

UNIVERSIDAD DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS



ESTUDIO PRELIMINAR DE BACTERIAS
METABOLIZANTES DE HIDROCARBUROS

T E S I S
QUE PARA SU EXAMEN PROFESIONAL DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
PRESENTA
CONCEPCION AMANDINA MARTELL FLORES

MONTERREY N. L.

MARZO DE 1967

T

QR82

.P78

M3

C.1



1080075118

*Encuadernación El Modelo
Diego de Montemayor 904 Nte. y Arteaga*

UNIVERSIDAD DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

ESTUDIO PRELIMINAR DE BACTERIAS METABOLIZANTES
DE HIDROCARBUROS

T E S I S

QUE PARA SU EXAMEN PROFESIONAL DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA

CONCEPCION AMANDINA MARTELL FLORES



(75118)

MONTERREY, N. L.

MARZO DE 1967.

T

9282

P. 78

M3

EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLO EN EL LABORATORIO
DE MICROBIOLOGIA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
DE LA UNIVERSIDAD DE NUEVO LEON BAJO LA DIRECCION DE
LA SRITA. Q. I.

HILDA GARZA FERNANDEZ

A MIS PADRES:
CON ETERNO AMOR
PROFUNDO RESPETO Y ADMIRACION

A MIS HERMANOS:
COMO MUESTRA DEL
GRAN CARIÑO QUE POR ELLOS SIENTO

A JULIO CESAR
CON CARIÑO.

A LA MAESTRA HILDA:
EN AGRADECIMIENTO
A TAN VALIOSA GUIA.

A LOS PROFESORES:

Q. F. B. JORGE VALENZUELA PEREZ
Y
Q. B. P. ARTURO ELIZONDO GARCIA
CON PROFUNDO AGRADECIMIENTO

A MIS MAESTROS.

A MIS FAMILIARES, COMPAÑEROS
Y
AMIGOS

A S E S O R E S

Q.F.B. Jorge Valenzuela Pérez Q.B.P. Arturo Elizondo García

I N D I C E

	Página
I.- INTRODUCCION	1
II.- MATERIAL Y METODOS	5
III.- EXPERIMENTOS Y RESULTADOS	15
IV.- DISCUSION Y CONCLUSIONES	21
V.- RESUMEN	24
VI.- REFERENCIAS	26
VII.- TABLAS Y GRAFICAS	28

I.- INTRODUCCION

La oxidación de los hidrocarburos alifáticos - normales en sistemas biológicos son en la actualidad materia principal de conjeturas. La formación de ácidos grasos por la actividad de un microorganismo en un substrato teniendo como única fuente de carbono a un hidrocarburo dado hace evidente que dicho hidrocarburo fué oxidado en un átomo de carbón terminal.

Se ha observado la producción de ácido heptanoico durante el crecimiento de Pseudomonas aeruginosa en medios constituidos por sales minerales y n-heptano (16). En dicho trabajo se concluyó que solamente el 1% del n-heptano fué transformado en ácido heptanoico correspondiendo el porcentaje restante a ácidos n-hexanoico, n-valérico, n-butfílico, propiónico y acético. Se llegó a la conclusión que el n-heptano fué oxidado monoterminalmente obteniendo el ácido n-heptanoico, encontrándose la producción de ácidos de menor peso molecular posiblemente debidos a descarboxilaciones sucesivas de series continuas de monoácidos saturados. (20, 8, 12)

Los ácidos grasos, algunos identificados y algunos no identificados, han sido separados o detectados en otros cultivos bacterianos, en los cuales largas cadenas de hidrocarburos alifáticos fueron los únicos substratos

(14, 21, 10). Resultados análogos se han obtenido con el fenil substituído en largas cadenas de hidrocarburos alifáticos (22).

Estos estudios revelaban una serie de complicaciones por el hecho de que la mayoría de los productos de oxidación, formados a partir de hidrocarburos como substrato, eran compuestos que diferían en cuanto al número de carbonos en la molécula. Aún así los estudios implican un mecanismo de oxidación monoterminal en dichos hidrocarburos.

Un gran número de bacterias son capaces de desarrollarse en soluciones de sales inorgánicas incluyendo una sal amoniacal mientras exista la presencia de compuestos orgánicos sencillos de uno o dos átomos de carbono. El aislamiento de un organismo, Methanomonas methanicus las cuales oxidarían el metano a CO₂ y agua fué reportado por Söhngen (19).

Otras bacterias comunes como las Pseudomonas fluorescens (1) también oxidan el metano y el B. hexacarborum es capaz de oxidar no solamente el metano, sino el tolueno, el xilol y otros compuestos similares. Asimismo hidrocarburos alifáticos y aromáticos presentes en el petróleo y mezclas similares son utilizadas por un gran número de bacterias como fuentes de energía (5, 9).

Estos organismos han sido aislados de medios que contienen hexano normal, naftenos como el ciclo-hexano y el 1-3 dimetil ciclo hexano, o aceites parafínicos siendo éstas las fuentes únicas de carbono, otros organismos son capaces de oxidar el fenol a CO₂, pirocatequina a oxiquinona; benzol a ácidos grasos y CO₂ y todos han sido aislados del suelo.

Los organismos que oxidan los compuestos alifáticos superiores se han designado como parafin-bacterias por los mismos investigadores alemanes.

Como evidencia desde los estudios avanzados, investigaciones que aquí se han concentrado sobre los hidrocarburos líquidos, los hidrocarburos gaseosos de cadena corta han sido virtualmente olvidados, en relación a sus transformaciones por microorganismos. El metanol, formaldehído y ácido fórmico han sido obtenidos como productos de oxidación bacteriana del metano (4). No obstante datos experimentales están todavía pendientes. La aplicación de técnicas de adaptación simultánea dieron, en el caso del etano, evidencia consistente con la formación intermedia de etileno, etanol, acetaldehído y ácido acético (7), y en el caso del propano con la formación de propileno e isopropanol (11).

Tomando en cuenta los datos obtenidos por los -

diferentes autores, se decidió efectuar el presente trabajo con el fin de aislar bacterias metabolizantes de hidrocarburos y estudiar el efecto de diversos factores sobre el desarrollo de éstos microorganismos.

II.- MATERIAL Y METODOS

1) Plan general de trabajo.

En el presente trabajo se hace un estudio preliminar sobre bacterias metabolizantes de hidrocarburos. El tema comprende, el aislamiento de los microorganismos a partir de diferentes fuentes naturales; identificación de los mismos; efecto que sobre el crecimiento tienen diferentes hidrocarburos como fuentes de carbono; efecto de la agitación, y comparación del efecto que sobre el crecimiento tienen diferentes fuentes de carbono comparado con los diferentes hidrocarburos. Se observó, además, la acción combinada de diferentes fuentes de nitrógeno e hidrocarburo y por métodos cromatográficos se investigaron los productos de degradación de los hidrocarburos en estudio, con el fin de obtener sustancias de interés industrial por acción de estos microorganismos.

2) Aislamiento de los microorganismos y medios de cultivo empleados.

Se estudiaron por una parte bacterias correspondientes a cepas de colección, y además se aislaron microorganismos a partir de diferentes fuentes naturales, clasificando posteriormente aquellos microorganismos que presentaron características de cultivo, tintoriales y bioquímicas variables.

Se estudiaron los siguientes microorganismos -
procedentes de la colección de cultivos del Departamento
de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas: -
Pseudomona aeruginosa I, Pseudomona aeruginosa II, Pseu-
domona aeruginosa III y 9 microorganismos seleccionados-
de un total de 76 microorganismos aislados a partir de -
tierra, estopa y otros materiales impregnados en hidro--
carburos.

El aislamiento a partir de muestras de tierra -
se efectuó utilizando el método de las diluciones con -
siembra en placas de Petri, conteniendo diferentes me--
dios de cultivo, y en matraces Erlenmeyer de 125 ml., -
conteniendo los mismos medios en forma líquida, con el -
fin de ser sometidos a una agitación continua de 140 r.-
p.m., durante 24-48 horas, a 28°C - 30°C.

El aislamiento a partir de estopa y otros mate-
riales se llevó a cabo en forma directa, es decir, pasan-
do la estopa o material sobre la superficie del medio de
cultivo sólido y depositando parte de dicho material por
un período de 10 minutos en cada uno de los matraces con
teniendo los diferentes medios de cultivo líquidos. Una
vez concluidas las 48 horas de incubación, tanto de los-
medios sólidos como líquidos se procedió a sembrar por -
el método de la placa estriada (15) en cajas de Petri -
con el fin de obtener colonias aisladas para obtener pos

teriormente los cultivos puros.

Para el aislamiento de los microorganismos se procedió a sembrar en diferentes medios de cultivo:

Medio No. 1

& Poli-peptona	10.0 g
NaCl	5.0 g
Petróleo	20.0 ml.
Aguac.b.p.	1000 ml.

Medio No. 2

& Poli-peptona	10.0 g
→ K ₂ HPO ₄	2.0 g ←
NaCl	5.0 g
Petróleo	20.0 ml.
Aguac.b.p.	1000 ml.

Medio No. 3

NaNO ₃	2.0 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g
KCl	0.5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.1 g
Petróleo	20.0 ml.
Aguac.b.p.	1000 ml.

Medio No. 4

MgNH ₄ PO ₄ .6H ₂ O	1.0 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
CuSO ₄ .7H ₂ O	0.1 g
Petróleo	20.0 ml.
Aguac.b.p.	1000 ml.

Medio No. 5

Urea	3.5 g
NaCl	5.0 g
K ₂ HPO ₄	2.0 g
Petróleo	20.0 ml.
Aguac.b.p.	1000 ml.

& B.B.L.

Que le sirva a usar tales medios

cuando sales y Petróleo y no peptona no fue bueno. Probó crecimiento

Medio No. 6

Parafina líquida	35.0	g
NH ₄ NO ₃	5.0	g
K ₂ HPO ₄	2.5	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.0	g
Petróleo	20.0	ml.
Agua c. b. p.	1000	ml.

Medio No. 7

Parafina líquida	35.0	g
Urea	3.5	g
K ₂ HPO ₄	2.5	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.0	g
Petróleo	20.0	ml.
Agua c. b. p.	1000	ml.

Todos los medios fueron esterilizados en auto--clave a 15 libras de presión durante 15 minutos con ex--cepción de los medios que contienen urea, en donde ésta--era esterilizada por filtración y enseguida añadida al - medio de cultivo estéril.

A cada 1000 ml., de medio se le agregaron 0.5 g de tergitol &. Los medios sólidos se prepararon agregan--do 1.5% de agar, agar a los medios líquidos excentos de - tergitol ^{Porqué?} y depositando el hidrocarburo como se indica en la figura:



El petróleo utilizado en todos los medios de - cultivo fué decolorado previamente utilizando para ello-- & Productos Alpe.

el método de adsorción por carbón activado.

De los medios de cultivo empleados para el aislamiento de los microorganismos, se seleccionaron aquellos en los que el crecimiento fué mas notable, para llevar a cabo posteriormente los diferentes puntos especificados en el presente trabajo. Resultando ser los medios No. 1 y No. 2 los que reunieron dichas características, tomándolos como medio base en todos los experimentos.

3) Clasificación de los microorganismos. *¿cómo se hizo?*

De un total de 76 microorganismos aislados se seleccionaron 2 de ellos para realizar nuestro estudio procediéndose a su clasificación, para lo cual se hicieron las pruebas tintoriales, morfológicas y bioquímicas recomendadas por la American Society on Microbiology (3) (18) y (17). Así también se tomaron en cuenta las características del cultivo y la naturaleza de las muestras de las cuales se aislaron los microorganismos.

Se llegó a la conclusión de que todos los microorganismos seleccionados para desarrollar el presente trabajo corresponden al género Pseudomonas.

4) Métodos de trabajo.

Las cepas bacterianas se sembraron en tubos con agar nutritivo, incubándose a 28°C - 30°C durante 24-48-

horas y conservándolos a una temperatura entre 5°C y - - 10°C. Durante el desarrollo del trabajo los microorga-- nismos fueron resembrados a medida que se hacía necesa-- rio.

Para la preparación del inóculo se hizo una sus-- pensión de los microorganismos en agua estéril utilizán-- dose siempre cultivos de 24-48 horas de incubación. El-- vólumen del inóculo siempre fué de 1 ml., para cada uno-- de los puntos desarrollados. *no se importaba el # ?*

El inóculo fué depositado con pipeta estéril en-- matraces Erlenmeyer de 125 ml., conteniendo cada uno de-- ellos 25 ml, de los medios de cultivo seleccionados para-- cada experimento. *(1 y 2 ?)*

El pH de los medios de cultivo fué tomado con -- un Potenciómetro Beckmann modelo G y la turbidez fué de-- terminada con el uso de un Fotocolorímetro de Klett Sum-- erson, con filtro de 420 m *m. (?) Bec.*

Para determinar el efecto de la agitación sobre el crecimiento de los microorganismos se utilizó un agi-- tador mecánico de acción rotatoria. En cada experimento se inocularon matraces Erlenmeyer de 125 ml., con 25 ml., del medio específico y se agitaron a 140 r.p.m., durante 24-48 horas a una temperatura de 28°C - 30°C, corriendo-- paralelamente cultivos que fueron incubados en condicio--

nes estáticas.

La identificación de los productos de degradación de los hidrocarburos se hizo por cromatografía en papel y en capa delgada, ensayándose diferentes solventes y adsorbentes en el caso de la cromatografía en capa delgada, utilizándose para cada caso el revelador mas apropiado.

En el análisis se incluyó medio de cultivo estéril y estandars de diferentes carbohidratos, aminoácidos y vitaminas (2, 6, 13).

5) Efecto que sobre el crecimiento tienen diferentes hidrocarburos utilizados como fuente de carbono.

Se estudiaron como fuente de carbono diferentes hidrocarburos, tales como: benceno, ciclohexano, 1,4 dióxano, gasolina blanca, n-hexano, octano, pentano, penteno, petróleo, tolueno, m-xileno y p-xileno. *total - 12)*

Se utilizaron dos series de doce matraces Erlenmeyer de 125 ml., con 25 ml., de medios No. 1 y No. 2 respectivamente para cada microorganismo en estudio, utilizando para cada matraz cada uno de los diferentes hidrocarburos como fuente de carbono.

Para la inoculación de los matraces se hizo una suspensión en agua estéril de cada uno de los microorga-

*Los medios
Nº 1 y 2 tienen
Peptona y petróleo
como fuente de C = EL
USO D.E. QUICHO.*

nismos, tomando un ml., de esta suspensión para cada matraz. *NO LE INTERESA CONOCER EL # DE CÉLULAS?*

Una serie de matraces se mantuvo en condiciones estáticas, y la serie restante se agitó mecánicamente a una velocidad de 140 r.p.m.. Todos los matraces se incubaron a una temperatura de 28°C - 30°C durante un período de 24-48 horas, después de las cuales se determinó turbidez por el método ya descrito.

6) Efecto que sobre el crecimiento tienen diferentes fuentes de carbono.

Se utilizaron como fuentes de carbono diferentes carbohidratos tales como: dextrosa, galactosa, maltosa, manitol y sacarosa, variando la concentración de cada uno de ellos.

Para cada microorganismo se utilizó una serie de 30 matraces Erlenmeyer de 125 ml., conteniendo 25 ml., del medio base? para cada uno de ellos, substituyendo el petróleo por los diferentes carbohidratos utilizados como fuente de carbono.

12 microorganismos
30 en total

Todos los matraces fueron inoculados y agitados mecánicamente como se describió en el inciso anterior, se incubaron a una temperatura de 28°C - 30°C por un período de 24-48 horas, para determinar la turbidez posteriormente. *NO midió TURBIDEZ INICIAL?*

- 7) Efecto que sobre el crecimiento tiene el hidrocarburo combinado con otra fuente de carbono.

Para cada microorganismo se utilizaron matraces Erlenmeyer de 125 ml., conteniendo 25 ml., de medio base, agregando al mismo tiempo a cada matraz el hidrocarburo y la concentración del carbohidrato que dieron mejor crecimiento en los experimentos anteriores.

Los matraces fueron inoculados y agitados mecánicamente como se describió en incisos anteriores e incubados a una temperatura de 28°C - 30°C, durante 24-48 horas, determinándose la turbidez en cada matraz.

- 8) Efecto que sobre el crecimiento tiene combinadamente el hidrocarburo con diferentes fuentes de nitrógeno, variando la concentración de esta última.

Se estudiaron diferentes concentraciones de las siguientes fuentes de nitrógeno: NaNO_3 , NH_4NO_3 , NH_4Cl , KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y urea.

Se utilizaron para cada microorganismo, series de 36 matraces Erlenmeyer de 125 ml., conteniendo 25 ml., del medio base, substituyendo el petróleo por el hidrocarburo, con el cual se obtuvo inicialmente un mayor crecimiento y agregando en cada matraz la fuente de nitrógeno en estudio en diferentes concentraciones.

Todos los matraces fueron inoculados y agitados en la misma forma que en los experimentos anteriores e incubados a una temperatura de 28°C - 30°C durante 24 -- 48 horas, determinándose el crecimiento mediante la lectura de la turbidez en el medio de cultivo..

III.- EXPERIMENTOS Y RESULTADOS

Las condiciones experimentales ensayadas en el presente trabajo fueron: Efecto de la presencia de los diferentes hidrocarburos utilizados como fuente de carbono, efecto de la agitación, efecto que sobre el crecimiento tienen las diferentes fuentes de carbono comparadas con los hidrocarburos, efecto que sobre el crecimiento tienen combinadamente el hidrocarburo con otra fuente de carbono, efecto que sobre el crecimiento tienen combinadamente el hidrocarburo con diferentes fuentes de nitrógeno, variando la concentración de esta última y la investigación de la degradación de los hidrocarburos por microorganismos.

Durante el período de cada uno de los experimentos se trabajó en condiciones estériles y a una temperatura de 28°C - 30°C.

1) Efecto de la presencia de los diferentes hidrocarburos utilizados como fuente de carbono.

Los hidrocarburos en estudio fueron los siguientes: benceno, ciclohexano, 1-4 dioxano, gasolina blanca, n-hexano, octano, pentano, penteno, petróleo, tolueno, -

m-xileno, y p-xileno.

Se utilizó una serie de 24 matraces Erlenmeyer de 125 ml. conteniendo 12 de ellos 25 ml. de medio No. 1 y los 12 restantes 25 ml. de medio No. 2 para cada uno de los microorganismos estudiados. substituyendo en cada matraz el petróleo por los diferentes hidrocarburos. *sigue siendo medio 1 y 2?*

Todos los matraces fueron inoculados por el método descrito en el inciso anterior, e incubados en condiciones estáticas a una temperatura de 28°C - 30°C durante 24 - 48 horas.

