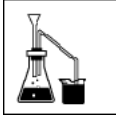


CUARTA PARTE

MINERALIZACION DE MATERIA ORGANICA

PODEMOS MEDIR LA ACTIVIDAD metabólica de microorganismos heterotróficos estudiando la mineralización de sustratos orgánicos. Definimos mineralización como la degradación completa de un compuesto a sus constituyentes minerales, en donde el carbono orgánico es oxidado hasta CO_2 . Dado que la descomposición de un sustrato orgánico por medio del proceso de respiración aeróbica tiene como productos principales a CO_2 y H_2O , la evolución de CO_2 puede utilizarse como un indicador bastante preciso de la actividad respiratoria de comunidades en agua y suelo. Dicho objetivo se cumple en la medida que el ensayo de mineralización es realizado bajo condiciones aeróbicas.

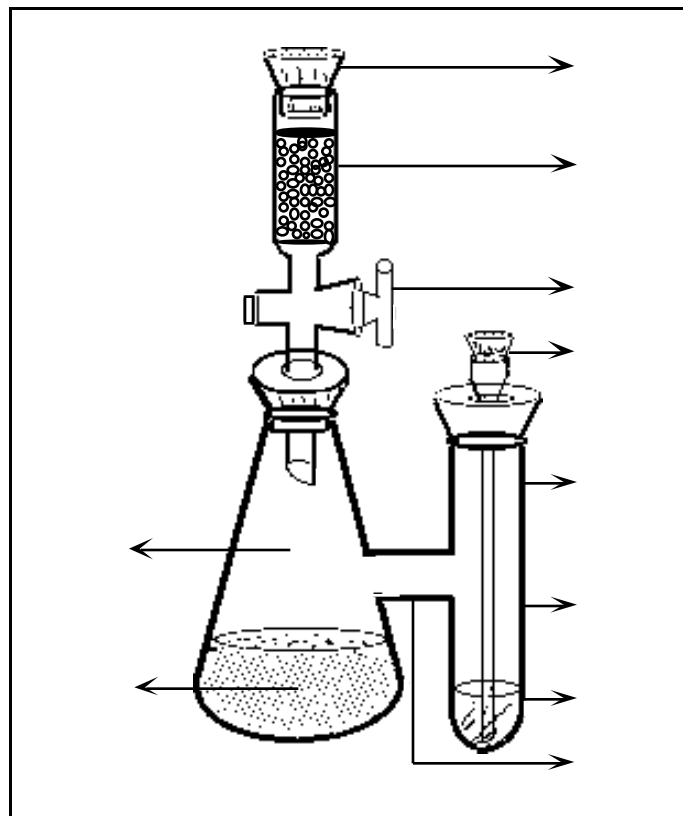
Por otro lado, los ensayos de mineralización nos permiten evaluar el efecto de variaciones de factores bióticos y abióticos sobre la descomposición de materia orgánica. A través de los estudios de mineralización podemos entonces determinar la susceptibilidad y razón de descomposición de compuestos orgánicos naturales y sintéticos. De esta forma, podemos anticipar el impacto ambiental de sustancias orgánicas identificadas como xenobióticos y/o tóxicos.



METODOLOGIA

Para el estudio de mineralización utilizaremos un sistema cerrado diseñado por Bartha y Pramer (1970), conocido con el nombre de Matraz Biométrico ("Biometer Flasks") [Figura 1]. Este sistema nos permite llevar a cabo estudios de mineralización por periodos de tiempo prolongados, al mismo tiempo que permite realizar un monitoreo continuo del proceso. La frecuencia del monitoreo estará supeditada a la velocidad con que se lleva a cabo la mineralización y a la concentración del absorbente alcalino que utilizemos.

Figura 1: Matraz biométrico ("Biometer Flasks").



