

INTRODUCCION

Un problema general de la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) es la lenta velocidad de degradación, debido a la tendencia de estos compuestos no polares a ser adsorbidos a la materia orgánica del suelo.

El establecimiento de nichos bacterianos degradadores de PAH en suelos crónicamente contaminados es un proceso influenciado por la forma en que los PAH se encuentran en suelo y por la capacidad de los microorganismos de desarrollar estrategias adaptativas a la baja disponibilidad del hidrocarburo.

La inoculación con microorganismos obtenidos por enriquecimiento en sistemas con fase sólida, podría ser una estrategia promisoría aplicable a suelos crónicamente contaminados.

MODELO DE ESTUDIO: Amberlita XAD2 (Sigma) (copolímero de poliestireno con reticulado hidrofóbico), en medio mineral líquido (MML).

Capacidad de adsorción del soporte: 10,87 mg de fenantreno/g.

Concentración final de fenantreno: 1000 mg/l

Monitoreo por recuentos en agar R3, y espectroscopía FT-IR.

Cada cepa (C1, C2, C3 y C4) individualmente y en consorcio definido (CD) fueron inoculadas en cultivo batch de MML con XAD2-fenantreno 1700ppm como única fuente de C y energía.

Se inocularon cultivos sin fenantreno (XAD2-MML), para determinar la capacidad de adsorción de las cepas a las perlas de resina.