En las tablas núms: I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI y XII, se aprecian los resultados obtenidos en este experimento, observándose que el petróleo -- fué el hidrocarburo que dió mejor resultado en la mayor parte de los microorganismos estudiados. *Por qué?*

2) Efecto de la agitación.

Se utilizó una serie de 24 matraces Erlenmeyer. de 125 ml. conteniendo 12 de ellos 25 ml. de medio No. 1 y los 12 restantes 25 ml. de medio No. 2 para cada uno de los microorganismos en estudio; substituyendo en cada matraz el petróleo por los diferentes hidrocarburos. Todos los matraces se inocularon como se describió anteriormente y fueron agitados mecánicamente a una velocidad de

140 r.p.m. y a una temperatura de 28°C - 30°C por un período de 24 - 48 horas.

Los resultados obtenidos están indicados en las tablas del núm. I al núm. XII, observándose que el método agitado fué el que dió un mejor crecimiento de los micro organismos y determinándose el medio ideal para cada uno de ellos. *y cual fué el hidrocarburo?*

3) Efecto que sobre el crecimiento tienen las diferentes fuentes de carbono comparadas con los hidrocarburos.

Se utilizaron los siguientes carbohidratos como fuentes de carbono: dextrosa, galactosa, maltosa, ^{fructo-}manitol y sacarosa a las concentraciones siguientes: 0.5%, - 1.0%, 1.5%, 2.0%, 3.0% y 4.0%.

Se utilizó para cada microorganismo una serie - de 30 matraces Erlenmeyer de 125 ml., con 25 ml., del medio base para cada uno de ellos, substituyendo en los medios de cultivo el petróleo por cada uno de los carbohidratos en estudio a diferentes concentraciones.

Todos los matraces fueron inoculados y agitados mecánicamente a una velocidad de 140 r.p.m. por un período de 24 - 48 horas y a una temperatura de 28°C - 30°C.

Las tablas del núm. XIII al núm. XVII y gráficas del núm. 1 al núm. 12 muestran los resultados de es-

te experimento, observando que el carbohidrato con que se obtuvo un mayor crecimiento en la mayor parte de los microorganismos fué el manitol a una concentración entre 1.0% - 2.0%.

4) Efecto que sobre el crecimiento tienen combinadamente el hidrocarburo con otra fuente de carbono.

En este experimento se utilizó, para cada microorganismo un matraz Erlenmeyer de 125 ml. con 25 ml. del medio base, substituyendo en este caso el petróleo por el hidrocarburo y carbohidrato, con el cual se obtuvo un mayor crecimiento en experimentos anteriores, con el fin de observar el efecto que sobre el crecimiento tienen combinadamente estos compuestos. La inoculación e incubación se hizo en las condiciones anteriormente expuestas. Los resultados obtenidos aparacen en la tabla núm. XVIII en donde se observa que el petróleo y manitol a una concentración de 1.5%, combinadamente, daban una turbidez mayor en el medio de cultivo.

5) Efecto que sobre el crecimiento tienen combinadamente el hidrocarburo con diferentes fuentes de nitrógeno, variando la concentración de esta última.

Las fuentes de nitrógeno ensayadas fueron: NaNO_3 , NH_4NO_3 , NH_4Cl , KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y urea en la si---

güentes concentraciones: 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%, 3.0%, y 4.0%. 68 ml
35 184

y la Repetición?
En este ensayo se utilizaron para cada microorganismo 36 matraces Erlenmeyer de 125 ml. con 25 ml., del medio base, substituyendo el petróleo por el hidrocarburo, con el cual se obtuvo mayor crecimiento del microorganismo y agregando posteriormente la fuente de nitrógeno en las diferentes concentraciones. Todos los matraces se inocularon e incubaron en las condiciones ya establecidas.

Los resultados obtenidos pueden observarse detalladamente en las tablas del núm. XIX al núm. XXIV y en las gráficas del núm. 13 al núm. 24, respectivamente.

Se puede observar con claridad que utilizando como fuente de nitrógeno NaNO_3 y NH_4Cl a una concentración entre 0.5% y 1.0% combinada con el hidrocarburo que inicialmente dió mejor crecimiento para cada uno de los microorganismos, se obtuvo la mayor turbidez, después de agitar los matraces durante 24 - 48 horas y manteniendo la temperatura a $28^\circ\text{C} - 30^\circ\text{C}$.

*Como se dice
en el
punto (23) que
NH₄Cl 1.0%*
6) Observación de los productos de degradación de los hidrocarburos por microorganismos.

Tomando en cuenta las condiciones óptimas de desarrollo para cada microorganismo, se procedió a investigar cromatográficamente la posibilidad de encontrar -- productos de degradación de los hidrocarburos por acción de estos microorganismos. Para llevar a cabo este ensayo se utilizó para cada microorganismo un matraz Erlenmeyer de 125 ml., conteniendo 25 ml. del medio base, substituyendo el petróleo por el hidrocarburo con el cual se obtuvo un mayor crecimiento, y agregando la concentración y fuente de nitrógeno adecuada.

Con el fin de observar si los microorganismos-- causaban alguna degradación en el carbohidrato al ser utilizado éste como fuente de carbono, se utilizó además para cada microorganismo un matraz Erlenmyyer de 125 -- ml., conteniendo 25 ml., del medio base, substituyendo - el petróleo por el carbohidrato, con el cual se obtuvo-- un mayor crecimiento a determinada concentración y agregando la concentración y fuente de nitrógeno adecuada. - La inoculación e incubación se hizo en la misma forma - que para los experimentos anteriores.

RESULTADOS DE ESO ?
o

IV.-DISCUSION Y CONCLUSIONES

Antes de considerar los resultados obtenidos--- en nuestro trabajo, debe mencionarse el hecho de que los microorganismos fueron aislados a partir de diferentes-- fuentes naturales, en las cuales se tenía la seguridad-- de que estaban impregnadas con diferentes hidrocarburos.

También debe mencionarse que se utilizaron dife- rentes medios de cultivo para el aislamiento de dichos-- microorganismos, y que finalmente se seleccionaron aque- llos en los que los microorganismos se desarrollaban me- jor, para tomarlos luego como medios de cultivo base en- los diferentes ensayos. En todos los medios de cultivo - se agregó petróleo como fuente de carbono, el cual era-- substituído al ensayar cada una de las diferentes fuente- tes, tales como hidrocarburos, carbohidratos o bien com- binaciones de ambos.

En el presente trabajo los resultados obtenidos no difieren de lo ya publicado por diversos autores, al- comprobar que pueden ser aislados microorganismos meta- bolizantes de hidrocarburos, y procedimos a estudiar el- efecto que sobre el crecimiento de estos microorganismos pudieran tener diferentes factores tales como el empleo- de diferentes hidrocarburos como fuentes de carbono, com

binación de dichos hidrocarburos con otra fuente de carbono o de nitrógeno a diversas concentraciones, etc.

Por los resultados expresados en las tablas de los núms: I al XII, podemos concluir que para todos los microorganismos en cultivos agitados se obtuvo un crecimiento mayor que en cultivos estáticos, de tal manera--- que fué seleccionado dicho sistema para el desarrollo de todos los experimentos en nuestro trabajo.

NO ES VERDAD

Los ensayos referentes al efecto que sobre el crecimiento tienen diferentes hidrocarburos como fuente de carbono, se reportan en las tablas del I al XII y revelan que los hidrocarburos que estimularon en mayor grado el crecimiento de los microorganismos fueron el petróleo y el pentano.

En las tablas de los núms: XIII al XVII se compara el efecto que sobre el crecimiento tienen diferentes fuentes de carbono, tales como: dextrosa, galactosa, maltosa, manitol y sacarosa a diferentes concentraciones concluyéndose que el manitol a una concentración 1.0% -- 1.5% es el carbohidrato con el que los microorganismos presentan un crecimiento óptimo.

Al combinar el hidrocarburo y la fuente de carbono, que inicialmente proporcionaron crecimiento máximos para cada microorganismo, se observó que esta combi-

nación estimuló el crecimiento en algunos microorganismos, mientras que en otros se inhibió casi por completo el crecimiento de los mismos.

Los resultados dados en las tablas de los núms: XIX al XXIV corresponden al estudio del efecto que sobre el crecimiento tienen combinadamente el hidrocarburo con diferentes fuentes de nitrógeno a diversas concentraciones y nos muestran que el crecimiento en gran número de microorganismos es más favorable al combinar el hidrocarburo con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en una concentración de 0.5% - - - 1.5%.

Al cultivar cada uno de los microorganismos en sus condiciones óptimas, por un período de 24 - 48 horas y analizar por métodos cromatográficos sus productos metabólicos extracelulares, se vió que los hidrocarburos son degradados por la acción de los microorganismos, observándose la presencia de ciertos productos no indentificados. Por lo que se concluye que los organismos del género Pseudomona estudiados, metabolizan a los hidrocarburos alifáticos, alicídicos y aromáticos.

cómo deduce que esos productos son derivados de hidrocarburos si no fueron identificados??

V.- R E S U M E N

En el presente trabajo se llevó a cabo un estudio preliminar sobre bacterias metabolizantes de hidrocarburos; se estudió el aislamiento de los microorganismos a partir de diferentes fuentes naturales y la identificación de los mismos; se estudió el efecto que sobre el crecimiento tienen diferentes hidrocarburos como fuente de carbono comparando con otras fuentes; así mismo, se estudió la acción combinada del hidrocarburo con diferentes fuentes de nitrógeno y el efecto que pudiera tener sobre el crecimiento de los microorganismos la agitación mecánica, para posteriormente investigar la posibilidad de obtener sustancias de interés industrial a partir de dichos microorganismos.

Los resultados nos revelan que las condiciones bajo las cuales se obtuvo el mayor crecimiento varían para cada microorganismo. Sin embargo, pudimos concluir que de los hidrocarburos estudiados el petróleo y el pentano son los mejor metabolizados por los microorganismos en general.

También pudimos observar que la agitación favorece notablemente el crecimiento de los microorganismos y se considera que los demás factores tienen efectos diversos sobre los diferentes microorganismos estudiados.

Como en el presente trabajo no se investigó la naturaleza química de los diversos productos que se forman de la actividad bacteriana sobre los hidrocarburos-
no sabemos si alguno o algunos de ellos puedan ser de--
importancia industrial.

REFERENCES

- 1.- Barker, The oxidation of simple organic compounds for Pseudomonas.; Jour. Biol. Chem., 137:153 (1941).
- 2.- Bobbit, J.M.: "Thin-Layer Chromatography" Reinhold -- Publishing Corporation. Chapman Hall, Ltd., London - (1963).
- 3.- Breed, R.S., Murray, E.G.D. and Smith, N.R."Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" 7 th Ed. The Williams & Wilkins Company. Baltimore Maryland (1957)
- 4.- Brown, L.R., and R.J. Strawinsk : "Bacterial Oxidation of Gaseous A Alkanes", Bact.Proc. 122 (1958).
- 5.- Bushnell and Haas: "The oxidation of simple organic-compounds"., Jour. Bact, 41: 653 (1941)
- 6.- Cramer Friedrich. "Cromatografia sobre papel" (1958)
- 7.- Davis, J. B., H. H. Chase and R. L. Raymond: Appl. - Microbiol. 4, 310 (1956)
- 8.- Eldsen, S. R. and D. Lewis: Biochem J. 55, 183 (1953) Bacterial Oxidation of Hidrocarbons.
- 9.- Fenske and White, "The oxidation of organic compounds for bacteria". Jour. Bact., 44:169 (1942).
- 10.- Hirsch, P.: Arch. Mikrobiol. 29, 368 (1958).
- 11.- Klausmeier, R. J. Strawinski: "Production of Bacterial Cell from Hydrocarbons"., Bact. Proc. 123 (1958)
- 12.- Kohlmeier, E. F., and H. Gest: "Studies on the Utilization of Hydrocarbons by Microorganisms.", J. Bact. 61, 269 (1951).

- 13.- Lederer E., "Chromatography" Applications in Chimie-Biologique (1960).
- 14.- Rosenfeld, W. D.: "Bacterial Oxidation of Gaseous - Alkanes., J. Bact. 54, 664 (1947).
- 15.- Salle, A. J. "Fundamental Principles of Bacteriology", Mc.Graw-Hill Book Company, Inc. New York (1961)
- 16.- Senes, J. C., and M. Konovaltschikoff-Mazoyer: C.R. Acad. Sci. 24 2873 (1956).
- 17.- Skerman, V.B.D.: "A Guide to the Identification of - the Genera of Bacteria", The Williams & Wilkins Co. Baltimore Maryland (1959).
- 18.- Society of American Bacteriology. "Manual of Microbiological Methods". Mc Graw-Hill Book Co Inc. New-York (1957).
- 19.- Söhngen, Zur Physiologie der Methanbaktrieu, Bot - Centralbl, 5, : 177. (1907).
- 20.- Stadtman, E. R., T. C. Stadtman and H. A. Barker :- J. Biol. Chem. 178, 677 (1949).
- 21.- Treccani, V., and L. Canonica: Ann. Microbiol., 5,- 162 (1953).
- 22.- Webley, D. M., R. B. Duff and V. C. Farmer: Nature, 178, 1767 (1956).

TABLA I

Efecto de la presencia de los diferentes Hidrocarb^{ur}os como única fuente de Carbono.

Condiciones:

Cultivos: Estáticos y Agitados

pH del medio de cultivo: 6.0 - 6.5

Temperatura: 28°C - 30°C

Período de Incubación: 48 horas.

Microorganismo: Pseudomona aeruginosa I

Hidrocarburo	Turbidez		Turbidez	
	Medio No. 1		Medio No. 2	
	Cultivo Estático	Cultivo Agitado	Cultivo Estático	Cultivo Agitado
Benceno	0	10	1	4
Ciclo-Hexano	100	35 ←	94	11 ←
1-4 Dioxano	39	19 ←	53	5 ←
Gasolina Blanca	78	123	93	94
n-Hexano	198	290	168	248
Octano	9	61	4	53
Pentano	67	190	95	197
Penteno	97	192	63	170
Petróleo	260	400	186	455
Tolueno	10	3 ←	10	1 ←
m-Xileno	92	103	92	26 ←
p-Xileno	40	55	30	16 ←

Los constituyentes del medio afectan el hidrocarburo

TABLA II

Efecto de la presencia de los diferentes Hidrocarburos como única fuente de Carbono.

Condiciones:

Cultivos: Estáticos y Agitados

pH del medio de cultivo: 6.0 - 6.5

Temperatura: 28°C - 30°C

Período de Incubación: 48 horas.

Microorganismo: Pseudomona aeruginosa II

Hidrocarburo	Turbidez		Turbidez	
	Medio No. 1		Medio No. 2	
	Cultivo Estático	Cultivo Agitado	Cultivo Estático	Cultivo Agitado
Benceno	2	3	1	0
Ciclo-Hexano	54	96	66	61
1-4, Dioxano	24	7	28	19
Gasolina Blanca	202	365	220	385 <i>idem agitado</i>
n-Hexano	168	224	212	244
Octano	185	380	173	400
Pentano ✓	222	395	210	410 *
Penteno	208	385	224	405
Petróleo	220	375	* 228	385 <i>no</i>
Tolueno	3	0	0	2
m-Xileno	110	269	100	185
p-Xileno	10	2	0	22

TABLA III

Efecto de la presencia de los diferentes Hidrocarburos como única fuente de Carbono.

Condiciones:

Cultivos: Estáticos y Agitados.

pH del medio de cultivo: 6.0 - 6.5

Temperatura: 28°C - 30°C

Período de Incubación: 48 horas.

Microorganismo: Pseudomona aeruginosa III

Hidrocarburo	Turbidez		Turbidez	
	Medio No. 1		Medio No. 2	
	Cultivo Estático	Cultivo Agitado	Cultivo Estático	Cultivo Agitado
Benceno	0	0	0	0
Ciclo-Hexano	186	400	195	345
1-4, Dioxano	0	0	0	0
Gasolina Blanca	183	320	204	310
n-Hexano	155	238	190	252
Octano	169	68	46	5
Pentano	191	228	224	232
Penteno	200	264	218	258
Petróleo	163	252	179	268
Tolueno	0	148	58	0
m-Xileno	210	195	163	173
p-Xileno	178	130	194	100

TABLA IV

Efecto de la presencia de los diferentes Hidrocarburos como única fuente de Carbono.

Condiciones:

Cultivos: Estáticos y Agitados

pH del medio de cultivo: 6.0 - 6.5

Temperatura: 28°C - 30°C

Período de Incubación: 48 horas.

Microorganismo: Pseudomona I

Hidrocarburo	Turbidez		Turbidez	
	Medio No. 1		Medio No. 2	
	Cultivo Estático	Cultivo Agitado	Cultivo Estático	Cultivo Agitado
Benceno	0	0	0	32
Ciclo-Hexano	15	127	24	87
1-4, Dioxano	0	0	0	0
Gasolina Blanca	31	10	18	11
m-Hexano	21	55	29	111
Octano	7	20	13	24
Pentano	22	35	30	212
Penteno	28	51	22	80
Petróleo	40	25 ←	33	8 ←
Tolueno	0	0	0	0
m-Xileno	3	63	0	60
p-Xileno	19	24	12	47

TABLA V

Efecto de la presencia de los diferentes Hidrocarburos como única fuente de Carbono.

Condiciones:

Cultivos: Estáticos y Agitados

pH del medio de cultivo: 6.0 - 6.5

Temperatura: 28°C - 30°C

Período de Incubación: 48 horas.

Microorganismo: Pseudomona 2

Hidrocarburo	Turbidez		Turbidez	
	Medio No. 1		Medio No. 2	
	Cultivo Estático	Cultivo Agitado	Cultivo Estático	Cultivo Agitado
Benceno	39	212	12	169
Ciclo-Hexano	30	0 ←	25	197
1-4, Dioxano	16	0 ←	5	0 ←
Gasolina Blanca	47	24	65	13
n-Hexano	95	224	33	214
Octano	29	17 ←	17	24
Pentano	44	195	52	185
Penteno	45	220	54	186
Petróleo	43	216	53	500
Tolueno	17	6 ←	11	1 ←
m-Xileno	19	101	21	14
p-Xileno	44	5 ←	45	0 ←

TABLA VI

Efecto de la presencia de los diferentes Hidrocarburos como única fuente de Carbono.

