

POTENCIAL USO EN BIOAUMENTACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS AUTOCTONAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS PARA SUELOS CONTAMINADOS Y DEFICIENTES DE NITROGENO

Adrián Javier Acuña y Óscar Héctor Pucci

CEIMA, Centro de Estudios e Investigación en Microbiología Aplicada. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Km 4, (9000), Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina. e-mail: ajacuna@infovia.com.ar

SINOPSIS

El estudio se realizó sobre un suelo perteneciente a un landfarming con una relación C:N:P de 100:0.003:0.003, una tasa de mineralización de 30mg CO₂.Kg de suelo⁻¹.día⁻¹ y un porcentaje de biodegradación de 9%. Se obtuvieron 11 cepas bacterianas de las placas de recuento para microorganismos degradadores de hidrocarburos en déficit de nitrógeno. Dichas cepas se caracterizaron a partir de sus capacidades de utilización de sustratos y sus perfiles de biodegradación de hidrocarburos, en ausencia como en presencia de nitrógeno, observándose que las cepas poseen la capacidad de utilizar un gran número de los sustratos cuando el nitrógeno es escaso y que los perfiles de biodegradación son similares en las dos condiciones ensayadas.

Se encontró una gran diversidad de género y especie en el grupo de cepas estudiadas. Fueron seleccionadas 3 cepas buscando las más aptas en función de los perfiles de utilización de sustratos e hidrocarburos y aquellas que mostraron mayor distancia en el análisis de agrupamiento. Estas se identificaron por ácidos grasos de membrana y por secuenciamiento de rDNA encontrándose que la cepa 38, 40 y 59A corresponden a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Gordonia* respectivamente. Dichas cepas poseen un importante potencial para actuar de inoculantes en suelos esqueléticos contaminados con hidrocarburos.

INTRODUCCIÓN

La contaminación de suelos ocasionada por derrames accidentales de hidrocarburos puede ser remediada utilizando diferentes tecnologías disponibles. Una de estas tecnologías es aquella que utiliza las capacidades que poseen los microorganismos de utilizar los hidrocarburos y sus derivados como fuente de carbono y energía (Bartha R, 1986, Pucci G et al 2003), dicha tecnología es denominada tratamiento biológico o biorremediación de los contaminantes.

Existen diversas formas de realizar tratamientos biológicos, realizándose diferentes clasificaciones de los mismos según como sean aplicados. Así definimos a un tratamiento como *in situ* cuando el mismo es llevado a cabo en el mismo lugar donde ocurrió el derrame, o llamamos tratamiento *ex situ* cuando esta tecnología es aplicada luego de transportar el suelo contaminado a un sitio diferente y mas apropiado para la biorremediación (Van Hamme J et al, 2003).

En la actualidad los sistemas de biorremediación tienden a ser optimizados por los responsables de su monitoreo con diferentes técnicas ampliamente difundidas. La bioestimulación se denomina a la incorporación de humedad y nutrientes (generalmente nitrógeno y fósforo), entre otros, para estimular a los microorganismos presentes en el suelo y sean ellos los que lleven a cabo la biorremediación (Van Hamme J et al, 2003). La bioaumentación se llama a la acción de incorporar microorganismos con excelentes capacidades de biodegradación de hidrocarburos en los suelos contaminados para que estos sean los responsables de limpiar el ambiente de hidrocarburos, estos microorganismos incorporados pueden ser autóctonos del lugar, que fueron aislados del sitio,

enriquecidos en el laboratorio y luego incorporados nuevamente al suelo de origen en mayor número, o pueden ser alóctonos, es decir, extraños al lugar de contaminación y, generalmente, modificados genéticamente (Van Hamme J et al, 2003).