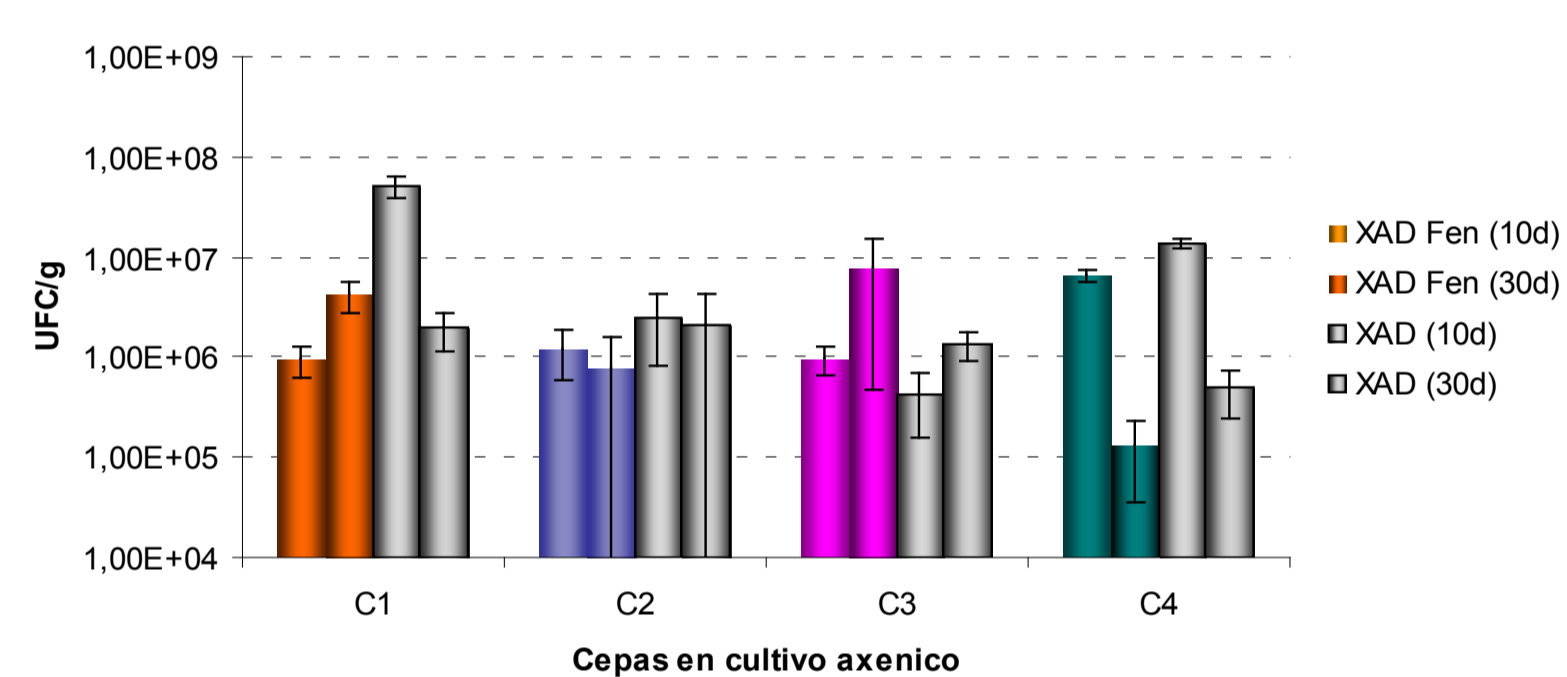
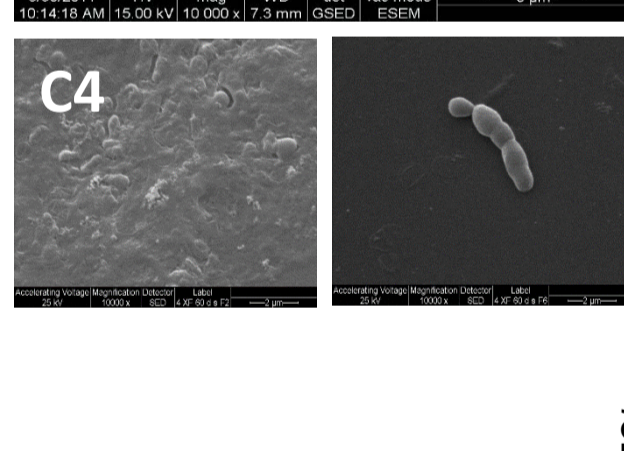
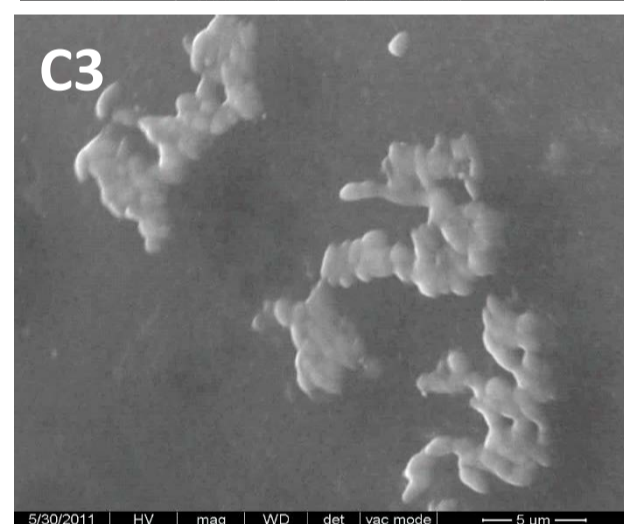