Condiciones:

Cultivos: Estáticos y Agitados.

pH del medio de cultivo: 6.0 - 6.5

Temperatura: 28°C - 30°C

Período de Incubación: 48 horas.

Microorganismo: Pseudomona 3

Hidrocarburo	Turbidez		Turbidez	
	Medio No. 1		Medio No. 2	
	Cultivo Estático	Cultivo Agitado	Cultivo Estático	Cultivo Agitado
Benceno	40	335	52	291
Ciclo-Hexano	48	261	52	216
1-4, Dioxano	0	23	0	16
Gasolina Blanca	43	193	44	248
n-Hexano	49	300	62	262
Octano	28	281	77	68
Pentano	62	236	65	252
Penteno	47	400	44	14
Petróleo	45	410	50	145
Tolueno	38	20	44	26
m-Xileno	26	9	22	13
p-Xileno	31	34	21	80

TABLA VII

Efecto de la presencia de los diferentes Hidrocarburos como única fuente de Carbono.

Condiciones:

Cultivos: Estáticos y Agitados

pH del medio de cultivo: 6.0 - 6.5

Temperatura: 28°C - 30°C

Período de Incubación: 48 horas.

Microorganismo: Pseudomona 4

Hidrocarburo	Turbidez		Turbidez	
	Medio No. 1		Medio No. 2	
	Cultivo Estático	Cultivo Agitado	Cultivo Estático	Cultivo Agitado
Benceno	38	23	35	18
Ciclo-Hexano	41	21	37	7
1-4, Dioxano	0	10	0	12
Gasolina Blanca	33	12	38	14
n-Hexano	43	6	41	240
Octano	38	107	30	71
Pentano	36	40	34	248
Penteno	34	6	37	6
Petróleo	19	11	30	23
Tolueno	37	47	36	93
m-Xileno	24	11	16	20
p-Xileno	8	0	0	19

TABLA VIII

Efecto de la presencia de los diferentes Hidrocarburos como única fuente de Carbono.

Condiciones:

Cultivos: Estáticos y Agitados.

pH del medio de cultivo: 6.0 - 6.5

Temperatura: 28°C - 30°C

Período de Incubación: 48 horas.

Microorganismo: Pseudomona 5

Hidrocarburo	Turbidez		Turbidez	
	Medio No. 1		Medio No. 2	
	Cultivo Estático	Cultivo Agitado	Cultivo Estático	Cultivo Agitado
Benceno	52	32	57	20
Ciclo-Hexano	54	278	47	340
1-4, Dioxano	37	38	36	172
Gasolina Blanca	137	31	49	490
n-Hexano	50	490	56	530
Octano	47	98	55	114
Pentano	55	485	73	365
Penteno	73	340	65	192
Petróleo	14	465	21	455
Tolueno	15	15	14	28
m-Xileno	54	20	49	35
p-Xileno	53	33	56	40

TABLA IX

Efecto de la presencia de los diferentes Hidrocarburos como única fuente de Carbono.

Condiciones:

Cultivos: Estáticos y Agitados.

pH del medio de cultivo: 6.0 - 6.5

Temperatura: 28°C - 30°C

Período de Incubación: 48 horas.

Microorganismo: Pseudomona 6

Hidrocarburo	Turbidez		Turbidez	
	Medio No. 1		Medio No. 2	
	Cultivo Estático	Cultivo Agitado	Cultivo Estático	Cultivo Agitado
Benceno	0	385	0	0
Ciclo-Hexano	0	0	23	0
1-4, Dioxano	0	0	0	0
Gasolina Blanca	0	184	0	395
n-Hexano	38	16	0	0
Octano	9	25	16	67
Pentano	68	300	29	325
Penteno	2	3	45	54
Petróleo	61	220	90	332
Tolueno	0	0	0	0
m-Xileno	0	0	0	2
p-Xileno	0	0	0	1

TABLA X

Efecto de la presencia de los diferentes Hidrocarburos como única fuente de Carbono.

Condiciones:

Cultivos: Estáticos y Agitados.

pH del medio de cultivo: 6.0 - 6.5

Temperatura: 28°C - 30°C

Período de Incubación: 48 horas.

Microorganismo: Pseudomona 7

Hidrocarburo	Turbidez		Turbidez	
	Medio No. 1		Medio No. 2	
	Cultivo Estático	Cultivo Agitado	Cultivo Estático	Cultivo Agitado
Benceno	0	0	95	0
Ciclo-Hexano	16	0	0	370
1-4, Dioxano	0	0	36	350
Gasolina Blanca	3	0	4	8
n-Hexano	5	10	30	236
Octano	19	98	20	92
Pentano	16	250	46	292
Penteno	2	16	0	29
Petróleo	42	10	56	45
Tolueno	25	0	70	19
m-Xileno	0	2	2	2
p-Xileno	0	0	0	2

TABLA XI

Efecto de la presencia de los diferentes Hidrocarburos como única fuente de Carbono.

Condiciones:

Cultivos: Estáticos y Agitados.

pH del medio de cultivo: 6.0 - 6.5

Temperatura: 28°C - 30°C

Período de Incubación: 48 horas

Microorganismo: Pseudomona 8

Hidrocarburo	Turbidez		Turbidez	
	Medio No. 1		Medio No. 2	
	Cultivo Estático	Cultivo Agitado	Cultivo Estático	Cultivo Agitado
Benceno	2	0	27	0
Ciclo-Hexano	2	0	1	0
1-4, Dioxano	5	0	1	0
Gasolina Blanca	53	1	59	4
n-Hexano	9	0	11	5
Octano	15	95	20	45
Pentano	71	315	53	244
Penteno	50	20	18	21
Petróleo	57	440	68	385
Tolueno	0	0	0	0
m-Xileno	0	0	6	1
p-Xileno	0	0	9	0

TABLA XII

Efecto de la presencia de los diferentes Hidrocarburos como única fuente de Carbono.

Condiciones:

Cultivos: Estáticos y Agitados.

pH del medio de cultivo: 6.0 - 6.5

Temperatura: 28°C - 30°C

Período de Incubación: 48 horas.

Microorganismo: Pseudomona 9

Hidrocarburo	Turbidez		Turbidez	
	Medio No. 1		Medio No. 2	
	Cultivo Estático	Cultivo Agitado	Cultivo Estático	Cultivo Agitado
Benceno	0	8	0	8
Ciclo-Hexano	0	6	2	5
1-4, Dioxano	0	345	0	5
Gasolina Blanca	1	5	3	5
n-Hexano	54)	455	3 (161
Octano	30	27	17	40
Pentano	1	0	1	0
Penteno	0	0	3	4
Petróleo	0	320	48	37
Tolueno	0	0	8	0
m-Xileno	0	0	8	1
p-Xileno	9	0	2	0

TABLA XIII

Efecto que sobre el crecimiento tienen diferentes fuentes de Carbono (Dextrosa)

Microorganismo	Medio de Cultivo No.	Turbidez a diferentes concentraciones					
		0.5%	1.0%	1.5%	2.0%	3.0%	4.0%
P.aeruginosa I	2	560	640	590	585	540	550
P.aeruginosa II	2	455	495	510	500	500	455
P.aeruginosa III	1	495	600	590	580	560	550
Pseudomona 1	2	244	256	284	282	282	174
Pseudomona 2	2	206	182	170	165	292	148
Pseudomona 3	1	8	10	7	7	9	7
Pseudomona 4	2	121	120	128	118	305	102
Pseudomona 5	2	26	31	26	28	29	26
Pseudomona 6	2	1	0	0	0	0	0
Pseudomona 7	2	0	355	0	0	0	0
Pseudomona 8	1	305	177	196	164	325	3
Pseudomona 9	1	4	0	222	0	0	0

Condiciones:

8 veces media 2 con dextrosa

Agitación: 140 r.p.m.

4 " " 1 con 4

pH del medio de cultivo: 6.0 - 6.5

Temperatura de incubación: 28°C - 30°C

Período de incubación: 48 horas.

TABLA XIV

Efecto que sobre el crecimiento tienen diferentes fuentes de Carbono (Galactosa)

Microorganismo	Medio de Cultivo No.	Turbidez a diferentes concentraciones.					
		0.5%	1.0%	1.5%	2.0%	3.0%	4.0%
P.aeruginosa I	2	435	450	425	390	490	495
P.aeruginosa II	2	296	353	335	335	360	380
P.aeruginosa III	1	310	415	415	405	490	505
Pseudomona 1	2	208	216	228	248	264	280
Pseudomona 2	2	240	222	228	218	136	111
Pseudomona 3	1	3	8	6	3	6	6
Pseudomona 4	2	244	256	256	230	31	19
Pseudomona 5	2	34	24	8	4	0	0
Pseudomona 6	2	0	0	0	0	0	0
Pseudomona 7	2	0	0	0	0	0	0
Pseudomona 8	1	131	125	94	44	1	8
Pseudomona 9	1	2	2	440	1	0	6

Condiciones:

Agitación: 140 r.p.m.

pH del medio de cultivo: 6.0 - 6.5

Temperatura de incubación: 28°C - 30°C

Período de incubación: 48 horas.

TABLA XV

Efecto que sobre el crecimiento tienen diferentes fuentes de Carbono (Maltosa)

Microorganismos	Medio de Cultivo No.	Turbidez a diferentes concentraciones.					
		0.5%	1.0%	1.5%	2.0%	3.0%	4.0%
P.aeruginosa I	2	395	325	400	345	390	400
P.aeruginosa II	2	260	290	290	305	305	320
P.aeruginosa III	1	395	425	420	460	440	410
Pseudomona 1	2	92	206	290	70	268	260
Pseudomona 2	2	246	280	296	296	310	310
Pseudomona 3	1	6	14	8	7	9	6
Pseudomona 4	2	292	278	385	266	250	254
Pseudomona 5	2	31	29	27	30	24	26
Pseudomona 6	2	1	0	0	0	0	2
Pseudomona 7	2	0	200	0	0	0	0
Pseudomona 8	1	154	131	142	139	134	135
Pseudomona 9	1	0	0	2	3	0	2

Condiciones:

Agitación: 140 r.p.m.

pH del medio de cultivo: 6.0 - 6.5

Temperatura de incubación: 28°C - 30°C

Período de incubación: 48 horas.

TABLA XVI

Efecto que sobre el crecimiento tienen diferentes fuentes de Carbono (Manitol)

Microorganismo	Medio de Cultivo No.	Turbidez a diferentes concentraciones					
		0.5%	1.0%	1.5%	2.0%	3.0%	4.0%
P.aeruginosa I	2	620	690	710	640	640	600
P.aeruginosa II	2	730	790	670	560	530	510
P.aeruginosa III	1	580	610	610	590	590	590
Pseudomona 1	2	254	355	360	340	360	350
Pseudomona 2	2	236	230	226	216	202	198
Pseudomona 3	1	4	6	6	5	0	2
Pseudomona 4	2	252	256	250	234	214	236
Pseudomona 5	2	160	138	117	101	84	80
Pseudomona 6	2	2	1	0	3	0	0
Pseudomona 7	2	250	1	0	2	0	0
Pseudomona 8	1	140	148	145	115	137	136
Pseudomona 9	1	3	1	0	0	0	1

Condiciones:

Agitación: 140 r.p.m.

pH del medio de cultivo: 6.0 - 6.5

Temperatura de incubación: 28°C - 30°C

Período de incubación: 48 horas.

TABLA XVII

Efecto que sobre el crecimiento tienen diferentes fuentes de Carbono (Sacarosa)

Microorganismo	Medio de Cultivo No.	Turbidez a diferentes concentraciones					
		0.5%	1.0%	1.5%	2.0%	3.0%	4.0%
P.aeruginosa I	2	405	400	400	405	390	365
P.aeruginosa II	2	222	220	220	222	230	232
P.aeruginosa III	1	420	415	445	440	450	445
Pseudomona 1	2	310	315	300	305	305	305
Pseudomona 2	2	250	210	218	188	305	189
Pseudomona 3	1	6	5	5	6	5	4
Pseudomona 4	2	145	150	192	232	274	286
Pseudomona 5	2	118	146	143	141	164	148
Pseudomona 6	2	5	0	370	430	0	0
Pseudomona 7	2	3	0	2	0	0	1
Pseudomona 8	1	310	143	147	154	153	144
Pseudomona 9	1	0	1	0	1	1	0

Condiciones:

Agitación: 140 r.p.m.

pH del medio de cultivo: 6.0 - 6.5

Temperatura de incubación: 28°C - 30°C

Período de incubación: 48 horas.

TABLA XVIII

Efecto que sobre el crecimiento tiene combinadamente el Hidrocarburo con la mejor fuente de Carbono.

Microorganismo	Hidrocarburo	Carbohidrato Conc.	Turbidez	Pigmento
P.aeruginosa I	Petróleo	Manitol 1.5%	1,000	Morado
P.aeruginosa II	Pentano	Manitol 1.0%	680	Amarillo lechoso
P.aeruginosa III	Ciclo-Hexano	Manitol 1.0%	520	Café verdoso
Pseudomona 1	Pentano	Manitol 1.5%	4 ←	
Pseudomona 2	Petróleo	Maltoza 3.0%	330	Rosa Lechoso
Pseudomona 3	Petróleo	Maltoza 1.0%	490	Blanco Lechoso
Pseudomona 4	Pentano	Maltoza 1.5%	20	
Pseudomona 5	n-Hexano	Sacarosa 3.0%	83	Poco turbio y espumoso.
Pseudomona 6	Gas, Blanca	Sacarosa 2.0%	680	Blanco lechoso
Pseudomona 7	Ciclo-Hexano	Dextrosa 1.0%	0 ←	
Pseudomona 8	Petróleo	Dextrosa 3.0%	190	Rosa muy pálido lechoso.
Pseudomona 9	n-Hexano	Galactosa 1.5%	0 ←	

Condiciones:

Agitación 140 r.p.m.

pH del medio de cultivo: 6.0 - 6.5

Temperatura de incubación: 28°C - 30°C

Período de incubación: 48 horas

*Cómo separar la absorción
debida a al pigmento?*

TABLA XIX

Efecto que sobre el crecimiento tiene combinadamente el Hidrocarburo con diferentes fuentes de Nitrógeno.

Microorganismo	Hidrocarburo	Turbidez a diferentes concentraciones de: Na NO ₃					
		0.5%	1.0%	1.5%	2.0%	3.0%	4.0%
P.aeruginosa I	Petróleo	480	548	435	510	350	450
P.aeruginosa II	Pentano	355	345	340	415	430	17
P.aeruginosa III	Ciclo-Hexano	224	232	310	335	0	0
Pseudomona 1	Pentano	0	0	0	0	2	0
Pseudomona 2	Petróleo	312	234	185	260	220	212
Pseudomona 3	Petróleo	440	465	400	380	375	250
Pseudomona 4	Pentano	0	0	0	0	3	0
Pseudomona 5	n-Hexano	4	8	9	3	4	9
Pseudomona 6	Gasolina Blanca	700	700	660	680	680	680
Pseudomona 7	Ciclo-Hexano	0	0	20	3	0	0
Pseudomona 8	Petróleo	254	242	167	360	365	268
Pseudomona 9	n-Hexano	0	2	10	0	0	0

Condiciones:

Agitación: 140 R.P.M.

pH del medio de cultivo: 6.0 - 6.5

Temperatura de incubación: 28°C - 30°C

Período de incubación: 48 horas

TABLA XX

Efecto que sobre el crecimiento tiene combinadamente el Hidrocarburo con diferentes fuentes de Nitrógeno.

Microorganismo	Hidrocarburo	Turbidez a diferentes concentraciones de: KNO_3					
		0.5%	1.0%	1.5%	2.0%	3.0%	4.0%
P.aeruginosa I	Petróleo	238	228	380	350	370	385
P.aeruginosa II	Pentano	282	296	303	375	435	430
P.aeruginosa III	Ciclo-Hexano	280	305	320	350	430	0
Pseudomona 1	Pentano	185	174	10	8	6	7
Pseudomona 2	Petróleo	256	248	214	131	137	155
Pseudomona 3	Petróleo	420	380	325	335	210	124
Pseudomona 4	Pentano	2	1	1	1	2	1
Pseudomona 5	n-Hexano	350	355	26	15	0	22
Pseudomona 6	Gasolina Bca.	480	400	380	390	350	300
Pseudomona 7	Ciclo-Hexano	0	2	10	10	1	0
Pseudomona 8	Petróleo	296	310	335	266	194	69
Pseudomona 9	n-Hexano	2	10	20	2	0	0

Condiciones:

Agitación: 140 r.p.m.

pH del medio de cultivo: 6.0 - 6.5

Temperatura de incubación: 28°C - 30°C

Período de incubación: 48 horas.

TABLA XXI

Efecto que sobre el crecimiento tiene combinadamente el Hidrocarburo con diferentes fuentes de Nitrógeno.

Microorganismo	Hidrocarburo	Turbidez a diferentes concentraciones de: NH_4NO_3					
		0.5%	1.0%	1.5%	2.0%	3.0%	4.0%
P.aeruginosa I	Petróleo	650	510	510	540	385	335
P.aeruginosa II	Pentano	335	345	400	370	11	0
P.aeruginosa III	Ciclo-Hexano	226	290	335	296	0	0
Pseudomona 1	Pentano	0	2	0	0	1	0
Pseudomona 2	Petróleo	234	220	202	224	220	240
Pseudomona 3	Petróleo	296	315	222	270	280	260
Pseudomona 4	Pentano	0	0	0	0	1	0
Pseudomona 5	n-Hexano	5	0	3	0	31	0
Pseudomona 6	Gasolina Bea.	400	500	450	480	490	480
Pseudomona 7	Ciclo-Hexano	0	2	0	0	1	1
Pseudomona 8	Petróleo	360	330	330	190	286	246
Pseudomona 9	n-Hexano	0	4	3	0	0	0

Condiciones:

Agitación: 140 r.p.m.

pH del medio de cultivo: 6.0 - 6.5

Temperatura de incubación: 28°C - 30°C

Período de incubación: 48 horas.

TABLA XXII

Efecto que sobre el crecimiento tiene combinadamente el Hidrocarburo con diferentes fuentes de Nitrógeno.