A ... tapón de goma grande	F ... compartimento de oxidación
B ... torre empacada con Ascarite (absorbente granulada de CO ₂)	G ... tubo lateral
C ... llave de paso para aire libre de CO ₂	H ... trampa alcalina (10 ml solución KOH)
D ... tapón de goma pequeño	I ... puente de conexión entre trampa alcalina y compartimento de oxidación
E ... aguja para retirar y reponer absorbente de CO ₂ de la trampa	J ... muestra biológica (suelo, agua o cultivo)

El matraz biométrico consta de un matraz cónico conectado a un tubo de ensayo lateral. Este último funciona como una trampa de absorción para el CO₂ liberado por la muestra biológica encerrada en el matraz. Mediante el uso del matraz biométrico podemos medir la evolución de CO₂ en muestras de suelo, aguas naturales o en cultivos microbianos puros o mixtos. El CO₂ generado por los elementos bióticos contenidos en el matraz es absorbido por una solución alcalina colocada en el tubo de ensayo lateral. Utilizando una hipodérmica podemos retirar la solución alcalina de la trampa de CO₂, para inmediatamente reponerla con un volumen igual del absorbente alcalino fresco. Esta operación se realiza sin que el sistema se contamine con CO₂ atmosférico. Los componentes del matraz biométrico son los siguientes:

Materiales:

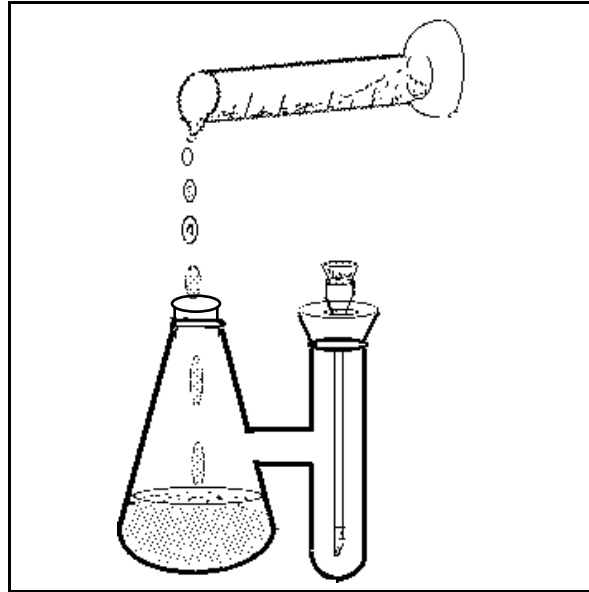
- Matraces biométricos de 250 ml
- Buretas de 50 ml
- Matraces cónicos de 25 ml
- Pipetas (0.1 ml y 1.0 ml)
- Hipodérmicas (10 ~ 15 cc)
- Solución de fenolftaleína (indicador de pH)
- Solución saturada de BaCl₂
- Solución de hidróxido de potasio (0.1 N KOH)
- Solución valorada de ácido hidrociorhídrico (0.05 N HCl)
- Solución de 30% cloruro de mercurio (HgCl₂) (**¡Cuidado! Es material venenoso, maneje con cuidado, use guantes desechables al manejar esta solución**)

Protocolo para ensayo de mineralización:

1. Añada la muestra biológica (100 ml de aguas naturales, 100 ml suspensión de células lavadas, 100 ml dilución de sedimentos ó ~ 25 g de suelo) a cada uno de los matraces biométricos. Las muestras constituyen su inóculo para el ensayo de mineralización. Los inóculos se depositarán en el compartimento de reacción (**F**) (Figura 1).
2. Prepare los siguientes sistemas (Figura 2):
 - a. **SISTEMAS #1 y #2:** no llevan adiciones de sustratos
 - b. **SISTEMAS #3 y #4:** * añada 1 ml de HgCl₂ para muestras de agua o suspensión de células
** esterilize la muestra de suelo en la autoclave (121°C / 30 min) o añada 2 ml de ácido sulfúrico concentrado a la muestra de suelo

- c. **SISTEMAS #5 y #6:** añada 1 ml glucosa 10%
- d. **SISTEMAS #7 y #8:** añada 1 ml de petróleo crudo (o de cualquier sustrato que le interese medir su susceptibilidad a ser mineralizado biológicamente)

