EPA: Naftaleno, 1,2,3,4-tetrahidro-(119-64-2)

Estructura molecular:



Aplicaciones: solvente para grasas y aceites; sustituto de aguarrás en pulidores y pinturas, insecticida.

Toxicidad: puede resultar tóxico para riñones, hígado, piel, ojos, sistema nervioso central (ScienceLab.com, 2010).

Piel: irritación.

Ojos: irritación.

Ingestión: irritante.

Inhalación: irritante.

- **9,10-Dimetil antraceno (DMA) (99% Sigma).**

Sinónimos: ms-Dimetilantraceno.

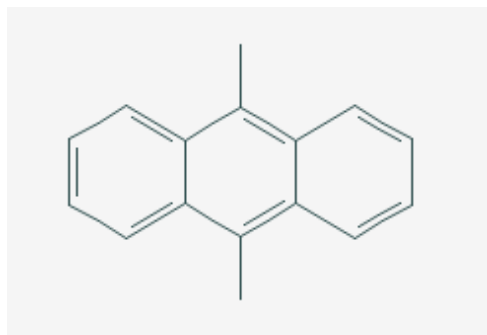
Fórmula molecular: $C_{16}H_{14}$. Masa molecular: $206.28716 \text{ g mol}^{-1}$.

Punto de ebullición:

Punto de fusión: $182.184 \text{ }^\circ\text{C}$.

Referencia CAS: 718-43-1.

Estructura molecular:



Aplicaciones: fotosensibilizador (Nelson *et al.*, 1994. En Fouassier 1998)

Toxicidad: mutagénico (*Ames Salmonella typhimurium*).

Piel: irritación.

Ojos: irritación.

Ingestión: perjudicial.

Inhalación: irritante. (Sigma-Aldrich, 2009).

- **Ácido benzoico**

Sinónimos: ácido bencenocarboxílico; carboxibenceno; ácido dracílico; E210.

Fórmula molecular: C_6H_5COOH . Masa molecular: $122.12 \text{ g mol}^{-1}$.

Punto de ebullición: $249 \text{ }^\circ\text{C}$.

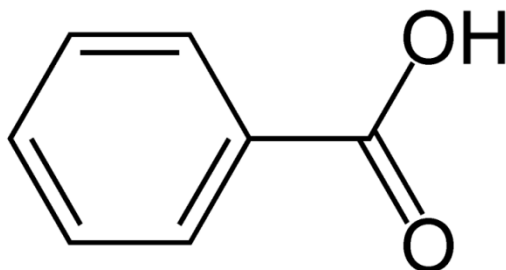
Punto de fusión: $122.35 \text{ }^\circ\text{C}$.

Densidad: 1.32 g cm^{-3} .

Insoluble en agua.

Referencia CAS: 65-85-0.

Estructura molecular:



Aplicaciones: aditivo en alimentos (inhibidor, retardador, represor de procesos de fermentación, acidificación u otros deterioros en alimentos)(PubChem).Plastificante; antimicrobiano; en perfumería; retardante de vulcanización para plásticos y látex; inhibidor de corrosión para emulsiones, pulidores, ceras, pinturas, detergentes, anticongelantes; estándar en química analítica; coestabilizador de calor para PVC; agregado de tabaco; en pasta de dientes; conservador en cosméticos (Ash & ASh, 2004).

Toxicidad: Exposición: Inhalación: Tos, resequedad.

Piel: Enrojecimiento, sensación de quemazón, comezón.

Ojos: Enrojecimiento. Dolor.

Ingesta: Dolor abdominal. Nausea. Vómito. (INCHEM, 1999).

- **Benceno**

Sinónimos: Benzol; Ciclohexatrieno.

Fórmula molecular: C_6H_6 . Masa molecular: 78.11 g mol^{-1} .

Punto de ebullición: $80 \text{ }^\circ\text{C}$

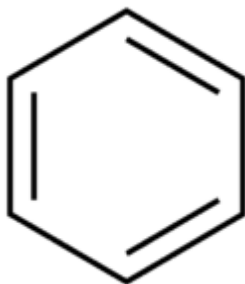
Punto de fusión: $6 \text{ }^\circ\text{C}$

Densidad: 0.8767 g cm^{-3} .