Microorganismo	Hidrocarburo	Turbidez a diferentes concentraciones de: NH_4 <i>el</i>					
		0.5%	1.0%	1.5%	2.0%	3.0%	4.0%
P.aeruginosa I	Petróleo	415	420	410	405	365	475
P.aeruginosa II	Pentano	385	395	400	415	286	0
P.aeruginosa III	Ciclo-Hexano	380	390	410	390	0	0
Pseudomona 1	Pentano	5	0	0	1	0	4
Pseudomona 2	Petróleo	224	206	220	111	185	185
Pseudomona 3	Petróleo	330	490	230	315	248	192
Pseudomona 4	Pentano	3	0	0	5	3	1
Pseudomona 5	n-Hexano	96	290	38	194	23	37
Pseudomona 6	Gasolina Bca.	700	420	660	680	690	680
Pseudomona 7	Ciclo-Hexano	20	30	40	20	10	10
Pseudomona 8	Petróleo	0	218	218	240	110	80
Pseudomona 9	n-Hexano	4	2	4	0	0	0

Condiciones:

Agitación: 140 r.p.m.

pH del medio de cultivo: 6.0 - 6.5

Temperatura de incubación: 28°C - 30°C

Período de incubación: 48 horas.

TABLA XXIII

Efecto que sobre el crecimiento tiene combinadamente el Hidrocarburo con diferentes fuentes de Nitrógeno.

Microorganismo	Hidrocarburo	Turbidez a diferentes concentraciones de: $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$					
		0.5%	1.0%	1.5%	2.0%	3.0%	4.0%
P.aeruginosa I	Petróleo	450	395	440	345	350	355
P.aeruginosa II	Pentano	305	345	365	380	375	375
P.aeruginosa III	Ciclo-Hexano	330	375	405	365	420	174
Pseudomona 1	Pentano	190	214	136	4	0	1
Pseudomona 2	Petróleo	185	76	90	117	70	79
Pseudomona 3	Petróleo	500	415	558	234	390	16
Pseudomona 4	Pentano	0	0	0	0	0	0
Pseudomona 5	n-Hexano	25	18	7	24	35	34
Pseudomona 6	Gasolina Bca.	0	0	10	15	10	5
Pseudomona 7	Ciclo-Hexano	10	15	20	10	10	10
Pseudomona 8	Petróleo	465	135	284	228	8	8
Pseudomona 9	n-Hexano	5	20	15	10	0	1

Condiciones:

Agitación: 140 r.p.m.

pH del medio de cultivo: 6.0 - 6.5

Temperatura de incubación: 28°C - 30°C

Período de incubación: 48 horas.

TABLA XXIV

Efecto que sobre el crecimiento tiene combinadamente el Hidrocarburo con diferentes fuentes de Nitrógeno.

Microorganismo	Hidrocarburo	Turbidez a diferentes concentraciones de: Urea					
		0.5%	1.0%	1.5%	2.0%	3.0%	4.0%
P.aeruginosa I	Petróleo	475	460	410	335	130	81
P.aeruginosa II	Pentano	435	440	410	360	70	0
P.aeruginosa III	Ciclo-Hexano	380	345	305	117	5	0
Pseudomona 1	Pentano	29	28	27	18	3	0
Pseudomona 2	Petróleo	238	138	160	64	60	54
Pseudomona 3	Petróleo	135	244	305	171	345	103
Pseudomona 4	Pentano	0	8	3	3	3	0
Pseudomona 5	n-Hexano	24	13	18	14	24	16
Pseudomona 6	Gasolina Blanca	0	0	8	10	0	0
Pseudomona 7	Ciclo-Hexano	5	20	10	8	0	0
Pseudomona 8	Petróleo	115	105	87	113	294	67
Pseudomona 9	n-Hexano	0	0	8	10	0	0

Condiciones:

Agitación: 140 r.p.m.

pH del medio de cultivo: 6.0 - 6.5

Temperatura de incubación: 28°C - 30°C

Período de incubación: 48 horas.

GRAFICA N° 1

Efecto de las diferentes fuentes de carbón

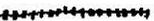
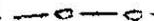
Microorganismo: Pseudomona aeruginosa I

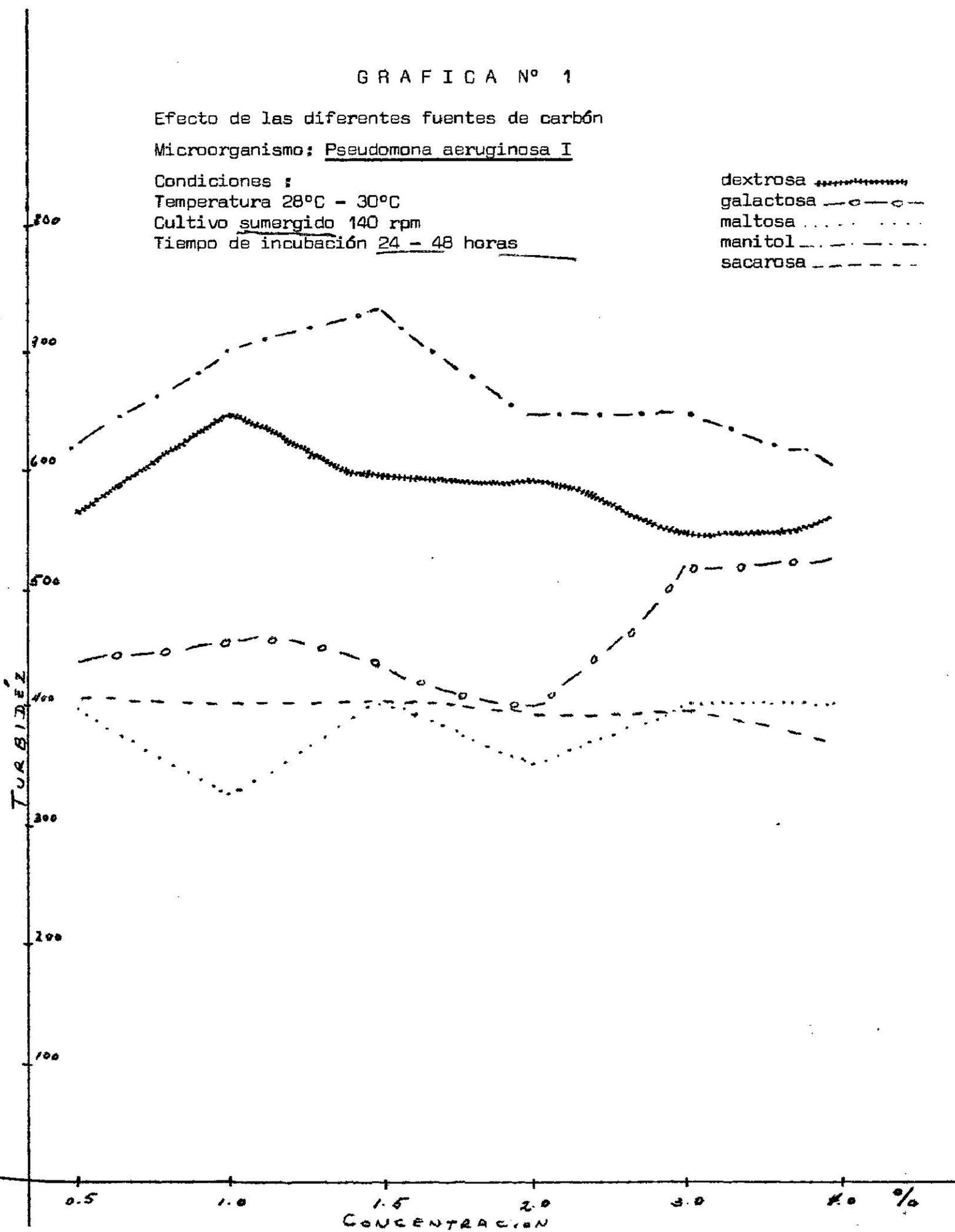
Condiciones :

Temperatura 28°C - 30°C

Cultivo sumergido 140 rpm

Tiempo de incubación 24 - 48 horas

dextrosa 
galactosa 
maltosa 
manitol 
sacarosa 



GRAFICA N° 2

Efecto de las diferentes fuentes de carbón

Microorganismo: Pseudomona aeruginosa II

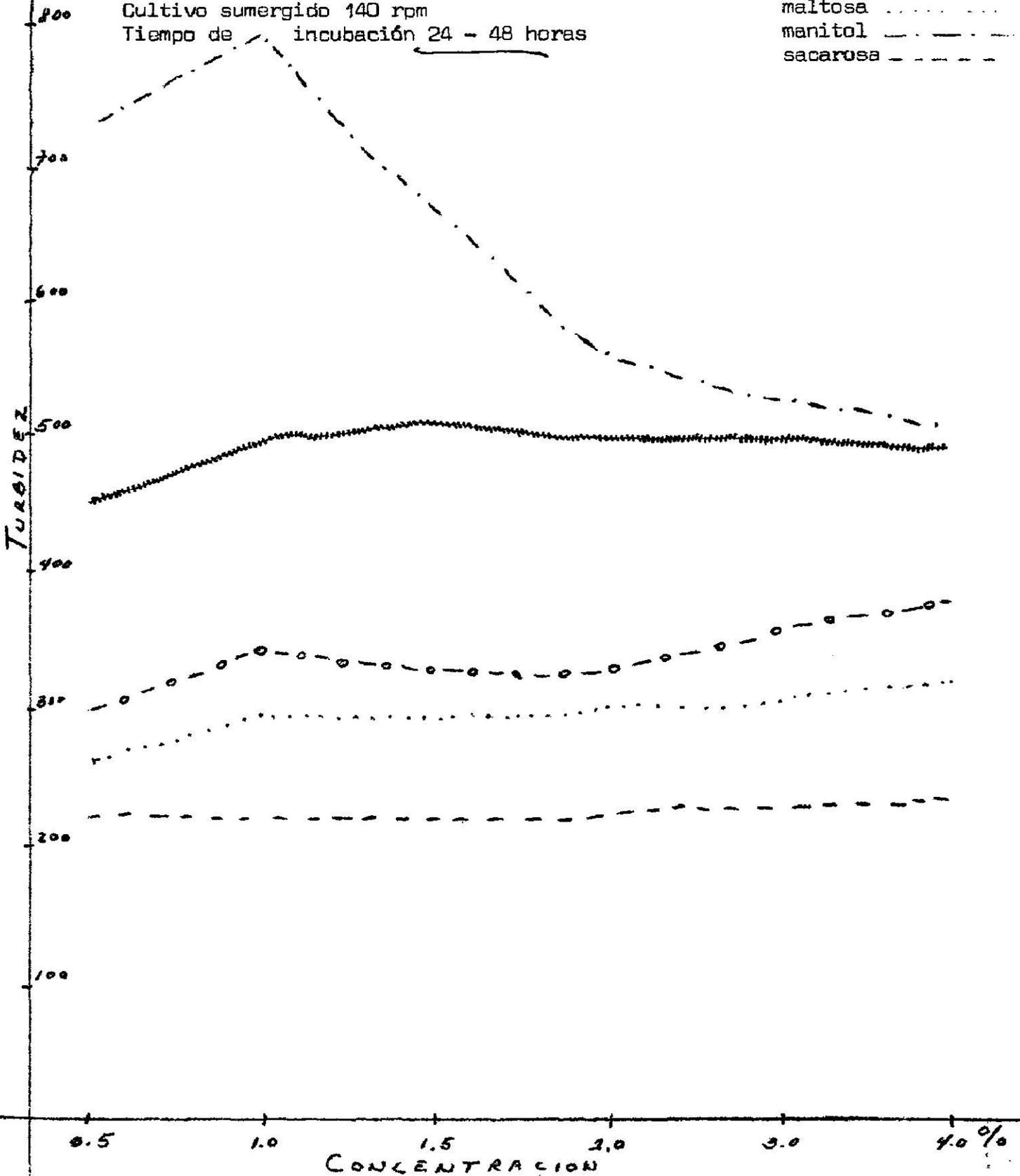
Condiciones :

Temperatura : 28°C - 30°C

Cultivo sumergido 140 rpm

Tiempo de incubación 24 - 48 horas

dextrosa
galactosa ---o---
maltosa
manitol
sacarosa - - - -



GRAFICA N° 3

Efecto de las diferentes fuentes de carbón.

Microorganismo : Pseudomona aeruginosa III

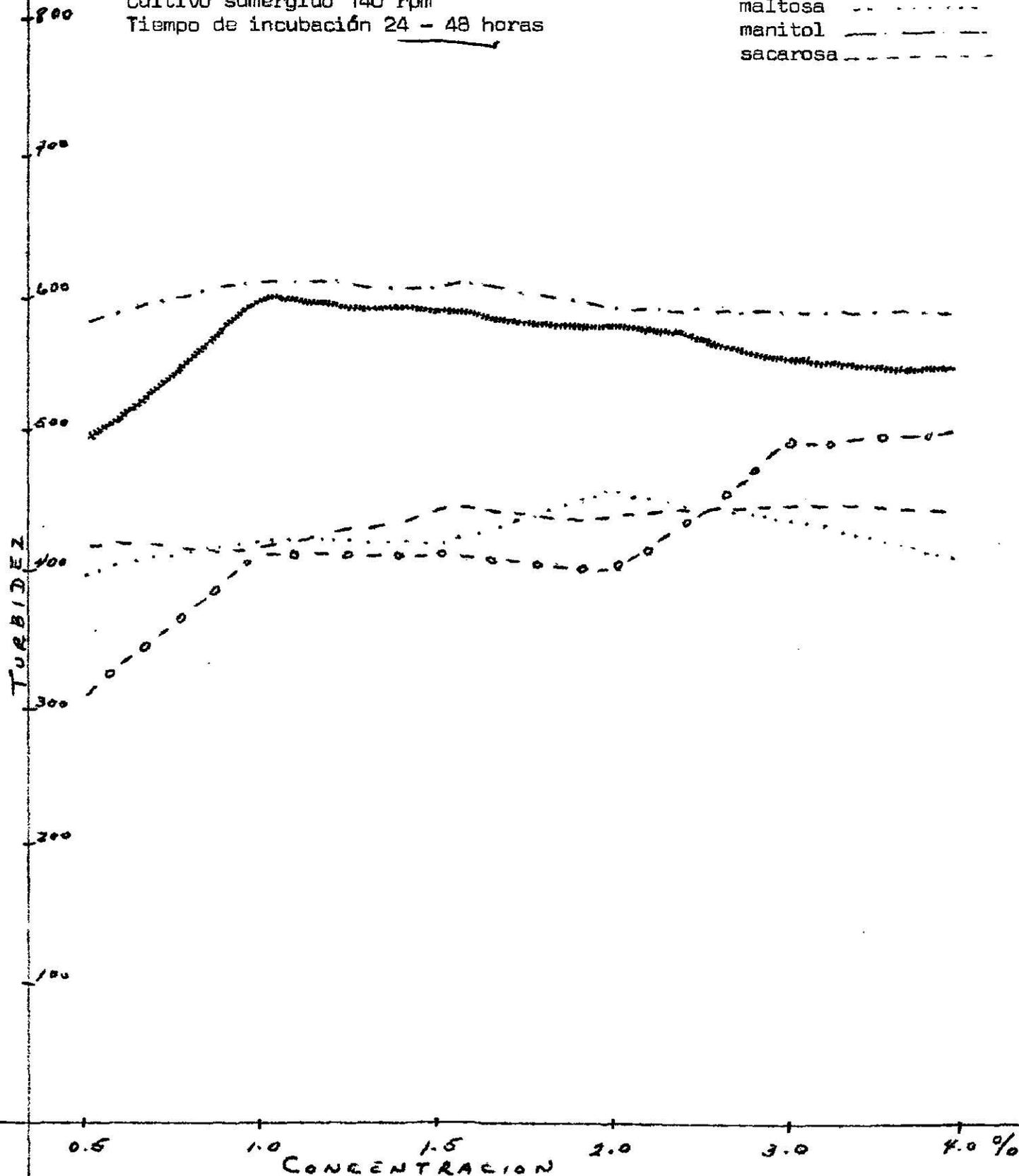
Condiciones :

Temperatura 28°C - 30°C

Cultivo sumergido 140 rpm

Tiempo de incubación 24 - 48 horas

dextrosa - - - - -
galactosa - - - - -
maltosa - - - - -
manitol - - - - -
sacarosa - - - - -



GRAFICA N° 4

Efecto de las diferentes fuentes de carbón.

Microorganismo : Pseudomona 1

Condiciones :

Temperatura 20°C - 30°C

Cultivo sumergido 140 rpm

Tiempo de incubación 24 - 48 horas

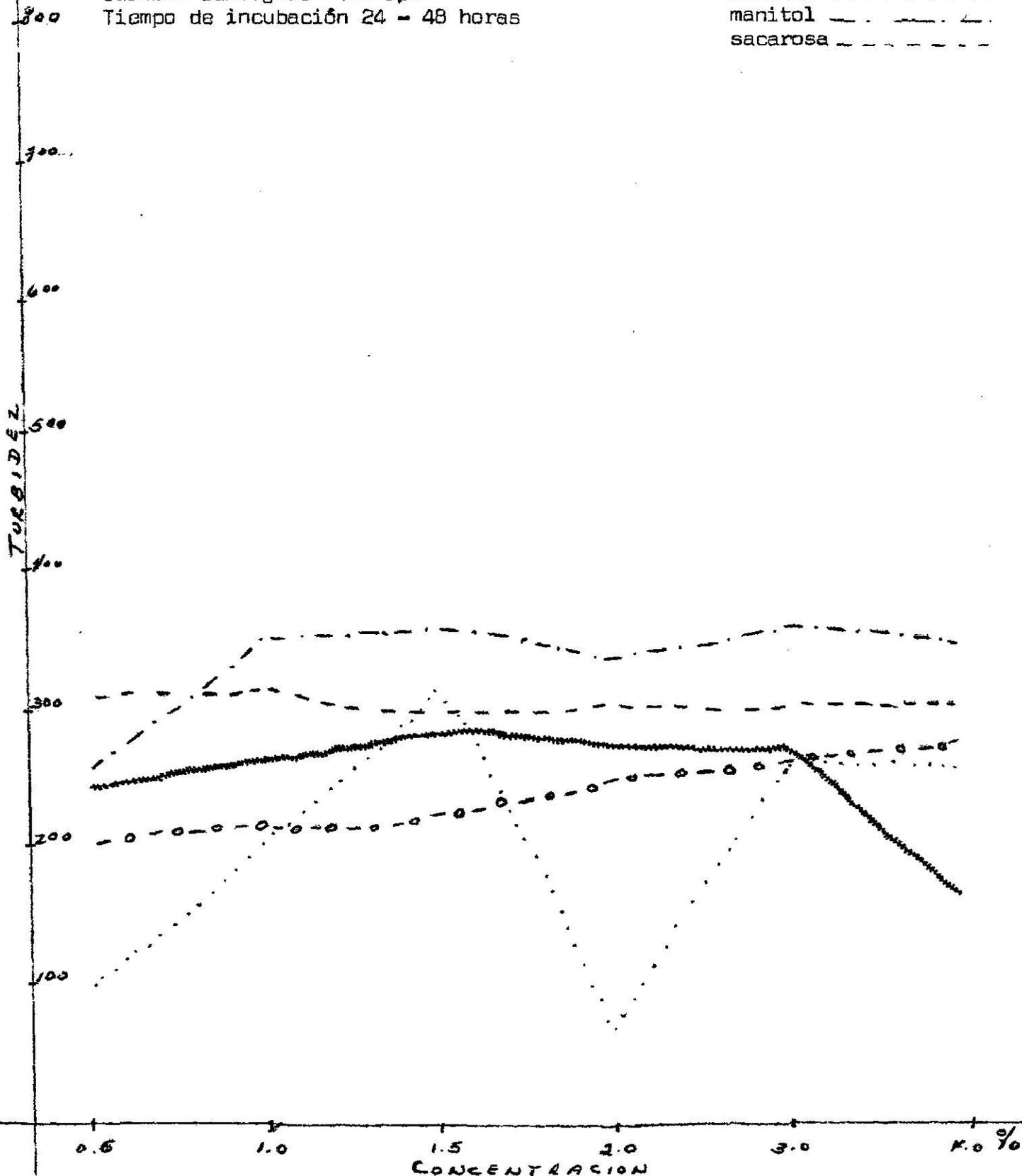
dextrosa 

galactosa 

maltosa 

manitol 

sacarosa 



GRAFICA N° 5

Efectos de las diferentes fuentes de carbón.