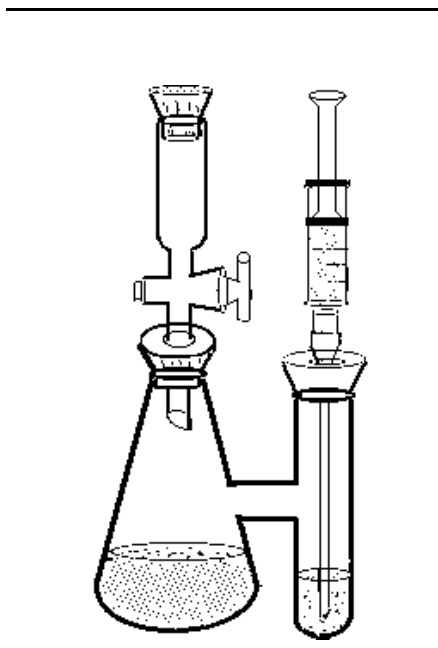
Figura 2: Preparación de un sistema biológico para ensayo de mineralización en matraz biométrico.



3. Selle cada matraz biométrico con su correspondiente torre empacada con Ascarite (**F**) (trampa para CO₂ ambiental). Asegúrese que la llave de paso (**C**) está cerrada.
4. Inyecte 10 ml de 0.1 N KOH en el tubo lateral del matraz biométrico usando una hipodérmica (Figura 3). Tome cuidado en evitar que la solución alcalina entre en contacto con su inóculo. Si esto llegará a ocurrir durante el transcurso del experimento deberá descartar dicho sistema y sustituirlo con un sistema idéntico.
5. Incube por 1 semana a temperatura de salón, en la oscuridad. Tome muestras de la trampa alcalina a intervalos de 24 a 48 horas. Posteriormente, ajuste la frecuencia de los muestreos a la razón de mineralización que exhiben sus sistemas.
6. Para cada periodo de muestreo retire los 10 ml de KOH del tubo lateral de cada matraz biométrico, usando una hipodérmica. Refiérase a la Figura 1 para identificar los componentes del matraz biométrico. Remueva primero el tapón de goma (**A**) de la torre que contiene la trampa de ascarite (**B**). Abra la llave de paso (**C**). Remueva el tapón de goma pequeño (**D**) y conecte inmediatamente la hipodérmica a la aguja (**E**) [no debe exponer el KOH de la trampa al CO₂ atmosférico]. Tenga preparado en otra

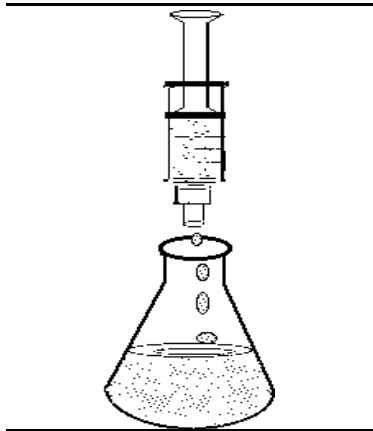
hipodérmica 10 ml de KOH 0.1 N fresco e inyéctelo inmediatamente al tubo lateral (**G**). Inserte inmediatamente el tapón pequeño (**D**) a la aguja (**E**). Cierre la llave de paso (**C**) y coloque el tapón de goma grande en la torre (**B**). Regrese sus sistemas a la cámara de incubación.

Figura 3: Ensamblaje final del matraz biométrico.



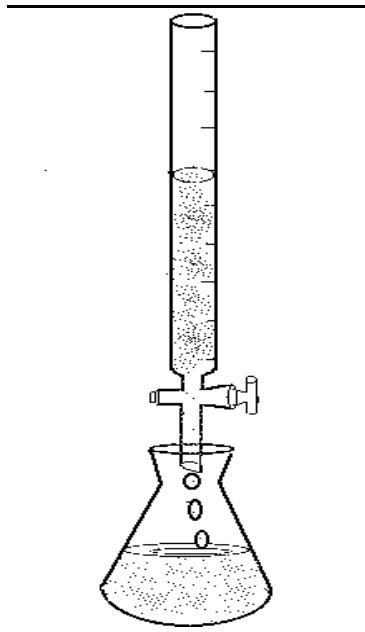
7. Transfiera rápidamente la muestra de KOH que tomó de cada matraz biométrico a un matraz cónico de 25 ml al que le ha añadido previamente 0.1 ml de fenolftaleína y 1.0 ml de BaCl_2 (Figura 4). En este punto la solución se tornará rosada. Cierre el matraz cónico y agite la muestra con movimientos circulares suaves. Tome ahora 10 ml de KOH fresco y transfiera a otro matraz cónico de 25 ml conteniendo la fenolftaleína y el BaCl_2 . Proceda a tapar y mezclar como lo hizo anteriormente. Una vez en contacto con la fenolftaleína, la solución de KOH deberá adquirir una coloración rosada intensa. En el caso de que la solución se torne blancuzca o incolora, ello será indicativo de que el KOH de la trampa fue neutralizado por el CO_2 producido en sus sistemas. En dicho caso no podrá determinar la cantidad exacta de CO_2 producida, aunque sí podrá estimar un mínimo de CO_2 producido. De sucederle esto, proceda a acortar el periodo de incubación entre muestreos.