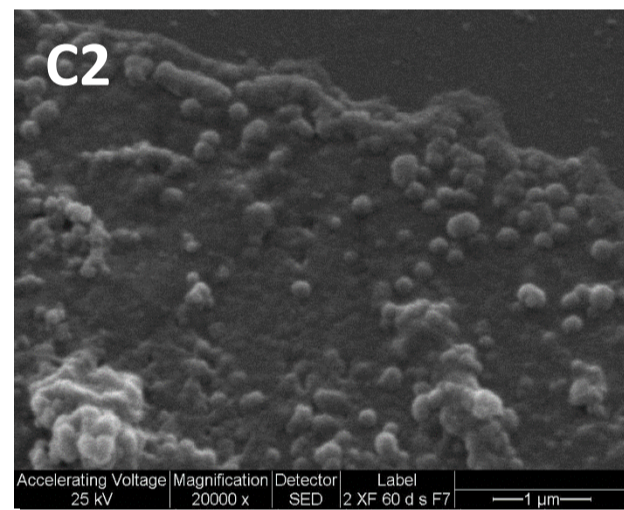
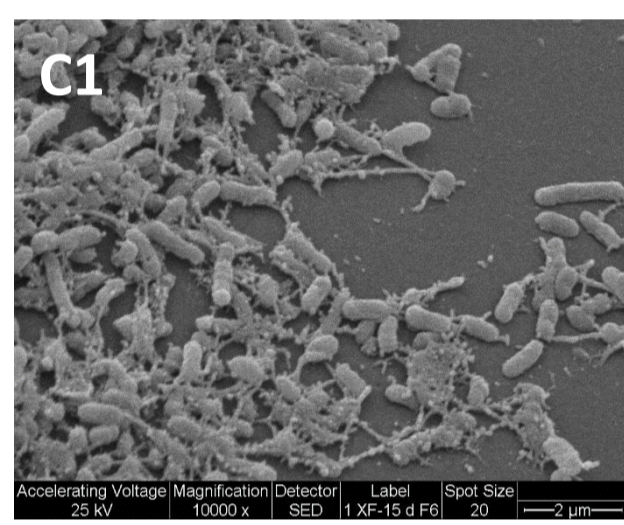