Insoluble en agua.

Referencia CAS: 71-43-2

Estructura molecular:



Aplicaciones: materia prima en la preparación de clorobenzenos, etilbenceno, dodecilbenzeno, ciclohexano, fenol, nitrobenzeno, cumeno, anhídrido maleico, colorantes, medicamentos, piel sintética, pinturas para aviones, lacas; solvente para ceras, resinas, aceites, pinturas, farmacéuticos; compuesto en proporción mínima de gasolina; solvente de extracción para lúpulo modificado para saborizantes de cervezas; en adhesivos de empaques de alimentos. Solvente en pinturas, barnices, gasolina. Parasiticida. (Bayer *et al.*, 1986; Ash & Ash 2004).

Toxicidad: Carcinogénico (ratón, humano, rata); mutagénico (Ames *Salmonella typhimurium*, UDS hepatocitos de rata, linfoma en ratón, médula ósea de ratón, linfocitos de bovino, linfocitos en humano; linfocitos de sangre periférica en humano, eritrocitos policromáticos de médula ósea en ratón, esplenocitos en ratón, linfocitos periféricos en humano, linfocitos periféricos en bovino, células CHL/IU en rata) (NLM, 2010).

Exposición: Inhalación: Mareos, somnolencia, dolor de cabeza, náusea, dificultad para respirar, convulsiones, pérdida del conocimiento.

Piel: Puede ser absorbido. Resequedad. Dolor.

Ojos: Enrojecimiento. Dolor.

Ingesta: Dolor abdominal, irritación, vómito. (INCHEM, 2003).

- **Butil-benceno (BB)** (>99.9% Sigma)

Sinónimos: n-Butilbenceno; 1- Fenilbutano (chemBlink, 2011); 1-1-butilbenceno (MSDS, 2011).

Fórmula molecular: C₁₀H₁₄. Masa molecular: 134.22 g mol⁻¹.

Punto de ebullición: 183 °C.

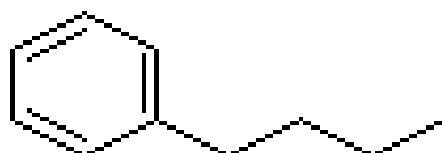
Punto de fusión: -88 °C.

Densidad: 0.86 g cm⁻³

Insoluble en agua.

Referencia CAS: 104-51-08

Estructura molecular:



Aplicaciones: estándar en CG para determinación de hidrocarburos no aromáticos totales e hidrocarburos aromáticos traza en compuestos aromáticos de alta pureza usados como intermediarios químicos (Koleske, 1995).

Toxicidad: Exposición: Piel: irritación.

Ojos: irritación.

Ingestión: perjudicial.

Inhalación: irritante. (Sigma-Aldrich, 2010).

- **Butil-benzoato (BUB)** (99% Sigma)

Sinónimos: butil benzoato (chemBlink, 2011); n-butyl-benzoato (chemexper, 2011).

Fórmula molecular: C₁₁H₁₄O₂. Masa molecular 178.23 g mol⁻¹.

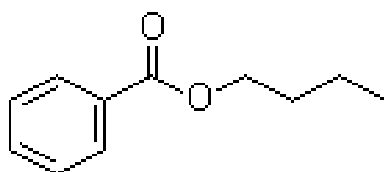
Punto de ebullición: 249 °C

Punto de fusión: -22 °C

Densidad: 1.008 g cm⁻³

Referencia CAS: 136-60-7.

Estructura molecular:



Aplicaciones: Solvente de éter de celulosa, emulsificadores, transportes; plastificante; ingrediente en perfumes; “facilitador” para colorantes textiles y poliéster; conservador en cosméticos; adhesivo en empaques de comida (Ash & Ash, 2004)

Toxicidad: Exposición: Piel: irritación.

Ojos: irritación.

Ingestión: perjudicial.

Inhalación: irritante. (Sigma-Aldrich, 2010).