Microorganismo : Pseudomona 2

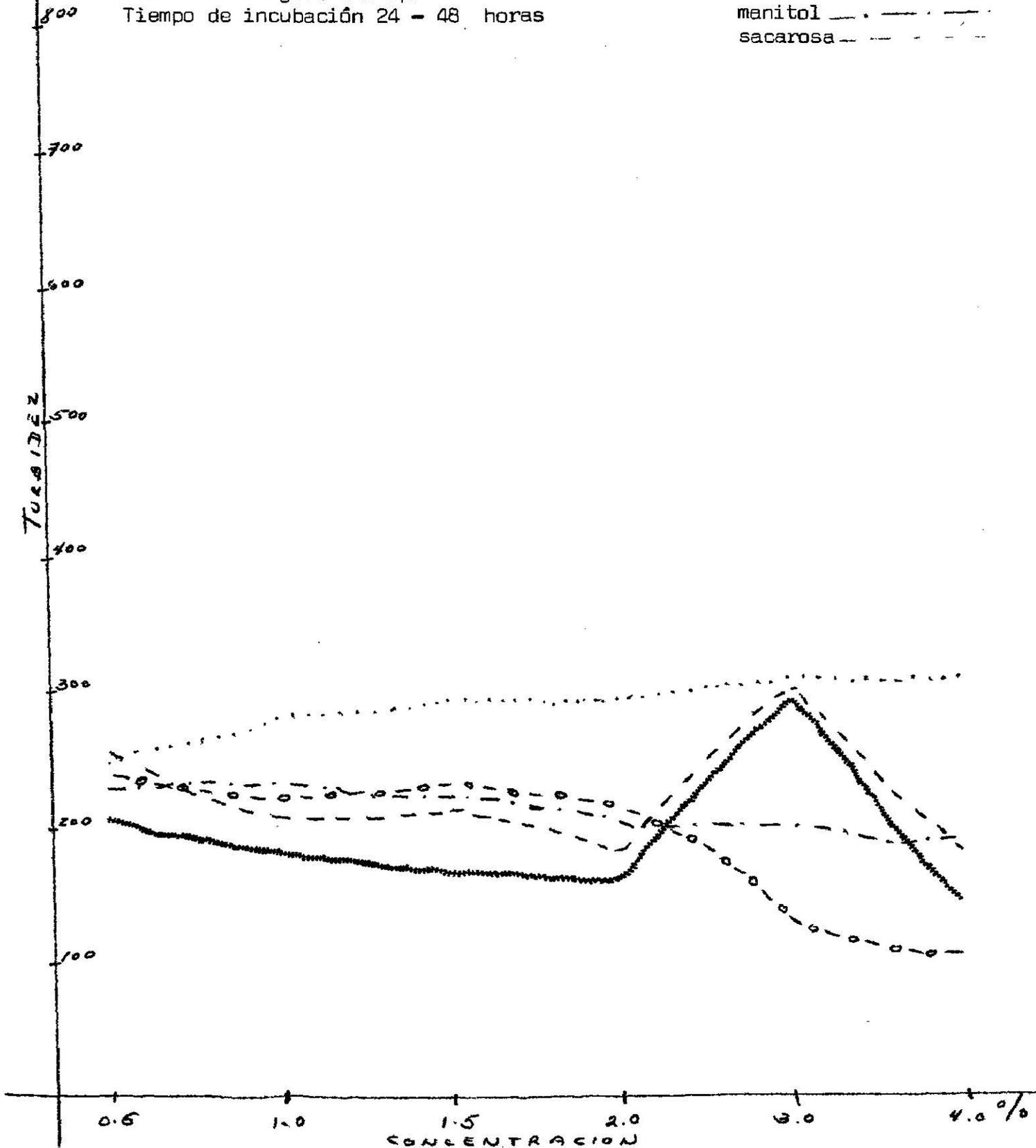
Condiciones :

Temperatura 28°C - 30°C

Cultivo sumergido 140 rpm

Tiempo de incubación 24 - 48 horas

dextrosa
galactosa — o — o —
maltosa
manitol — — — — —
sacarosa — — — — —



GRAFICA N° 6

Efecto de las diferentes fuentes del carbón.

Microorganismo : Pseudomona 3

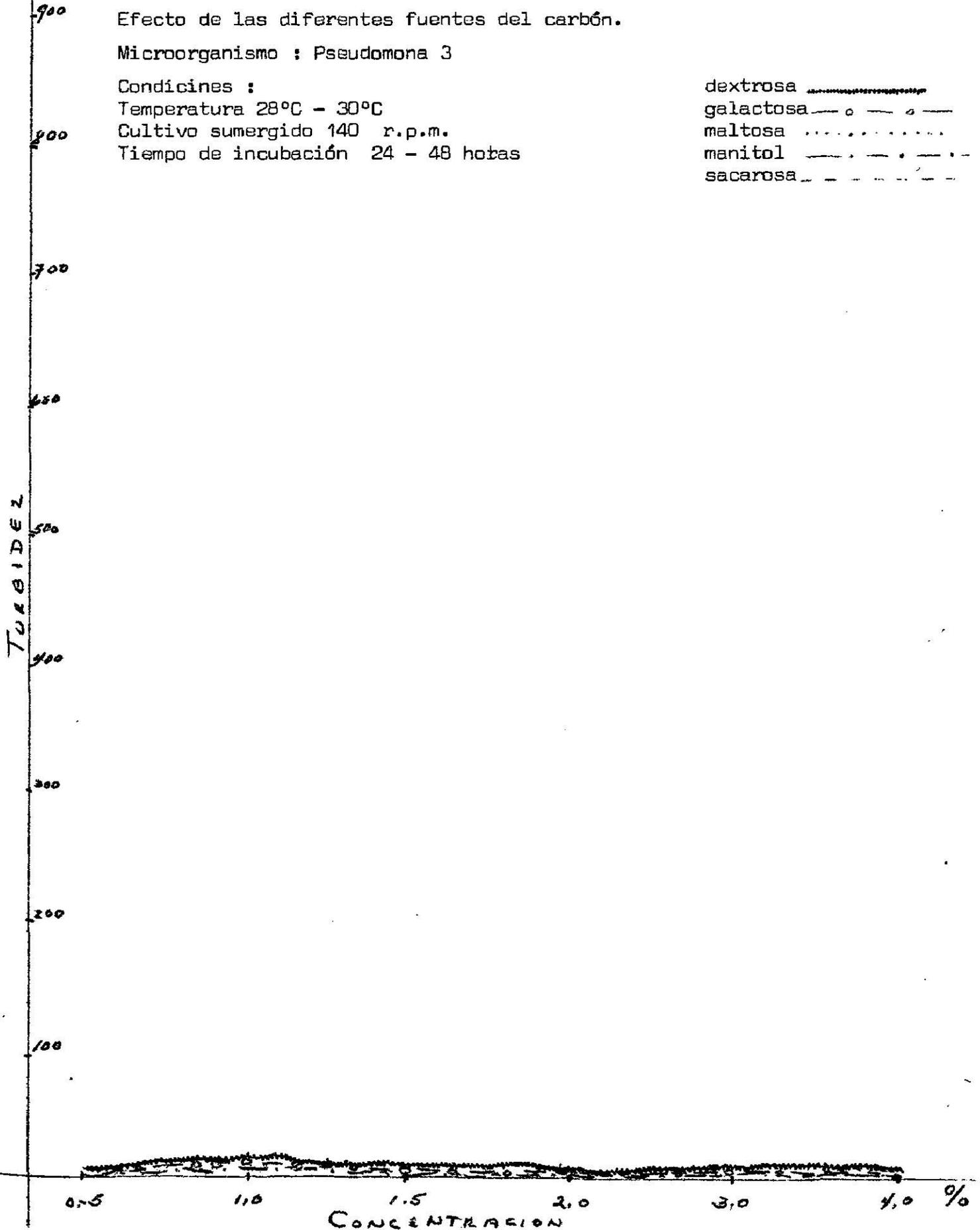
Condiciones :

Temperatura 28°C - 30°C

Cultivo sumergido 140 r.p.m.

Tiempo de incubación 24 - 48 horas

dextrosa
galactosa — o — o —
maltosa
manitol — . — . — .
sacarosa — — — — —



GRAFICA N° 7

Efectos de las diferentes fuentes de carbón.

Microorganismo : Pseudomona 4

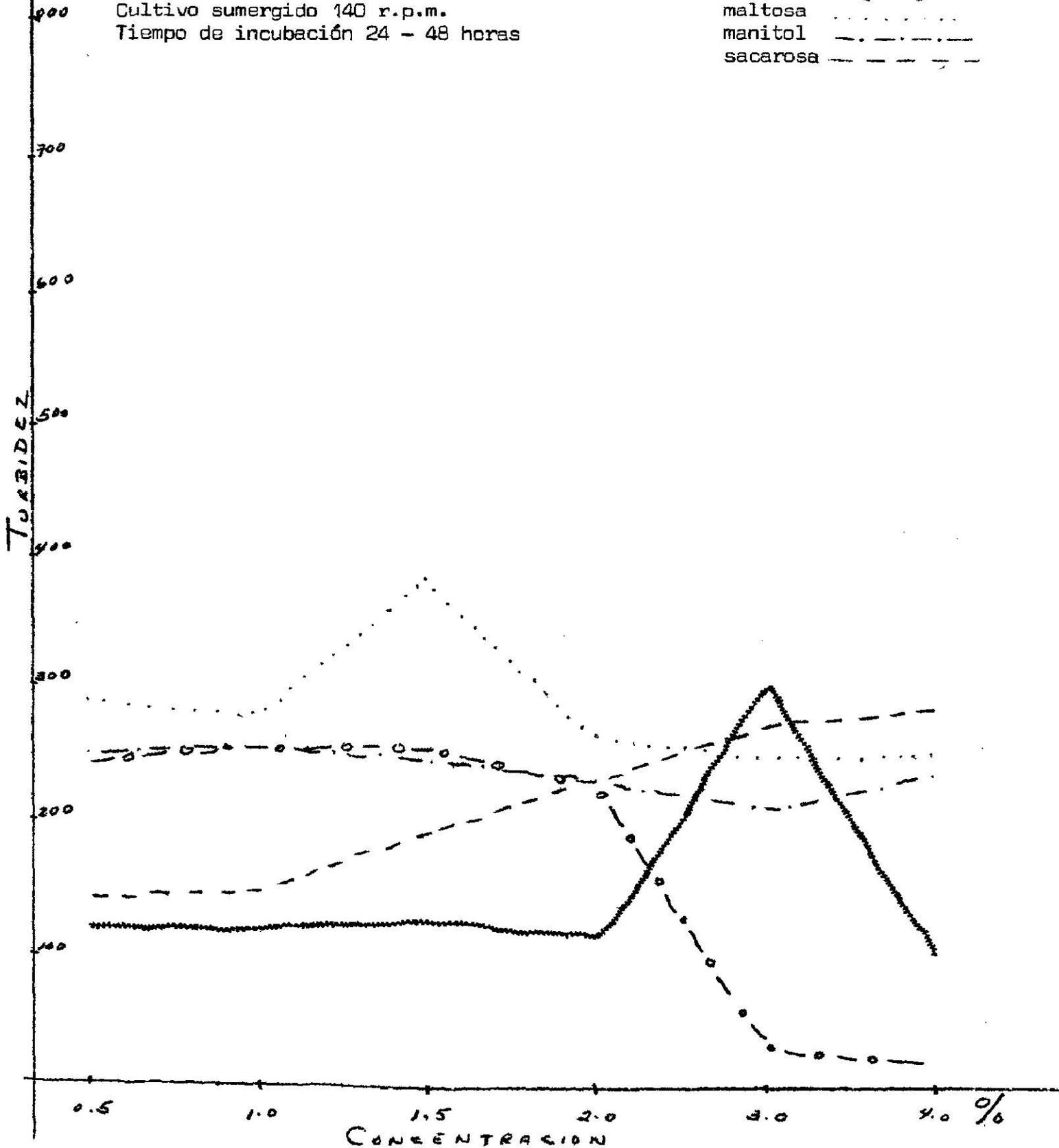
Condiciones :

Temperatura : 28°C - 30°C

Cultivo sumergido 140 r.p.m.

Tiempo de incubación 24 - 48 horas

dextrosa ————
galactosa — o — o —
maltosa
manitol - - - - -
sacarosa — — — — —



GRAFICA N° 8

Efecto de las diferentes fuentes de carbón.

Microorganismo : Pseudomona 5

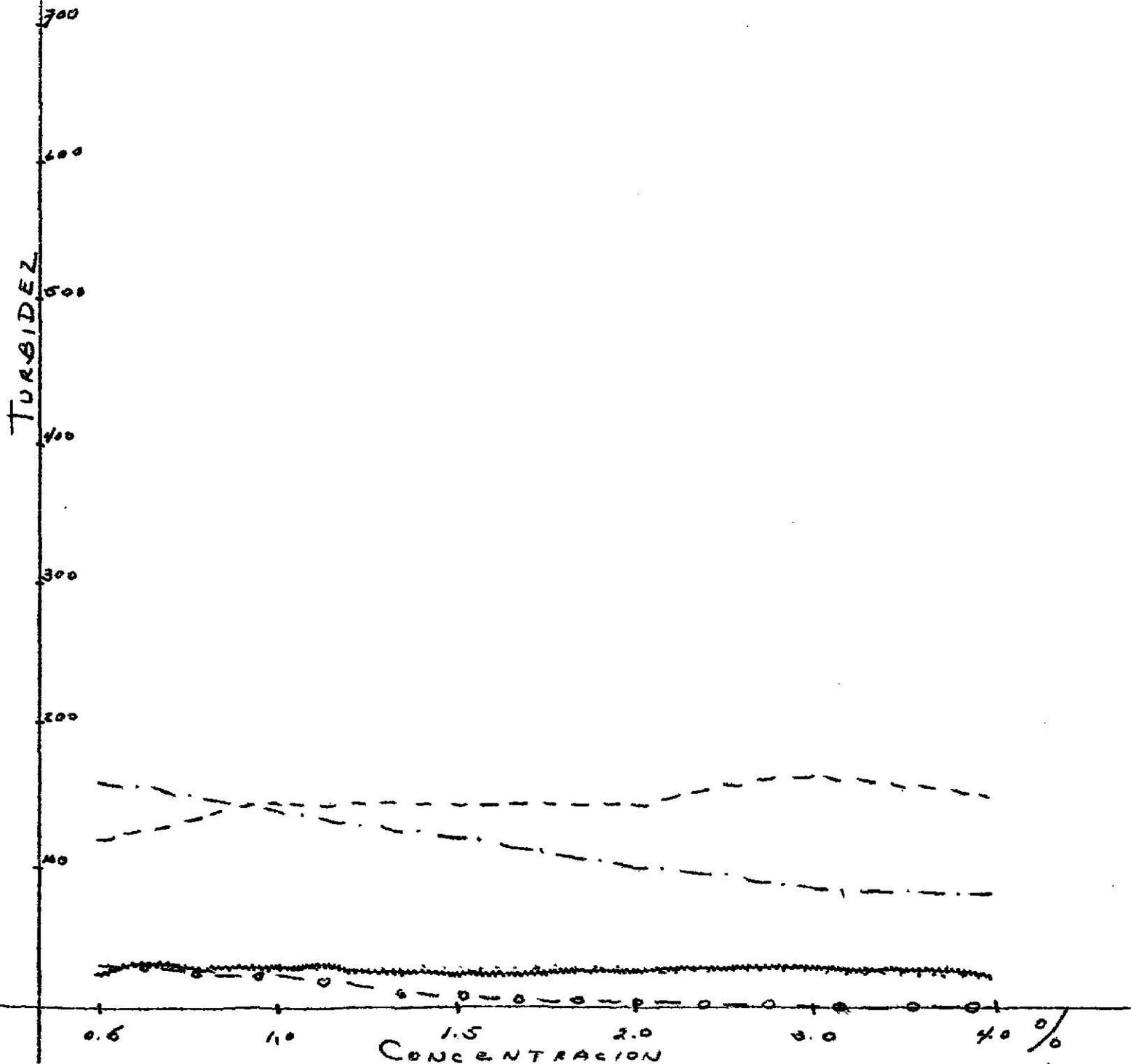
Condiciones :

Temperatura 28°C - 30°C

Cultivo sumergido 140 r.p.m.

Tiempo de incubación 24 - 48 horas

dextrosa
galactosa ---o---
maltosa
manitol
sacarosa --- ---



GRAFICA N° 9

Efecto de las diferentes fuentes de carbón.