Figura 1: Desarrollo bacteriano sobre las perlas de resina XAD2 cargada con fenantreno (XAD2-Fen) y sobre XAD2, en sistema batch en MML, a los 10 y 30 días de incubación.

En cultivo puro, las cepas desarrollan adheridas tanto al fenantreno adsorbido como a resina XAD2. *Arthrobacter g.* C4 es la única que excede 1.10⁶ ufc/g a los 10 días. *Sphingobium f.* C1 desarrolla más abundantemente sobre la resina XAD2, en ausencia de fenantreno.

En cultivo definido CD, con XAD2-Fen o con XAD2 en MML, se aprecia mayor desarrollo (1.10⁷ ufc/g aprox) del consorcio respecto del los cultivos individuales, durante los 30 días de incubación.

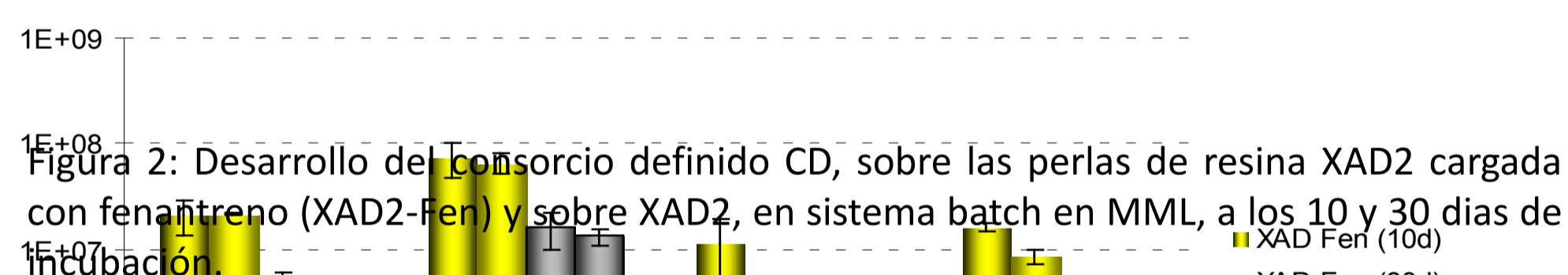
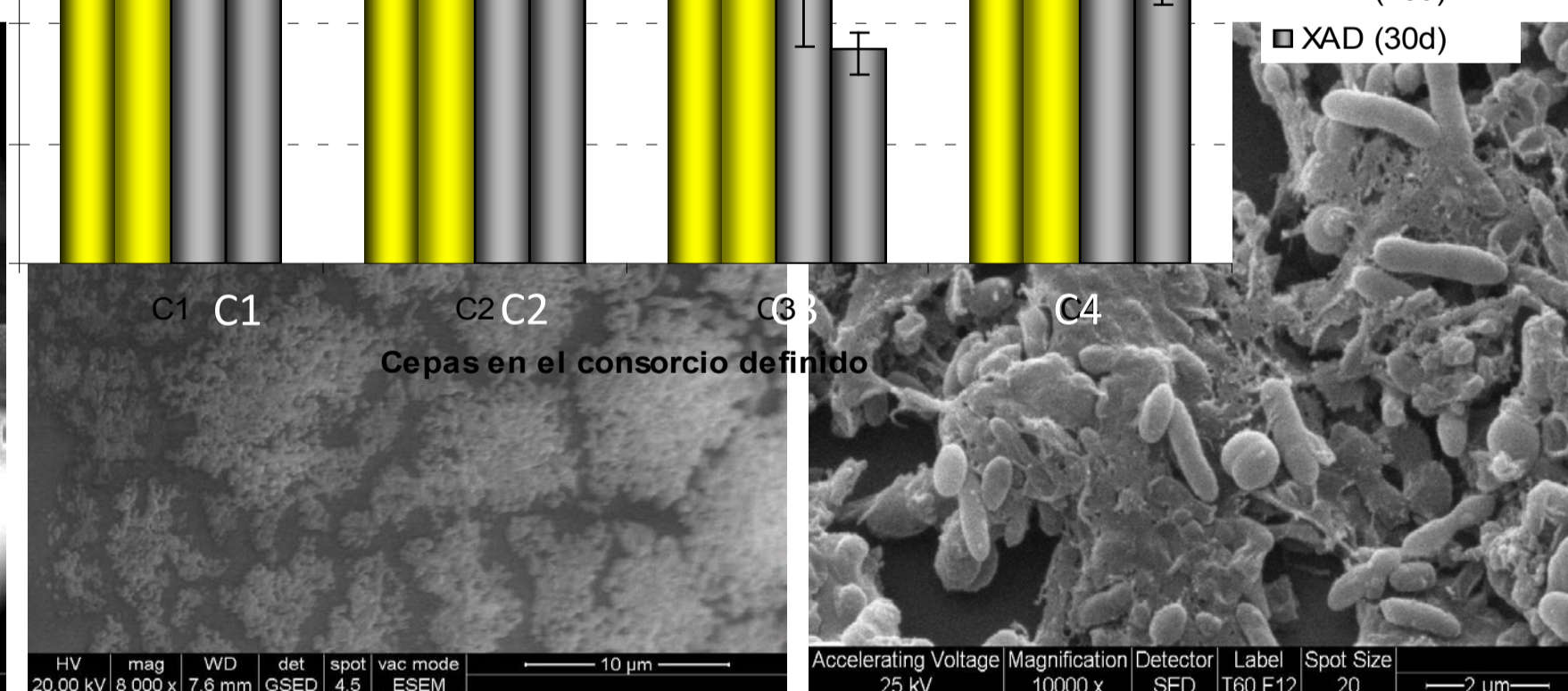
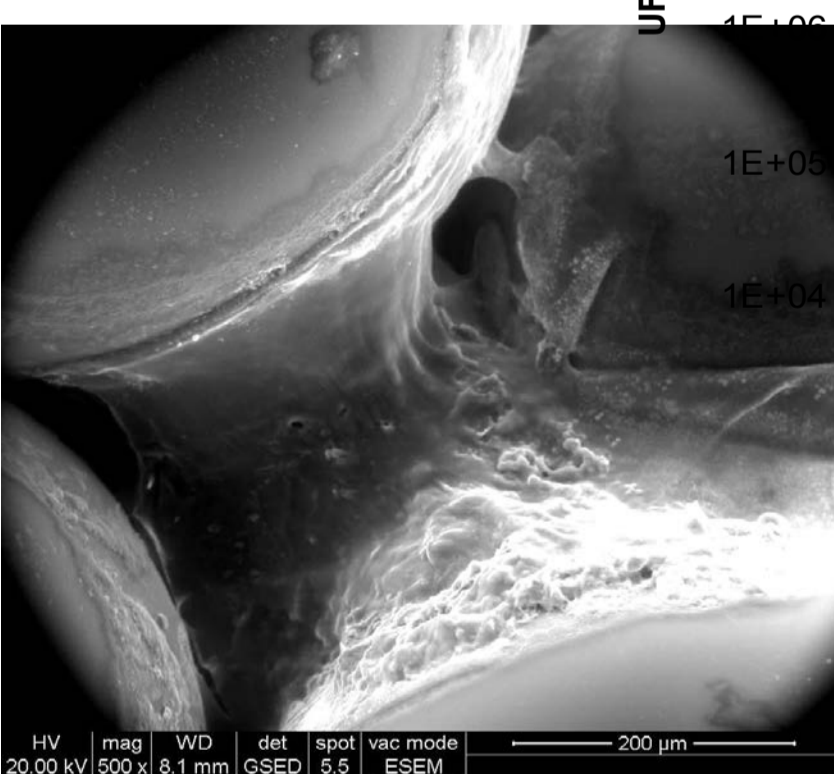