La Patagonia posee suelos en los que se observa una marcada deficiencia de nitrógeno (observación personal), y debido a que en ésta se lleva a cabo una intensa explotación de hidrocarburos, cuando ocurren derrames de estos contaminantes en los suelos, el ambiente en el que deben realizar la biorremediación los microorganismos es deficiente de nitrógeno, según lo propuesto por diferentes autores, con lo que en dichos lugares se produciría un enriquecimiento de microorganismos degradadores de hidrocarburos en deficiencia de nitrógeno (Eckford R et al, 2002).

El objeto del presente trabajo es obtener y caracterizar microorganismos de un suelo con elevada relación C:N capaces de biodegradar hidrocarburos en déficit de nitrógeno y estimar la posibilidad de su aplicación en bioaumentación de suelos esqueléticos contaminados con derivados del petróleo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra de suelo: Se estudió una muestra de suelo patagónico contaminada con residuos de la industria del petróleo proviene de un landfarming con 10 años de funcionamiento que posee una relación C:N:P de 100:0.003:0.003, una tasa de mineralización de 30mg CO₂.Kg de suelo⁻¹.día⁻¹ y un porcentaje de biodegradación de 9%. La comunidad bacteriana capaz de biodegradar hidrocarburos en déficit de nitrógeno resultó ser del 10% de los microorganismos aeróbicos cultivables. Se tomaron 25 muestras del mismo dentro de un área de 1000 m² a una profundidad comprendida entre 10 y 30 cm, se mezclaron y por cuarteos sucesivos se tomó una porción de 2 Kg sobre la cual se realizaron las determinaciones.

Obtención de cepas bacterianas: Por la técnica de disseminación en superficie fueron sembradas una serie de diluciones de la muestra en estudio en medio mineral sólido sin fuente de nitrógeno (ClNa 5,0 g, PO₄HK₂ 0,5 g, PO₄H₂Na 0,5 g, SO₄Na 1,0 g, SO₄Mg 0,2 g, SO₄Fe 0,05 g, SL 10 B (HCl (25%) 7,7 mL, FeSO₄ x 7H₂O 1,5g, ZnCl₂ 0,07g, MnCl₂ x 4H₂O 0,1g, H₃BO₃ 0,3g, CoCl₂ x 6H₂O 0,19g, CuCl₂ x 2 H₂O 0,002g, NiCl₂ x 6 H₂O 0,024g, Na₂MoO₄ x 2H₂O 0,036g, agua destilada 1000,0 mL) 10 mL, extracto de levadura 0,025 g, agar-agar 15 g, agua destilada 1000,0 mL) con una mezcla 1:1 de petróleo:gasoil como fuente de carbono y energía (MM-2-PGO), las mismas se incubaron por un período de 20 días a 28 °C. De las placas con un número de colonias comprendido entre 20 y 200 se tomaron 11 cepas bacterianas que fueron reaisladas en MM-PGO para comprobar la pureza de las mismas y luego fueron almacenadas para su posterior estudio.

Caracterización de las cepas aisladas: La misma fue realizada utilizando dos metodologías diferentes: 1) *Utilización de sustratos:* La caracterización fue realizada utilizando ácido sulfanílico, ornitina, L-arginina, lisina, glicina, L-lisina, triptofano, histidina, L-leucina, ácido caprílico, L-cistina, N-acetil glucosa amina, ácido L-glutámico, D-xilosa, lactosa, inositol, N-galactosa, D-arabinosa, glicerina, celobiosa, D-ribosa, acetamida, ácido sulfosalicílico, ácido cáprico, benzoato, acetato de sodio, piruvato, citrato, ácido propiónico, adipato, ácido úrico, L-fenilalanina, fumarato, fenil acetato, palmitato, ácido esteárico, ácido succínico, ácido betínico, caproato, lactato de sodio, tartrato de Na y K, inulina, timol, esculina, fructuosa, rafinosa, glucosa, ramnosa, trehalosa, gluconato, sacarosa, malato, manitol, maltosa, manosa y sorbitol como sustratos. La misma fue llevada a cabo en presencia y en ausencia de nitrógeno realizándose en policubetas con 100 µL de medio mineral (MM) con nitrógeno (ClNa 5,0 g, PO₄HK₂ 0,5 g, PO₄H₂NH₄ 0,5 g, SO₄(NH₄)₂ 1,0 g, SO₄Mg 0,2 g, NO₃K 3,0 g, SO₄Fe 0,05 g, SL 10 B (HCl (25%) 7,7 mL, FeSO₄ x 7H₂O 1,5g, ZnCl₂ 0,07g, MnCl₂ x 4H₂O 0,1g, H₃BO₃ 0,3g, CoCl₂ x 6H₂O 0,19g, CuCl₂ x 2 H₂O 0,002g, NiCl₂ x 6 H₂O 0,024g, Na₂MoO₄ x 2H₂O 0,036g, agua destilada 1000,0 mL) 10 mL, agar-agar 15 g, agua