- **Diocilftalato (DOP) (99% Sigma)**

Sinónimos: bis(2-etilhexil)ftalato; octoil; ácido ftálico bis(2-etilhexil) éster; 1,2-bencenocarboxil ácido dioctil éster; DEHP (MSDS, 2008).

Fórmula molecular: $C_{24}H_{38}O_4$. Masa molecular: $390.56 \text{ g mol}^{-1}$.

Punto de ebullición: $384 \text{ }^\circ\text{C}$

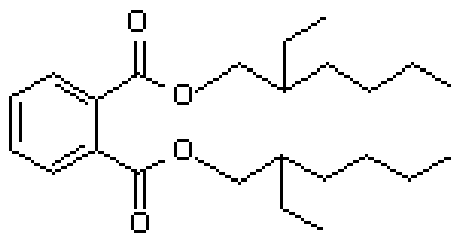
Punto de fusión: $-52 \text{ }^\circ\text{C}$

Densidad: .9861 a $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Insoluble en agua.

Referencia CAS: 117-81-07

Estructura molecular:



Aplicaciones: Plastificante; materia prima en la fabricación de guantes para análisis químicos.

Toxicidad: Puede provocar daños en fertilidad o en fetos.

Exposición: Piel: Irritación.

Ojos: Irritación. (Sigma-Aldrich, 2011).

- **Indeno** ($\geq 99\%$ Sigma)

Sinónimos: 1H-indeno; benzociclopentadieno; indonafteno.

Fórmula molecular: C_9H_8 . Masa molecular: $116.16 \text{ g mol}^{-1}$.

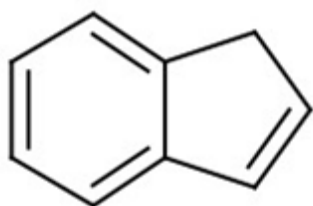
Punto de ebullición: $181 \text{ }^\circ\text{C}$.

Punto de fusión: $-5 \text{ a } -3 \text{ }^\circ\text{C}$.

Densidad: 0.992 g cm^{-3} .

Referencia CAS: 95-13-6

Estructura molecular:



Aplicaciones: preparación de resinas cumar (cumarona-indeno).

Toxicidad: puede resultar tóxico para riñones, hígado, bazo, tracto respiratorio superior, ojos, piel.

Piel: irritación.

Ojos: irritación.

Ingestión: irritante.

Inhalación: irritante. (ScienceLab.com, 2010).

- **n-hexano** (95% Tedia USA)

Sinónimos: hexano; hídrido hexil.

Fórmula molecular: C_6H_{14} . Masa molecular: 86.2 g mol^{-1} .

Punto de ebullición: $69 \text{ }^\circ\text{C}$

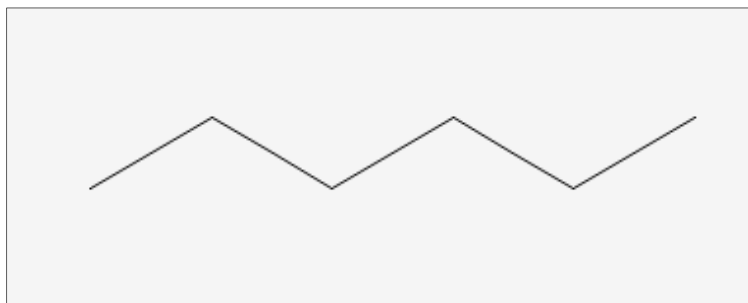
Punto de fusión: $-95 \text{ }^\circ\text{C}$

Densidad: 0.6548 g cm^{-3} .

Insoluble en agua.

Referencia CAS: 110-54-3.

Estructura molecular:



Aplicaciones: solvente en gasolinas, pegamentos, lacas (Hartman, 1995). En la industria alimenticia se usa para extraer aceites vegetales, en manufactura de perfumes, farmacéuticos, agentes limpiadores (Jorgensen & Cohn, 1981. En Hartman, 1995).

Toxicidad: Piel: Resequedad, enrojecimiento, dolor.