Figura 2: Desarrollo del Consorcio definido CD, sobre las perlas de resina XAD2 cargada con fenantreno (XAD2-Fen) y sobre XAD2, en sistema batch en MML, a los 10 y 30 días de incubación.



Cultivos en MML-XAD2-Fen (30 días)	Fenantreno eliminado (%)	Ac. 1-Hidroxi-2-naftoico (mg/l)
C1	60.5 ± 1.6 a,b	934 ± 255
C2	19.9 ± 11.1 c	49,33 ± 37
C3	24.4 ± 5.4 c	171,12 ± 4,3
C4	47.1 ± 7.8 b,c	149,5 ± 2,4
Consortio Definido	69.7 ± 3.2 a	No detectado
Control Abiótico	7 ± 3.1 d	-

Porcentaje de eliminación de fenantreno de las cepas en cultivo puro y en Consorcio Definido, determinado por HPLC.

El Consorcio definido elimina aproximadamente el 70% del fenantreno, sin acumulación de ac. 1-Hidroxi 2 naftoico

OBJETIVO

Análisis de un consorcio definido, degradador de fenantreno, construido a partir de los cultivos predominantes del consorcio natural obtenido por enriquecimiento en fase sólida.

Identificación de las cepas predominantes aisladas del cultivo obtenido por enriquecimientos sucesivos en XAD2-Fen, a partir de suelo contaminado.

Strain	Most closely related bacterial 16S rRNA gene sequence	Cover ^a	Max identity	Accession number ^b
C1	<i>Sphingobium fuliginis</i> strain TKP	1324/1485	99	DQ092757.1
C2	<i>Acidovorax avenae</i>	1285/1285	99	AY512827.1
C3	<i>Rhodococcus opacus</i> strain ML0004	1351/1485	99	DQ474758.1
C4	<i>Arthrobacter globiformis</i> strain A2S3	1354/1485	99	EU221407.1

Caracterización de las cepas individuales por espectroscopía FT-IR en agar R3.

Sphingobium fuliginis C1: Se observa una acumulación significativa de poli-hidroxicanoatos, por la presencia de las bandas correspondientes al carbonil ester (1.738 cm⁻¹), y las adicionales en 1.383, 1.304, 1.187, 1.135, 1.101, 1.059 y 976 cm⁻¹, asignadas a poli(β-hidroxibutirato) (PHB).