Microorganismo : Pseudomona 6

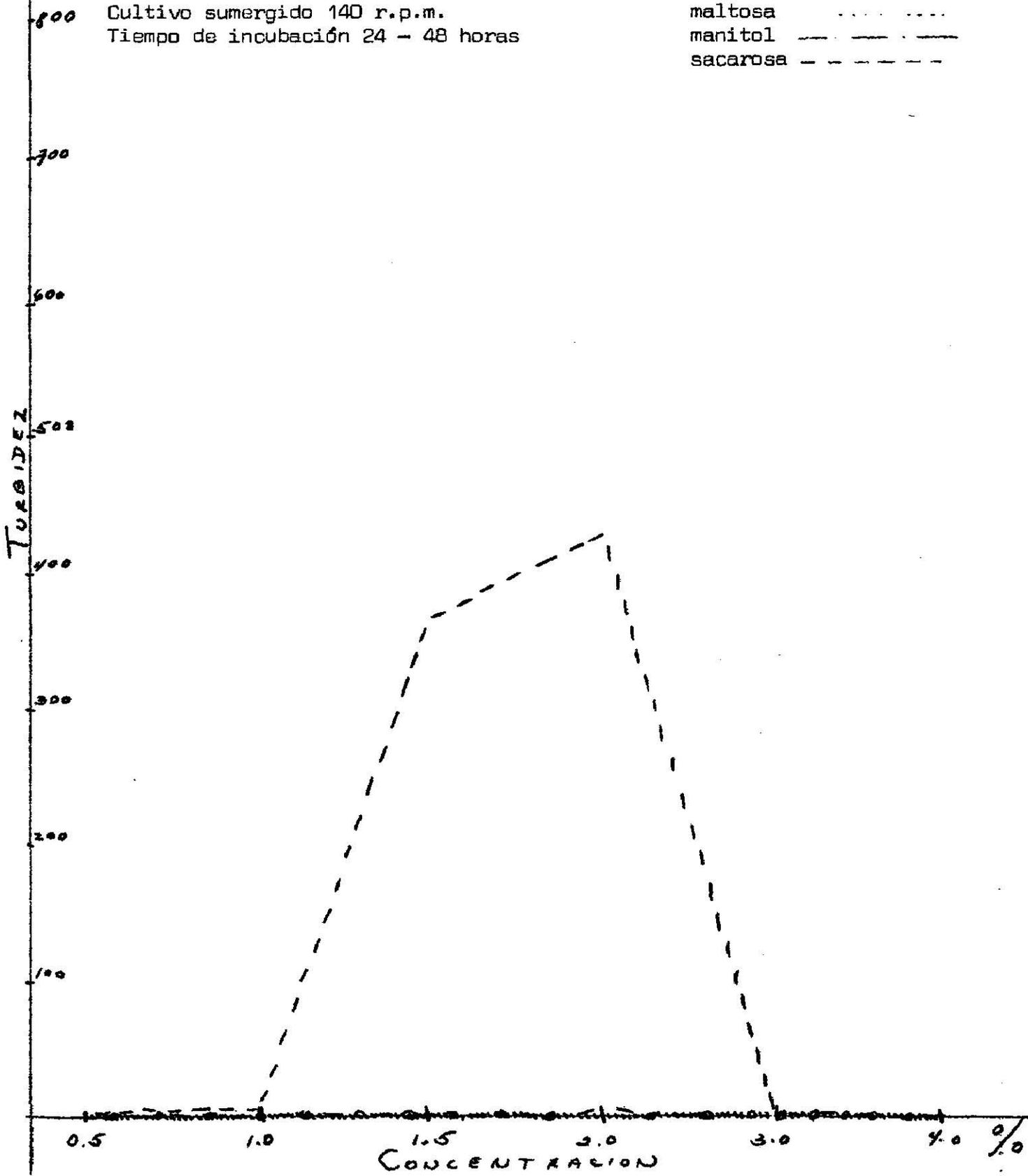
Condiciones :

Temperatura : 28°C - 30°C

Cultivo sumergido 140 r.p.m.

Tiempo de incubación 24 - 48 horas

dextrosa - - - - -
galactosa - o - o -
maltosa
manitol - - - - -
sacarosa - - - - -



GRAFICA N° 10

Efecto de las diferentes fuentes de carbón.

Microorganismo : Pseudomona 7

Condiciones :

Temperatura : 28°C - 30°C

Cultivo sumergido 140 r.p.m:

Tiempo de incubación 24 - 48 horas

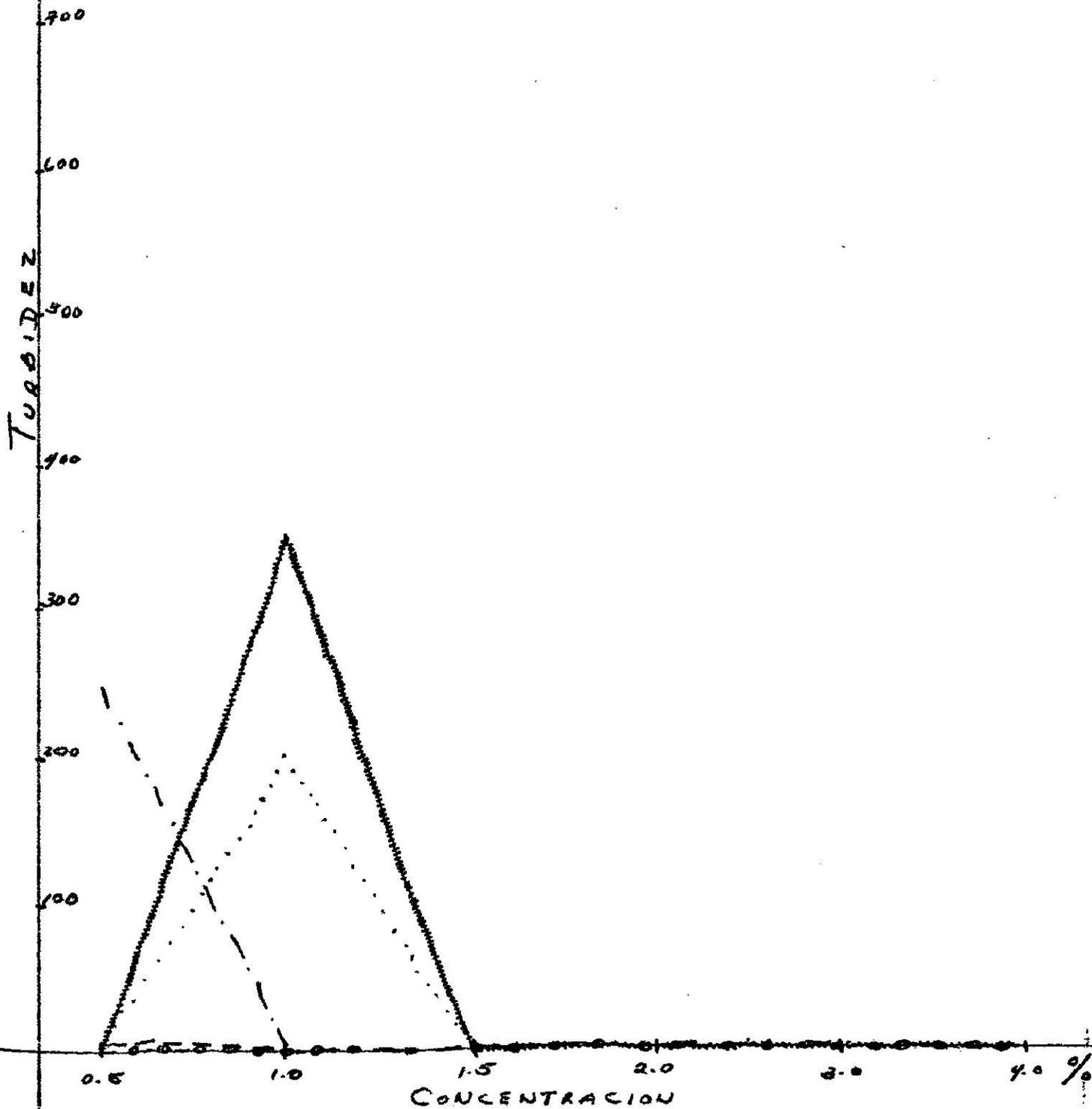
dextrosa

galactosa ---o---o---

maltosa

manitol --- --- ---

sacarosa



GRAFICA N° 11

Efecto de las diferentes fuentes de carbón.

Microorganismo : Pseudomona 8

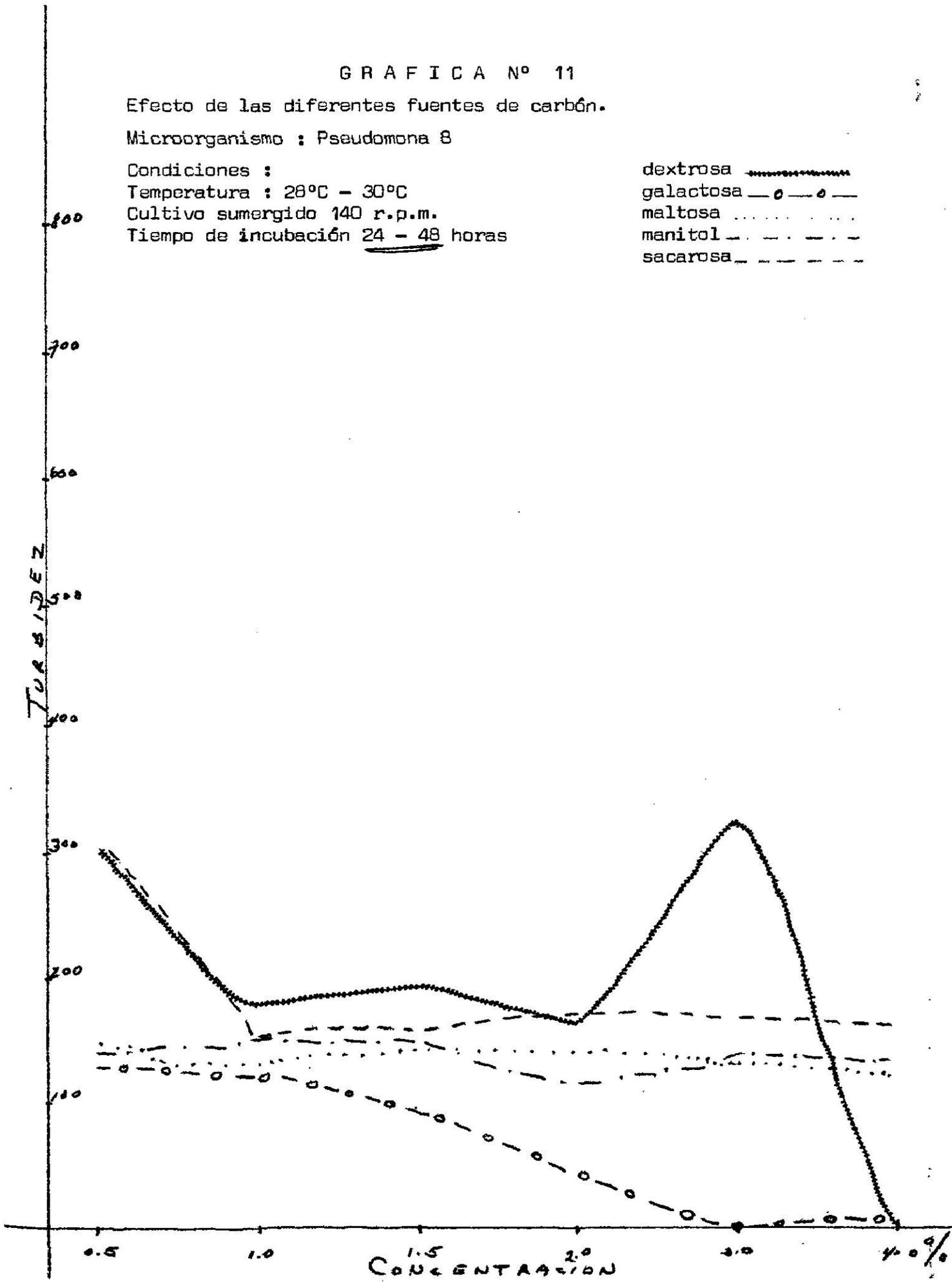
Condiciones :

Temperatura : 28°C - 30°C

Cultivo sumergido 140 r.p.m.

Tiempo de incubación 24 - 48 horas

dextrosa
galactosa _o_o_
maltosa
manitol _ _ _ _
sacarosa _ _ _ _



GRAFICA N° 12

Efecto de las diferentes fuentes de carbón.

Microorganismo : Pseudomona 9

Condiciones :

Temperatura : 28°C - 30°C

Cultivo sumergido 140 r.p.m.

Tiempo de incubación 24 - 48 horas

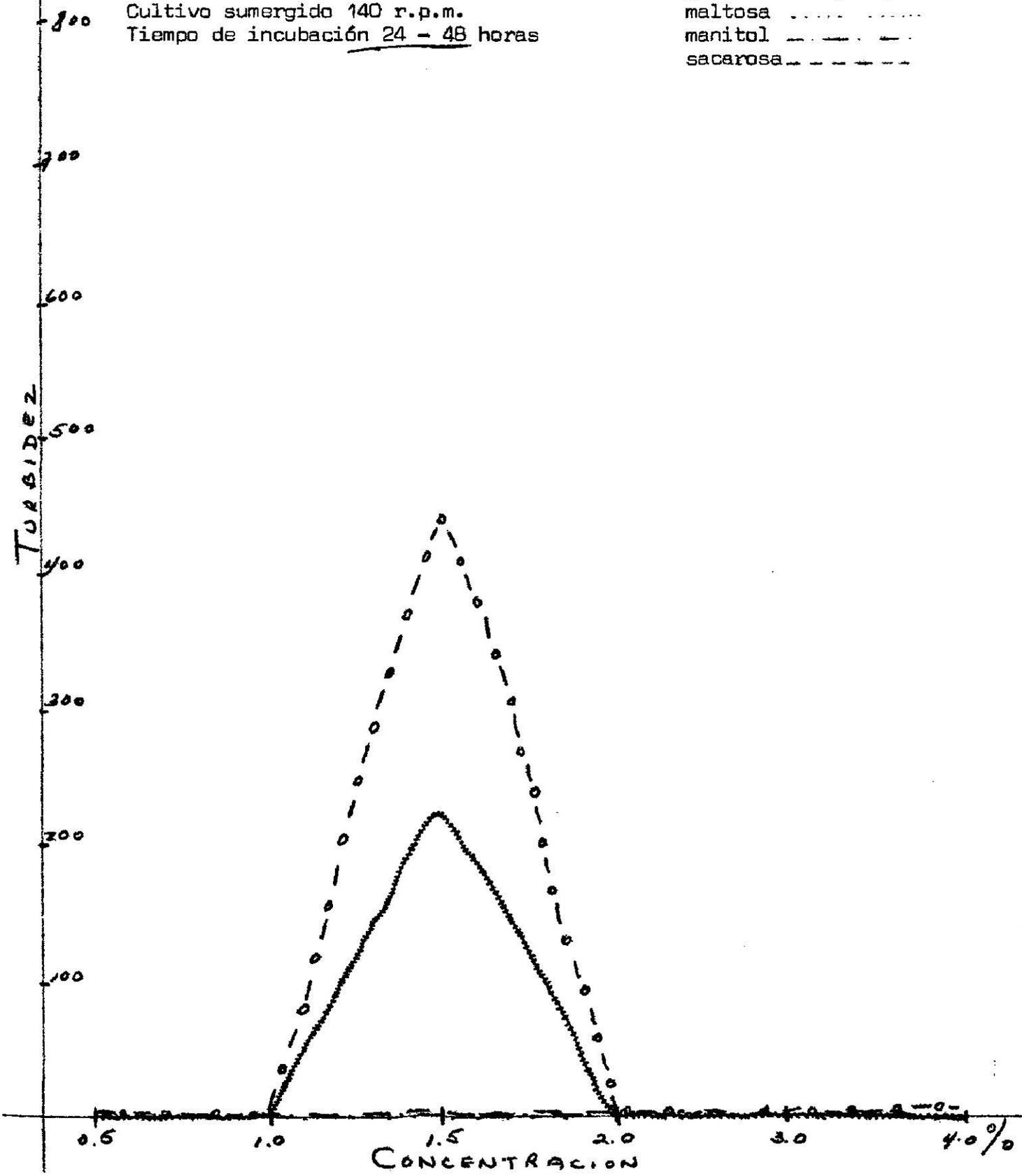
dextrosa - - - - -

galactosa - - - - -

maltosa - - - - -

manitol - - - - -

sacarosa - - - - -



GRAFICA N° 13

Efecto de las diferentes fuentes de nitrógeno

Microorganismo : Pseudomona aeruginosa I

Condiciones :

Temperatura : 28°C - 30°C

Cultivo sumergido 140 r.p.m.

Tiempo de incubación 24 - 48 horas

NaNO_3 . ooooooo

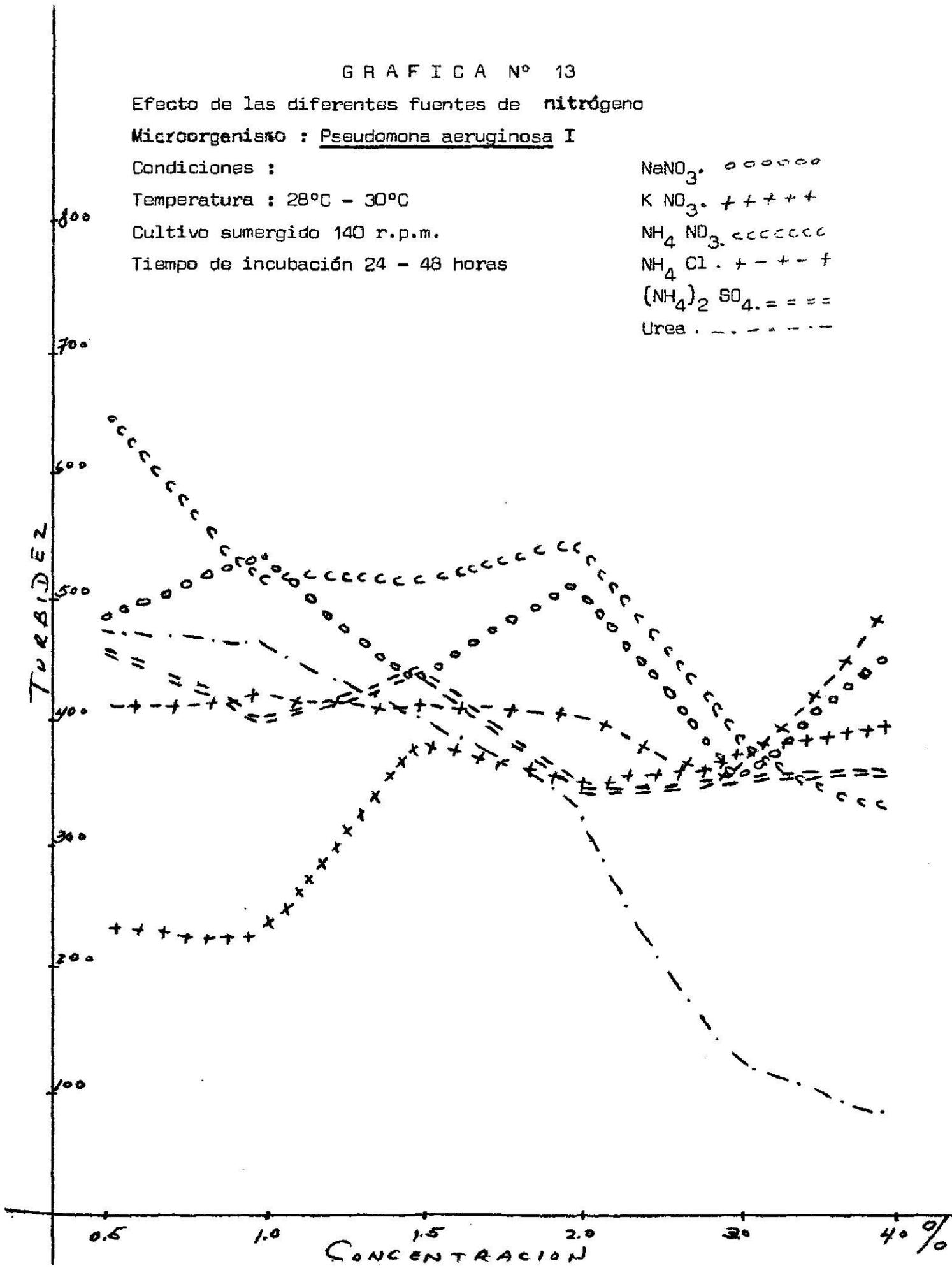
KNO_3 . ++++++

NH_4NO_3 . cccccccc

NH_4Cl . +-+-+

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. ===

Urea . - - - - -



GRAFICA N° 14

Efecto de las diferentes fuentes de nitrógeno

Microorganismo : Pseudomona aeruginosa II

Condiciones :

Temperatura : 28°C - 30°C

Cultivo sumergido 140 r.p.m.