Figura 4: Preparación de la solución de KOH para titulación.



8. Titule sus muestras de KOH con 0.05N HCl, hasta que las soluciones se tornen incoloras. Anote el volumen de HCl que requirió para neutralizar el KOH de ambas muestras (Figura 5).

Figura 5: Titulación de la solución de KOH.



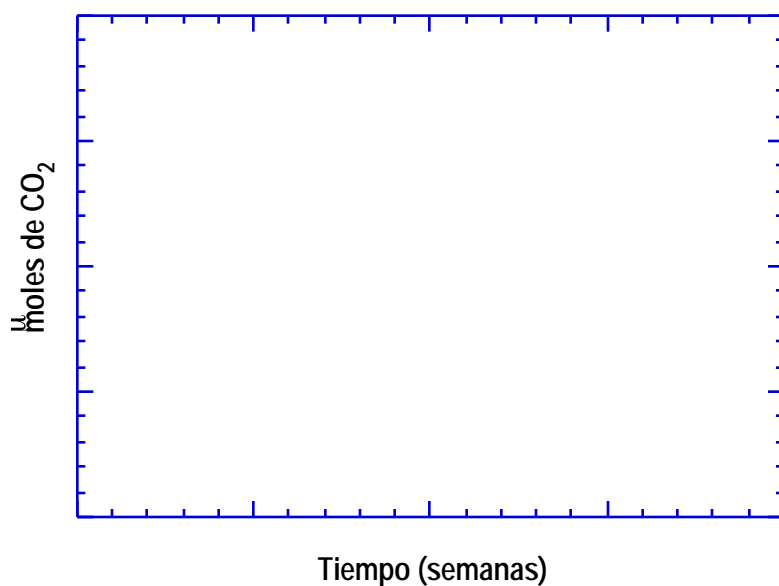
9. Reste el volumen de HCl necesario para neutralizar sus muestras experimentales del volumen de KOH requerido para neutralizar la muestra de KOH fresco. Esta diferencia representa la cantidad de CO_2 atrapada en la muestra experimental de KOH.

10. Para obtener micromoles de CO₂ producidos, multiplique el valor que obtuvo en el paso 9 por **25**. Registre la evolución de CO₂ en forma acumulativa para cada sistema. Sume para cada intervalo de muestreo, el CO₂ producido en intervalos anteriores al CO₂ que ha registrado para ese día. Construya una gráfica de evolución de CO₂ contra tiempo de incubación.

Datos & Análisis:

Anote sus resultados en la siguiente tabla

SISTEMA	μmoles CO ₂ producidos INTERVALOS DE MUESTREO (días)						
	0	7	14	21	28	35	42
#1							
#2							
#3							
#4							
#5							
#6							
#7							
#8							



Observaciones:



PREGUNTAS...

1. Indique qué medimos con los sistemas:
 - a. #1 y #2
 - b. #3 y #4

2. ¿Cómo compara la mineralización de la glucosa con el sustrato alternativo que usted seleccionó (petróleo crudo u otro)?

3. ¿Por qué razón incubamos los matraces biométricos en la oscuridad, cuando el inóculo consiste de una muestra de agua natural o una muestra de suelo?

4. Al utilizar muestras de suelo o de agua como inóculos en los ensayos de mineralización, hablamos de la actividad respiratoria de la comunidad y no de de la actividad respiratoria microbiana. Explique.