Acidovorax avenae C2: espectro típico de bacteria Gram-negativa. No se detecta la acumulación de poli-alcalcanatos o grupos ésteres, así como tampoco se observa la acumulación significativa de lípidos (bandas W1 no están incrementadas).

Las cepas Gram-positivas, C3 y C4: Muestran espectros FT-IR típicos, con picos a 1.240, 1.154, 1.080 y 1.026 cm⁻¹ característicos del peptidoglicano y de P-carbohidratos de ácidos teicoicos de las paredes celulares.

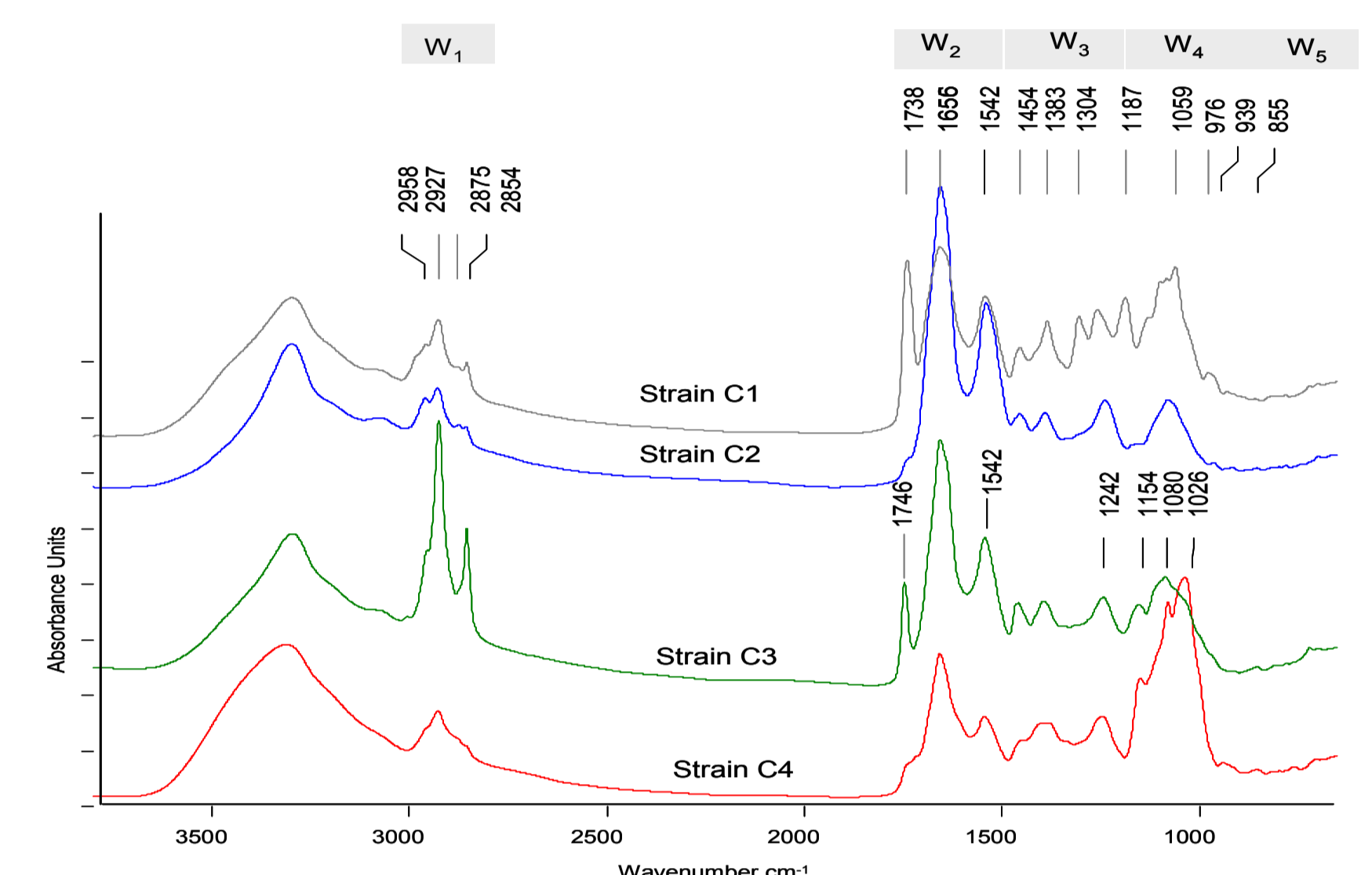


Figure 2: Espectro de absorción FTIR de las 4 cepas individuales desarrolladas en R3 agar, aisladas del consorcio.

Rhodococcus opacus C3: muestra una banda intensa en la región asignada a los lípidos (W1) debido al estiramiento simétrico y anti-simétrico del C-H en >CH₂ (2.927 y 2.854 cm⁻¹), y un pico en 1.746 cm⁻¹ asignado al C=O de ésteres. Se infiere que la combinación de estas bandas podría deberse a la presencia de triacilglicerol (TAG), ya que es conocida la capacidad de estos organismos a sintetizar y acumular estos compuestos.

Arthrobacter globiformis C4: muestra un significativo incremento en bandas de absorción asignadas a carbohidratos (W4), compatible con varios polisacáridos. Se observa una relativa baja cantidad de biomasa acumulada (débil banda en amida II) y alta relación de carbohidratos a proteínas (W4/W2)

Caracterización de las cepas individuales y el Consorcio Definido, por espectroscopía FT-IR en XAD2-Fen.

Sphingobium fuliginis C1: Se observa una baja acumulación de biomasa, ya que la misma no es detectada por FT-IR (Amida I y II). Se observan bandas características del fenantreno y posiblemente sus productos de degradación.