Tiempo de incubación : 24 - 48 horas

Na NO₃ . ooooooo

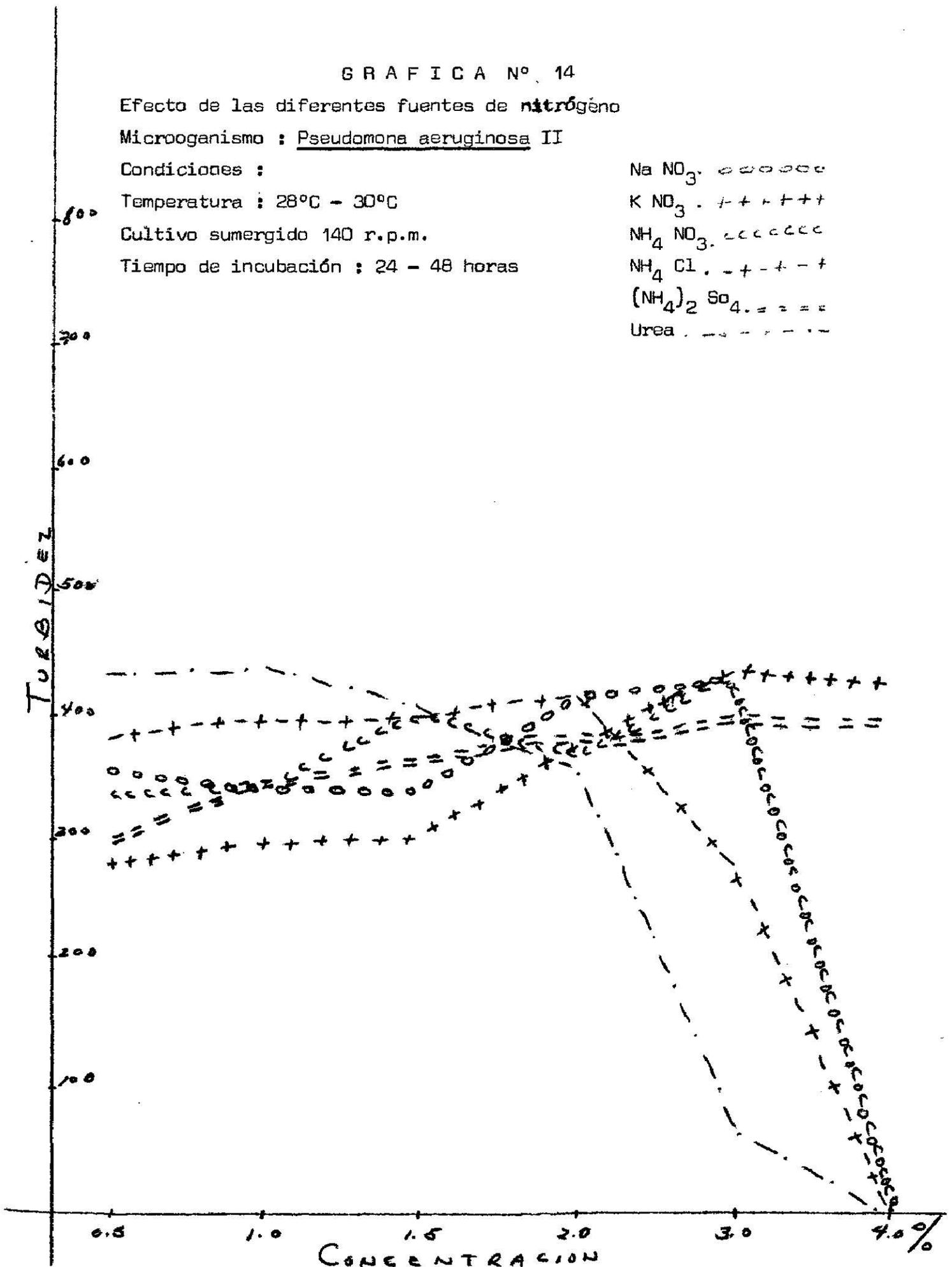
K NO₃ . + + + + +

NH₄ NO₃ . ccccccc

NH₄ Cl . - + - + - +

(NH₄)₂ SO₄ . = = = = =

Urea . - - - - -



GRAFICA N° 15

Efecto de las diferentes fuentes de nitrógeno

Microorganismo : Pseudomona aeruginosa III

Condiciones :

Temperatura : 28°C - 30°C

Cultivo sumergido 140 r.p.m.

Tiempo de incubación 24 - 48 horas

Na NO₃. ooooooo

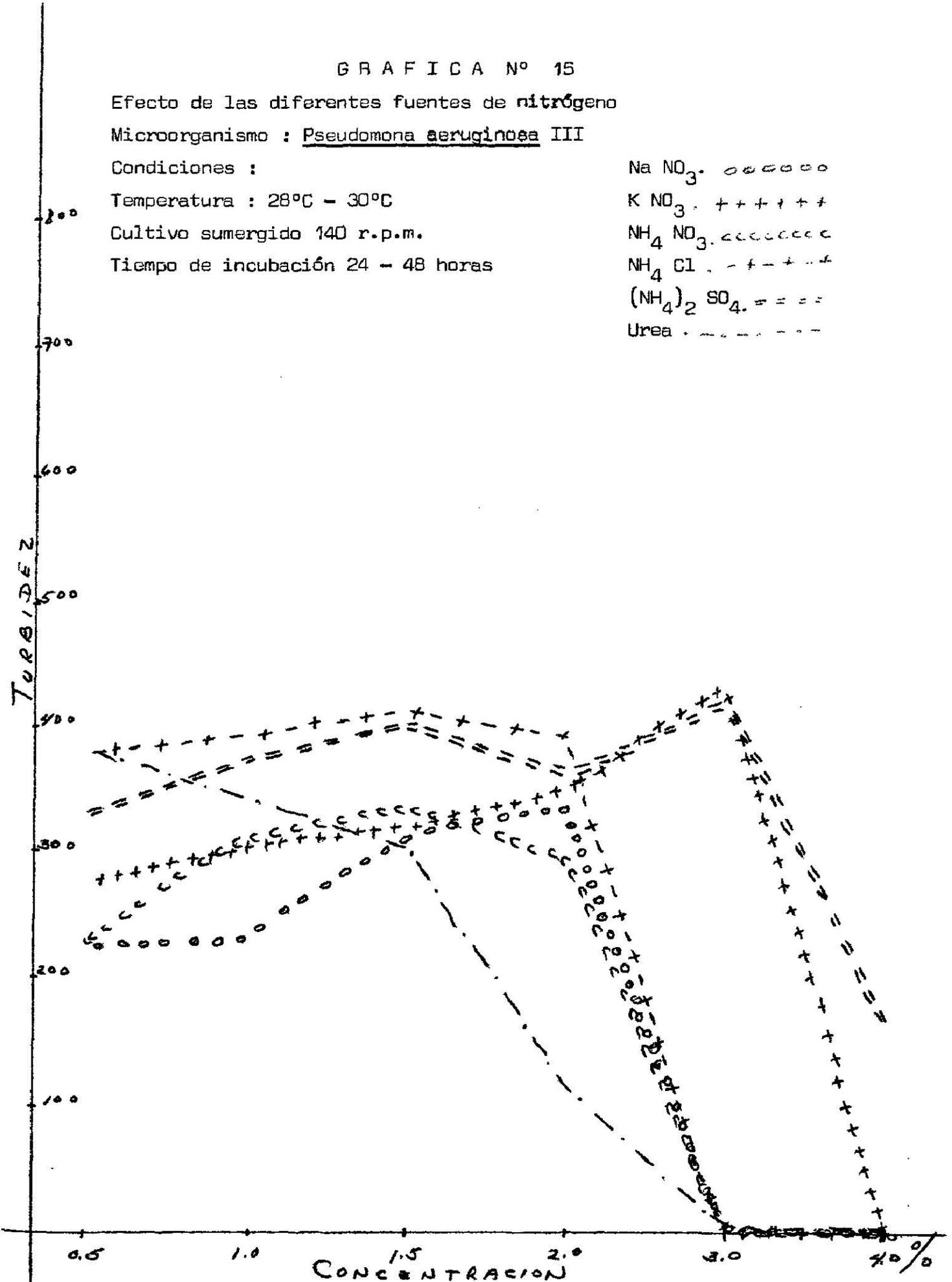
K NO₃. ++++++

NH₄ NO₃. cccccccc

NH₄ Cl. -+-+--+

(NH₄)₂ SO₄. = = = =

Urea . - - - - -



GRAFICA N° 16

Efecto de las diferentes fuentes de nitrógeno

Microorganismo : Pseudomona 1

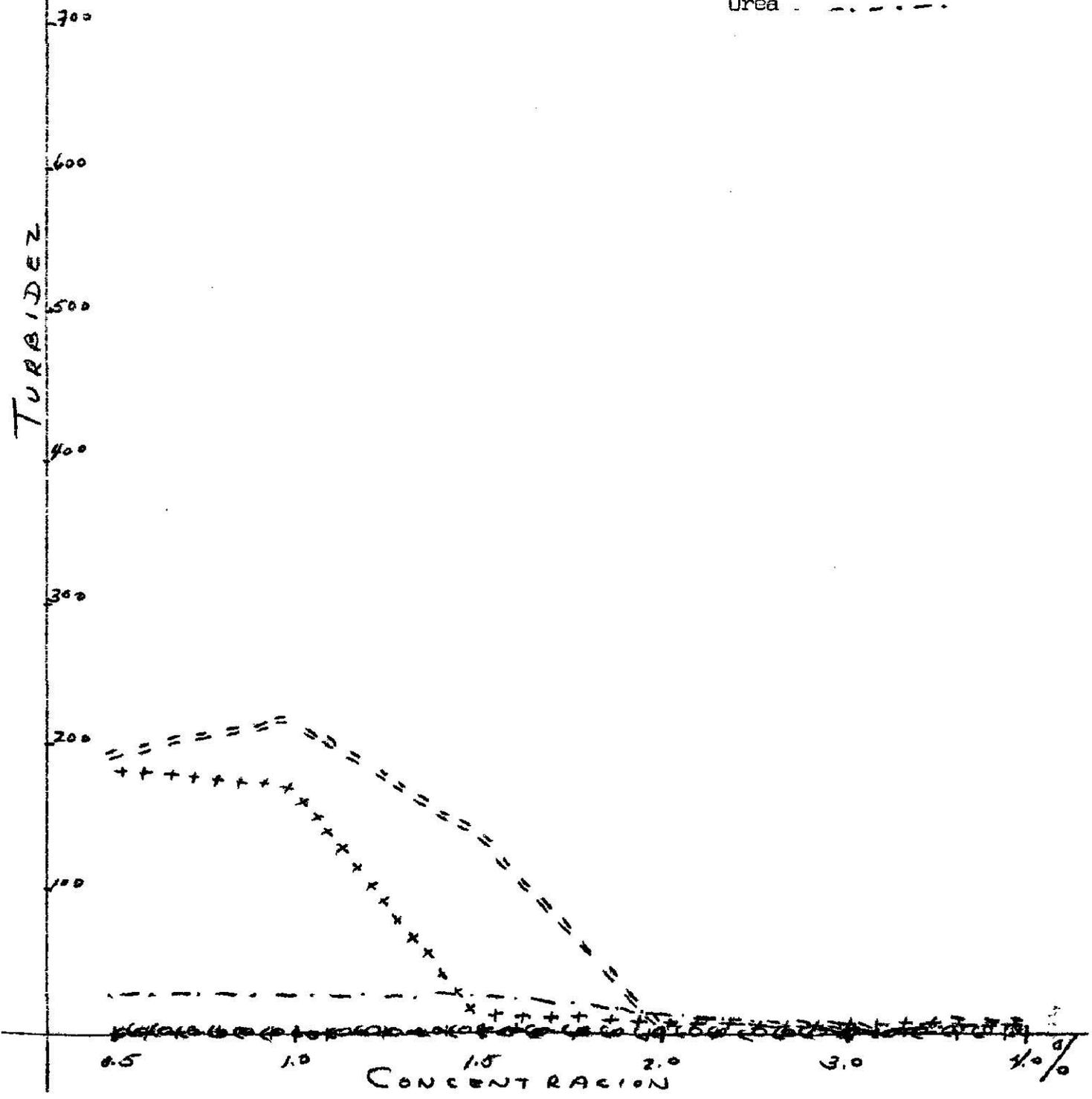
Condiciones :

Temperatura : 28°C - 30°C

Cultivo sumergido 140 r.p.m.

Tiempo de incubación 24 - 48 horas

Na NO₃ oooooo
 K NO₃ + + + + +
 NH₄ NO₃ eeeeeee
 NH₄ Cl - + - + -
 (NH₄)₂ SO₄
 Urea



GRAFICA N° 17

Efecto de las diferentes fuentes de nitrógeno

Microorganismo : Pseudomona 2

Condiciones :

Temperatura : 28°C 30°C

Cultivo sumergido 140 r.p.m.

Tiempo de incubación 24 - 48 horas

Na NO₃ ○○○○○○○○

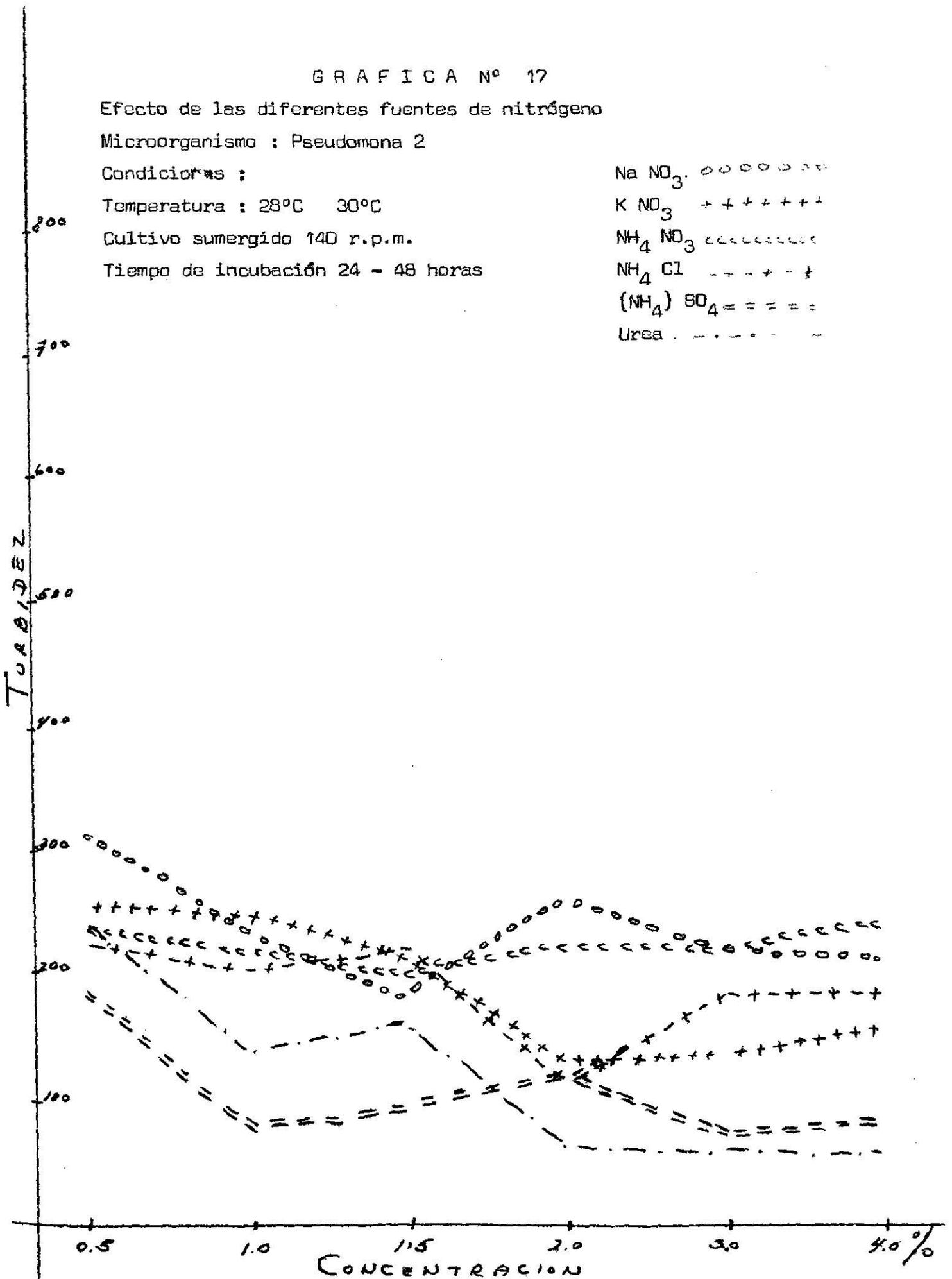
K NO₃ ++++++

NH₄ NO₃ ccccccccc

NH₄ Cl -+-+-+

(NH₄) SO₄ =====

Urea



GRAFICA Nº 18

Efecto de las diferentes fuentes de nitrógeno

Microorganismo : Pseudomona 3

Condiciones :

Temperatura : 28°C - 30°C

Cultivo sumergido 140 r.p.m.