Ojos: Enrojecimiento, dolor.

Inhalación: Mareo, somnolencia, opacidad, dolor de cabeza, náusea, debilidad, inconsciencia.

Ingestión: Dolor abdominal.

- **Piridina** (99.9% Fermont)

Sinónimos: Azina; Azabenceno.

Fórmula molecular: C_5H_5N . Masa molecular: 79.1 g mol^{-1} .

Punto de ebullición: $115 \text{ }^\circ\text{C}$.

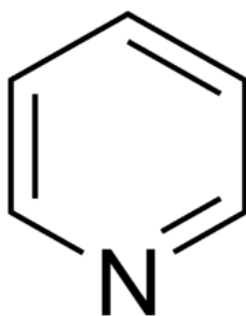
Punto de fusión: $-42 \text{ }^\circ\text{C}$.

Densidad: 0.9819 g cm^{-3} .

Soluble en agua.

Referencia CAS: 110-86-1.

Estructura molecular:



Aplicaciones: Se usa como disolvente de algunas sales inorgánicas y compuestos orgánicos. En las acilaciones con halogenuros de ácido ejerce una acción catalítica y elimina el halogenuro de hidrógeno que se libera. También se utiliza en la desnaturalización del etanol.

Toxicidad: Evidencia de carcinogénesis en animales (ratón) con relevancia desconocida en humanos (NLM, 1991).

Piel: Puede ser absorbido. Enrojecimiento, sensación de quemazón.

Ojos: Enrojecimiento, dolor.

Inhalación: Tos, mareos, dolor de cabeza, náusea, dificultad para respirar, inconsciencia.

Ingesta: dolor abdominal, diarrea, vómito, debilidad.

- **Queroseno** (Pozo petrolero en Tabasco, México)

Sinónimos: Querisona; petróleo ligero; aceite para lámpara; combustible no.1; parafina.

Punto de ebullición: 150 – 300 °C

Punto de fusión: -20 °C

Densidad: 0.78 – 0.81 g cm⁻³.

Insoluble en agua

Referencia CAS: 8008-20-6

Aplicaciones: disolvente de insecticidas, como piretrinas y butóxido de piperonilo (Aulton, 2004). Iluminación con lámparas. Combustible para aeronaves.

Toxicidad: carcinogénico (en ratón). Querosina: carcinogénico (ratón).(NLM, 1991)

Piel: Resequedad, enrojecimiento.

Ojos: Enrojecimiento.

Inhalación: confusión, tos, mareo, dolor de cabeza, ressequedad, inconsciencia.

Ingesta: Diarrea, náusea, vómito.

- **Tolueno** (99.9% J.T. Baker)

Sinónimos: Metilbenceno; fenilmetano; toluol.

Fórmula molecular: C_7H_8 . Masa molecular: 92.13842 16 $g\ mol^{-1}$.

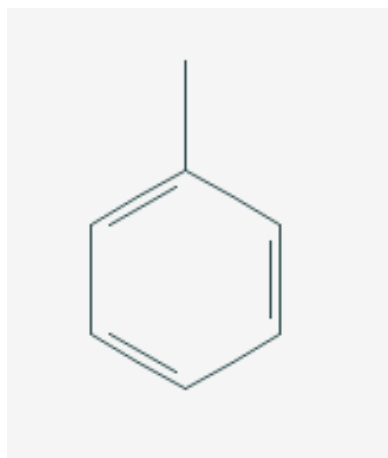
Punto de ebullición: 111 °C.

Punto de fusión: -95 °C.

Densidad: 0.87 $g\ cm^{-3}$.

Referencia CAS: 108-88-3.

Estructura molecular:



Aplicaciones: se utiliza como solvente; es producto intermedio en las síntesis industriales de trinitrotolueno, viniltolueno, ácido benzoico, sacarina y colorantes, entre otros (Bayer *et al.*, 1986.) cosméticos. Limpiador y desengrasante (Hartman, 1995).

Toxicidad: Puede actuar como anestésico, causar daños al sistema nervioso central. Causa adicción. Evitar exposición de mujeres embarazadas.