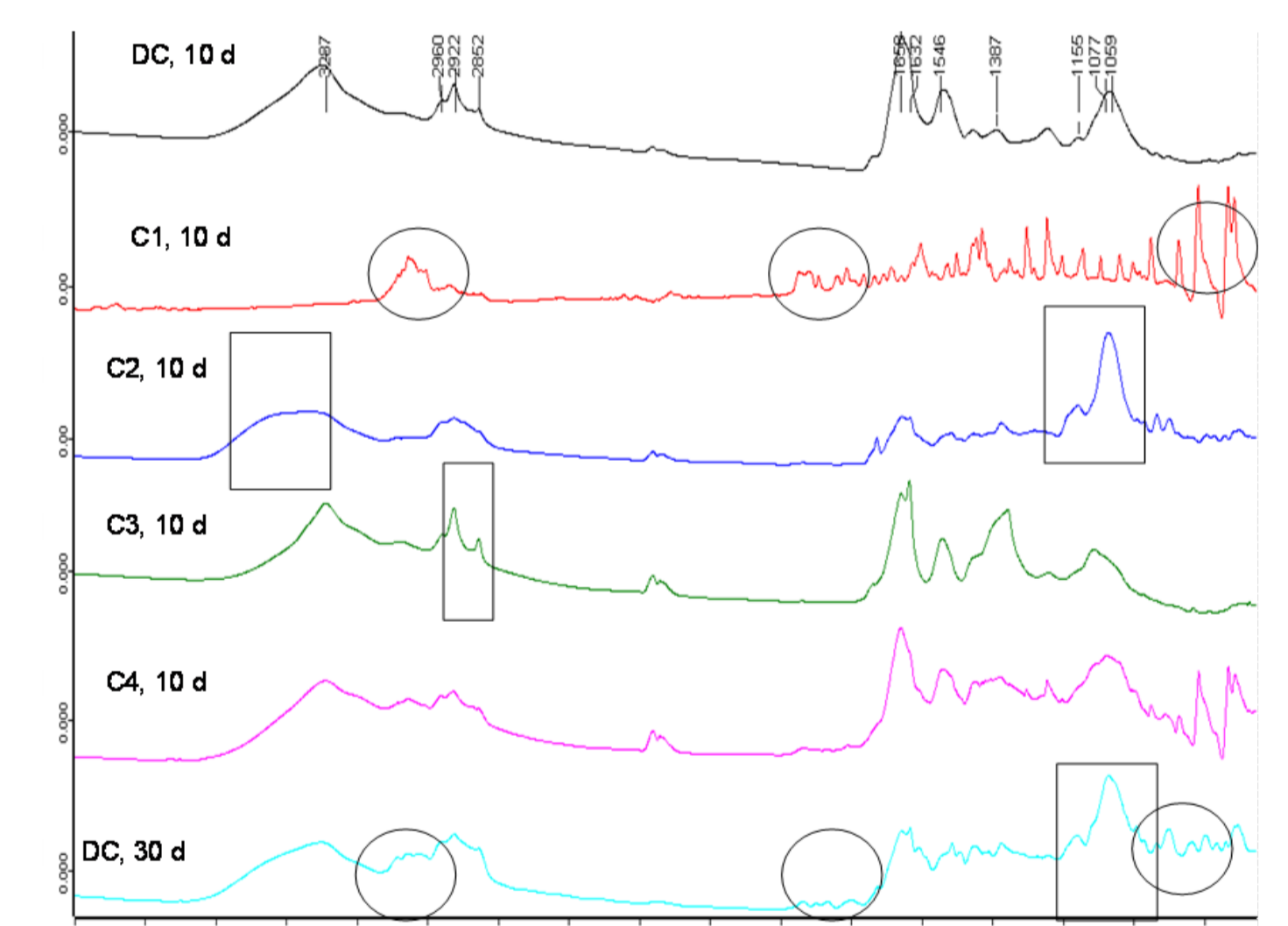
Acidovorax avenae C2: Biomasa acumulada también es muy baja, ya que el espectro presenta muy baja absorción en Amida I y II. Sin embargo, se observa un pico significativo asociado a la absorción C-O-C en carbohidratos (1200-900cm⁻¹ y 3500cm⁻¹) y una banda ancha asignada a O-H en hidratos de carbono.

Rhodococcus opacus C3: El espectro FT-IR muestra una mayor acumulación de biomasa que las dos cepas anteriores y posiblemente una mayor acumulación de lípidos.

Arthrobacter globiformis C4: El espectro muestra desarrollo de biomasa con baja producción de lípidos.

Consortio Definido 10 días: El espectro FTIR muestra la existencia de una población mixta, que no representaría la suma de las cuatro cepas individuales, sino que podría indicar la existencia de una interacción entre las cepas

Consortio Definido 30 días: El espectro del consorcio luego de 30 días pareciera no indicar acumulación significativa de biomasa. Se observan picos en regiones no asociadas a las macromoléculas biológicas (3000-2800 cm⁻¹) y en 3200-3000 cm⁻¹ que podrían ser asignados a productos de degradación del fenantreno y/o de la resina soporte.



CONCLUSIONES

Los recuentos de colonias (UFC) y los espectros FT-IR mostraron la mayor producción de biomasa para *Sphingobium fuliginis* C1 y *Arthrobacter globiformis* C4 en cultivos puros sin fenantreno, sugiriendo que ambas cepas podrían degradar la resina utilizándola como fuente de Carbono y Energía.

La detección de bandas correspondientes a las propiedades determinadas en los cultivos puros de *Acidovorax avenae* C2 y *Rhodococcus opacus* C3 evidencian que al menos estas dos cepas podrían establecerse y expresar su fenotipo durante el desarrollo del Consorcio Definido sobre fenantreno adsorbido.

Los resultados de FT-IR y determinación de fenantreno por HPLC permitieron detectar la acumulación de productos de degradación de fenantreno en los cultivos puros, los que fueron significativamente reducidos durante el desarrollo del Consorcio Definido.