Tiempo de incubación : 24 - 48 horas

Na NO₃ . ○○○○○○

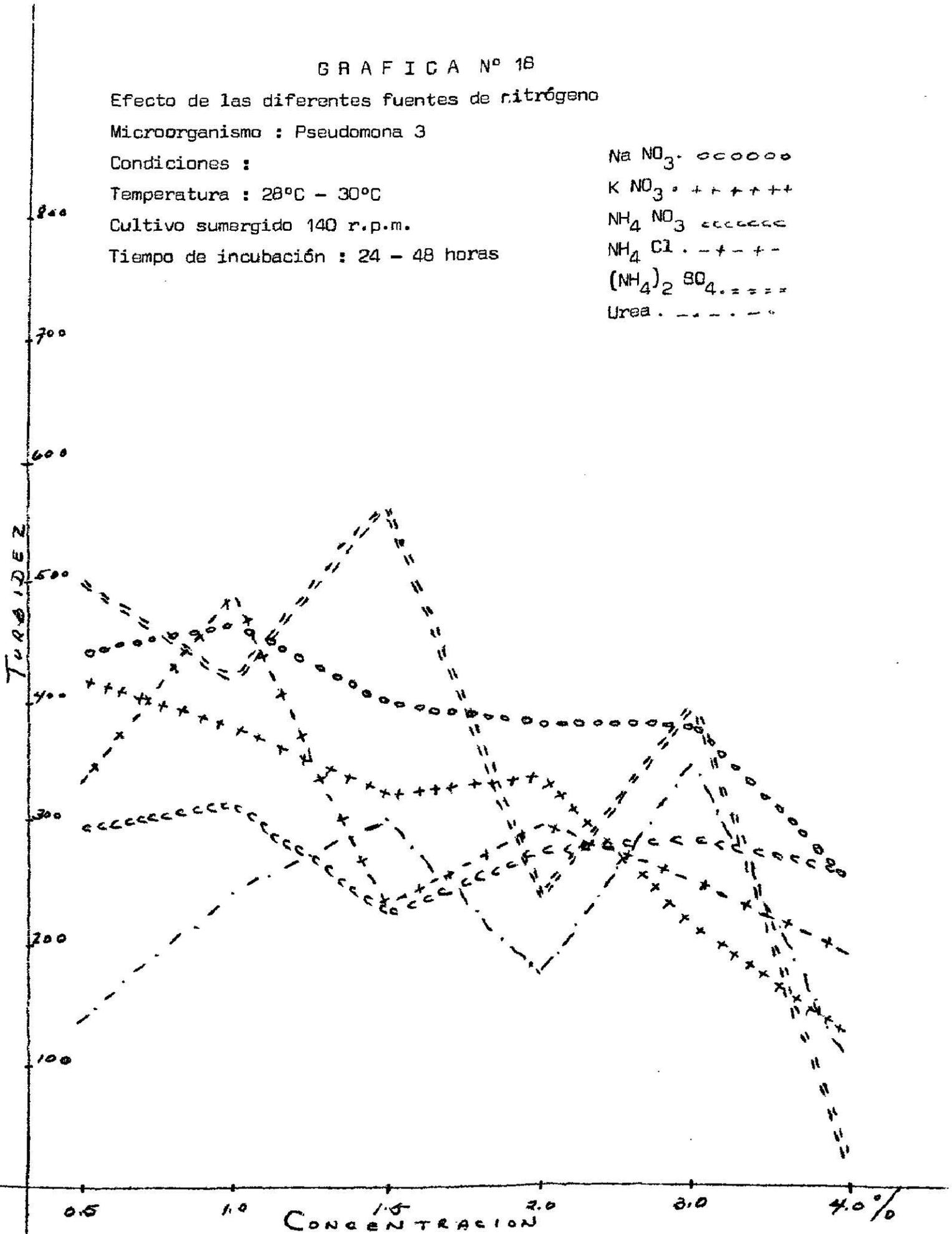
K NO₃ . + + + + +

NH₄ NO₃ . ○○○○○○

NH₄ Cl . - + - + -

(NH₄)₂ SO₄ . = = = =

Urea . - - - - -



GRAFICA N° 19

Efecto de las diferentes fuentes de nitrógeno

Microorganismo; Pseudomona 4

Condiciones :

Temperatura : 28°C - 30°C

Cultivo sumergido 140 r.p.m.

Tiempo de incubación 24 - 48 horas

Na NO₃ ○ ○ ○ ○ ○ ○

K NO₃ + + + + +

NH₄ NO₃ - - - - -

NH₄ Cl - - - - -

(NH₄)₂ SO₄ = = = = =

Urea - - - - -



0.5 1.0 1.5 2.0 3.0 4.0 g/d
CONCENTRACION

GRAFICA N° 21

Efecto de las diferentes fuentes de nitrógeno

Microorganismo : Pseudomona 6

Condiciones :

Temperatura : 28°C - 30°C

Cultivo sumergido 140 r.p.m.

Tiempo de incubación 24 - 48 horas

Na NO₃ ○○○○○○

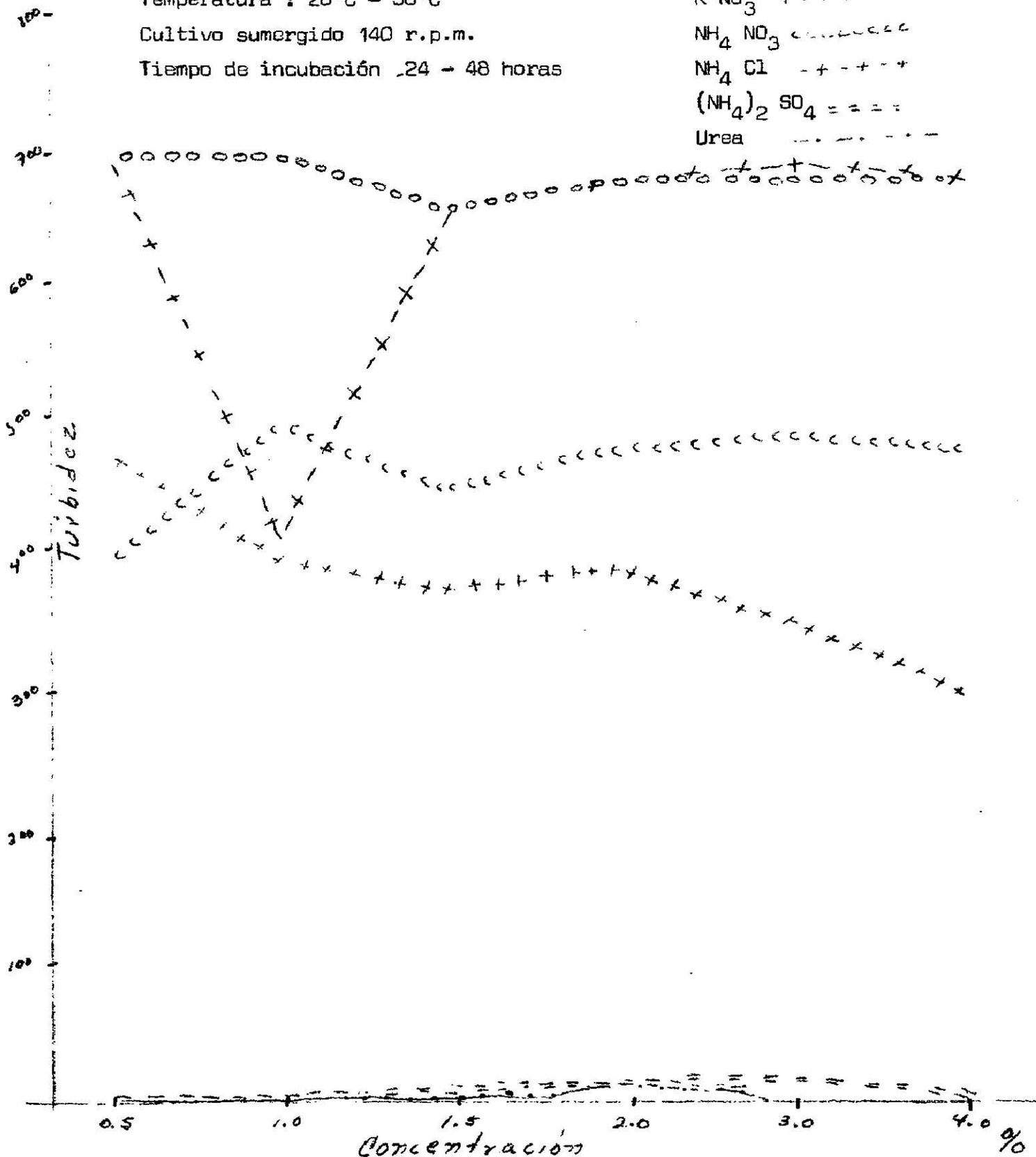
K NO₃ ++++++

NH₄ NO₃ ○○○○○○

NH₄ Cl -+-+--

(NH₄)₂ SO₄ = = = =

Urea - - - - -



GRAFICA Nº 22

Efecto de las diferentes fuentes de nitrógeno.

Microorganismo Pseudomona 7

Condiciones :

Temperatura : 28°C - 30°C

Cultivo sumergido

Tiempo de incubación

Na NO₃ . 00000000

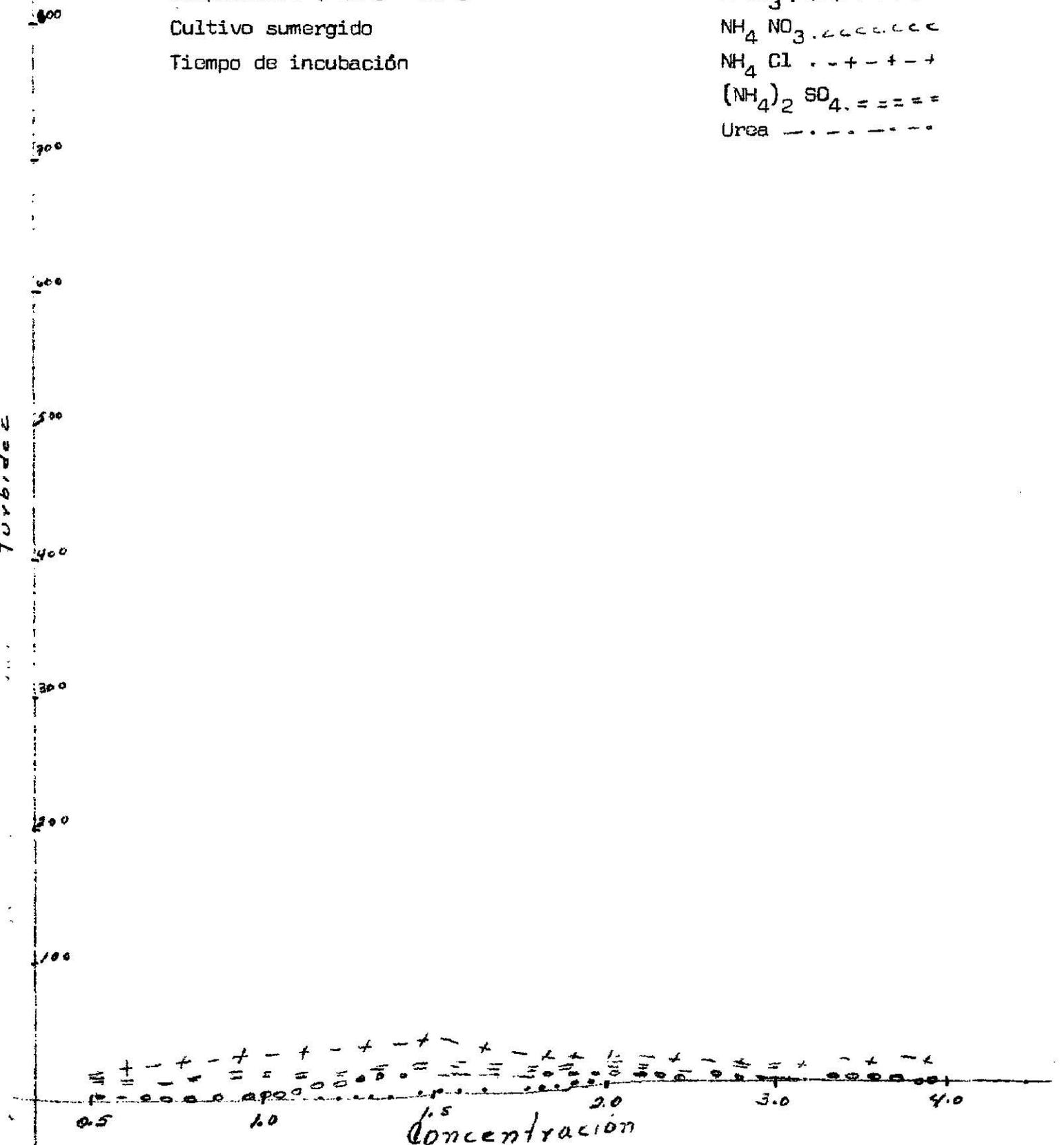
K NO₃ . + + + + + + +

NH₄ NO₃ . <<<<<<<<<

NH₄ Cl . - + - + - +

(NH₄)₂ SO₄ . = = = = =

Urea - . - . - . - . - .



GRAFICA Nº 23

Efecto de las diferentes fuentes de nitrógeno

Microorganismo : Pseudomona 8

Condiciones :

Temperatura : 28°C - 30°C

Cultivo sumergido : 140 r.p.m.

Tiempo de incubación : 24 - 48 horas

Na NO₃. o o o o o o o o

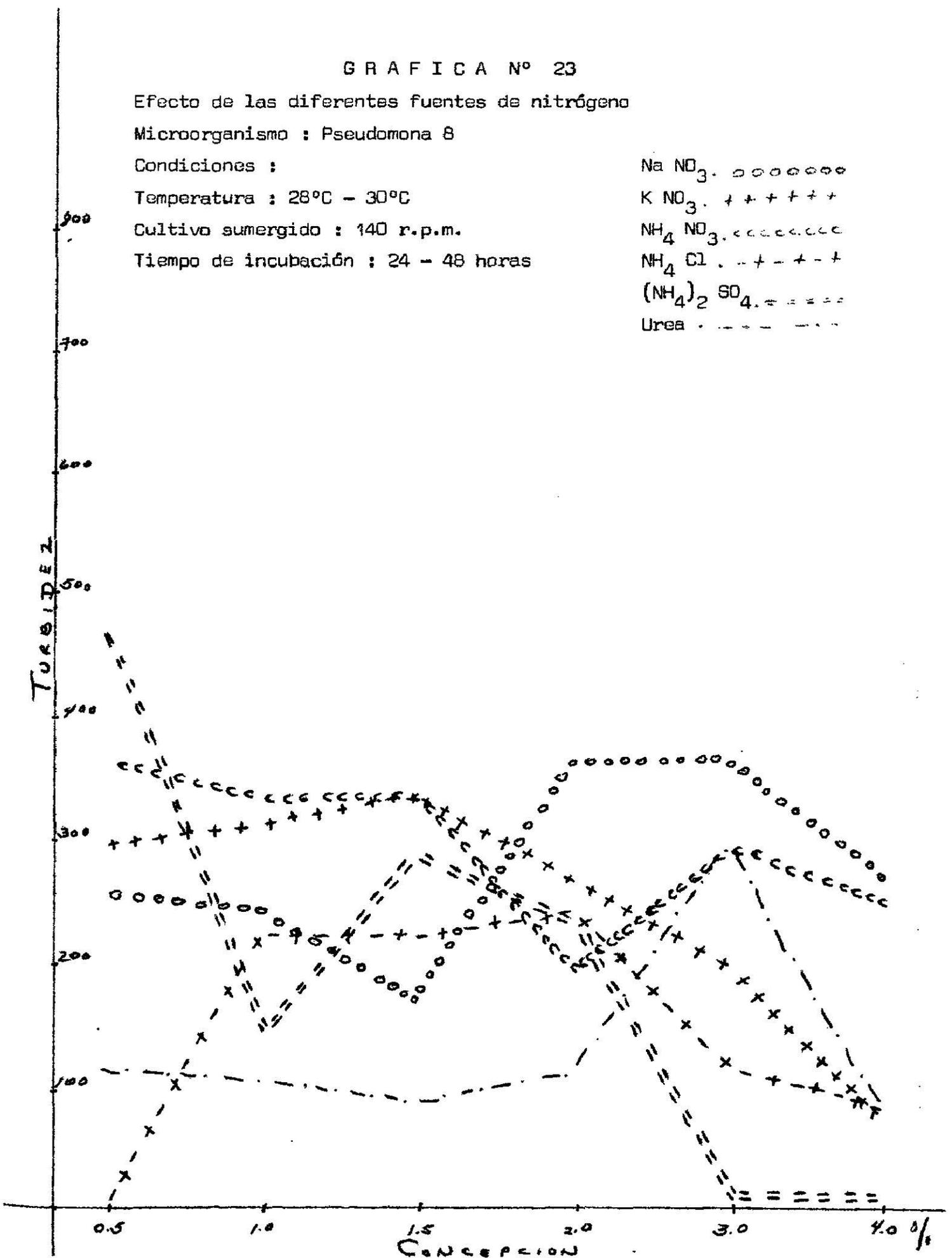
K NO₃. + + + + + +

NH₄ NO₃. <<<<<<<<<<<<

NH₄ Cl. - - + - + - +

(NH₄)₂ SO₄. = = = = =

Urea . - - - - -



GRAFICA N° 24

Efecto de las diferentes fuentes de nitrógeno

Microorganismo : Pseudomona 9

Condiciones :

Temperatura 28°C - 30°C

Cultivo sumergido 140 r.p.m.

Tiempo de incubación 24 - 48 horas

Na NO₃ . o o o o o o o o
 K NO₃ . + + + + + +
 NH₄ NO₃ . < < < < < <
 NH₄ Cl . - + - + - +
 (NH₄) SO₄ . = = = = =
 Urea . - . - . - . -