Piel: Resequedad, enrojecimiento.

Ojos: Enrojecimiento, dolor.

Inhalación: tos, ressequedad, mareo, somnolencia, dolor de cabeza, náusea, inconsciencia.

Ingesta: Sensación de quemazón, dolor abdominal.

ANEXO 2. Tabla de ANOVA obtenida por prueba de Fisher (F) con un intervalo de confianza (α) 0.1, para el diseño Box-Behnken del efecto de pH, concentración de sacarosa y concentración de 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno sobre la producción de lipasa de la cepa de *Pseudomonas* sp.

Tabla ANOVA					
Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados [Parcial]	Media Cuadrada [Parcial]	Tasa F	Valor P
Modelo	9	1464.3053	162.7006	3.4508	0.093
A:A	1	1.8188	1.8188	0.0386	0.852
B:B	1	579.6878	579.6878	12.2948	0.0172
C:C	1	57.6482	57.6482	1.2227	0.3192
AB	1	1.538	1.538	0.0326	0.8638
AC	1	345.3865	345.3865	7.3254	0.0425
BC	1	93.6219	93.6219	1.9857	0.2178
AA	1	27.4368	27.4368	0.5819	0.48
BB	1	313.0065	313.0065	6.6387	0.0496
CC	1	18.9505	18.9505	0.4019	0.554
Residual	5	235.7453	47.1491		
Falta de Ajuste	3	226.2859	75.4286	15.948	0.0596
Error Puro	2	9.4593	4.7297		
Total	14	1700.0505			

Tabla de ANOVA obtenida por prueba de Fisher (F) con un intervalo de confianza (α) 0.1, para el diseño Box-Behnken del efecto de pH, concentración de sacarosa y concentración de butil-benceno sobre la producción de lipasa de la cepa de *Pseudomonas* sp.

Tabla ANOVA					
Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados [Parcial]	Media Cuadrada [Parcial]	Tasa F	Valor P
Modelo	9	1234.3096	137.1455	2.0872	0.2162
A:A	1	3.1681	3.1681	0.0482	0.8349
B:B	1	694.2203	694.2203	10.5654	0.0227
C:C	1	42.5408	42.5408	0.6474	0.4576
AB	1	264.3819	264.3819	4.0237	0.1012
AC	1	4.7771	4.7771	0.0727	0.7982
BC	1	30.2068	30.2068	0.4597	0.5279
AA	1	24.4532	24.4532	0.3722	0.5685
BB	1	167.0474	167.0474	2.5423	0.1717
CC	1	4.8686	4.8686	0.0741	0.7963
Residual	5	328.5342	65.7068		
Falta de Ajuste	3	284.0354	94.6785	4.2553	0.1961
Error Puro	2	44.4988	22.2494		
Total	14	1562.8438			

Tabla de ANOVA obtenida por prueba de Fisher (F) con un intervalo de confianza (α) 0.1, para el diseño Box-Behnken del efecto de pH, concentración de sacarosa y concentración de n-hexano sobre la producción de lipasa de la cepa de *Pseudomonas* sp.

Tabla ANOVA					
Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados [Parcial]	Media Cuadrada [Parcial]	Tasa F	Valor P
Modelo	9	429.3242	47.7027	3.2024	0.1065
A:A	1	206.0868	206.0868	13.835	0.0137
B:B	1	150.5145	150.5145	10.1044	0.0246
C:C	1	20.1033	20.1033	1.3496	0.2978
AB	1	1.0893	1.0893	0.0731	0.7976
AC	1	0.55	0.55	0.0369	0.8552
BC	1	0.1182	0.1182	0.0079	0.9325
AA	1	42.5662	42.5662	2.8576	0.1517
BB	1	10.1935	10.1935	0.6843	0.4458
CC	1	0.0938	0.0938	0.0063	0.9398
Residual	5	74.48	14.896		
Falta de Ajuste	3	60.1139	20.038	2.7896	0.2749
Error Puro	2	14.3661	7.1831		
Total	14	503.8042			