destilada 1000,0 mL) (DSM, 1998) o sin nitrógeno respectivamente. El MM fue adicionado con 10 µL de la solución del sustrato a ensayar y con 10 µL de suspensión bacteriana con una densidad óptica de 0.5 de absorbancia a 690 nm. Las policubetas sembradas fueron incubadas a 28 °C durante 30 días. Se tomó como positivo la presencia de turbidez. 2) *Perfil de biodegradación de hidrocarburos*: Para la presente caracterización se utilizaron hidrocarburos de cadena lineal como pentadecano, hexadecano, pentano, hexano y heptano, representantes cíclicos como pristano, ciclohexano y ciclohexanona, hidrocarburos aromáticos del grupo BTX (benceno, tolueno y xileno) e hidrocarburos poliaromáticos como naftaleno, antraceno y fenantreno. Los ensayos fueron realizados en 5 mL de MM y MM-2 líquidos adicionados con 0.1% del hidrocarburos correspondiente. Los caldos de cultivo fueron inoculados con 100 µL de una suspensión del microorganismo en estudio con una absorbancia de 0.5 a 690 nm. Los sistemas así efectuados se incubaron a 28 °C durante 30 días en agitador orbital a 120 rpm. Se tomó como positivo la presencia de turbidez.

Determinación de biodiversidad de las cepas aisladas: Las cepas aisladas fueron sometidas al estudio de sus ácidos grasos de membrana por cromatografía gaseosa según lo propuesto por MIDI. Para conocer la biodiversidad de los microorganismos obtenidos del suelo fueron sometidos sus perfiles de ácidos grasos a un análisis de agrupamiento manipulando el programa NTSySpc 2.01 con la utilización del coeficiente de distancia euclidiana y un agrupamiento promedio.

Identificación de las cepas aisladas: Los microorganismos fueron identificados por ácidos grasos de membrana y por secuenciamiento parcial de rDNA comparándose los resultados obtenidos con las bases de datos correspondientes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De la muestra de suelo estudiada se aislaron 11 cepas bacterianas que se denominaron 38, 17, 40, 68, 7B, 57, 8, 65, 6, 48B y 59A, todas mostraron la capacidad de desarrollarse en MM-2-PGO, lo que indicaría la potencialidad de las mismas de biodegradar hidrocarburos en ambientes libre del nutriente nitrógeno.

Los cultivos puros obtenidos fueron caracterizados, observándose que todos poseen un amplio porcentaje de utilización de los sustratos ensayados (tabla 1). Es de destacar que solo el cultivo 59A desarrollo un aumento significativo de la cantidad de sustratos utilizados en ausencia de nitrógeno comparado con los valores observados en presencia de dicho nutriente.

Tabla 1: Porcentaje de utilización de sustratos en caldo de las cepas bacterianas aisladas con y sin fuente de nitrógeno.

	38	17	40	68	7B	57	8	65	6	48B	59A
con N₂	36	20	30	38	41	43	43	38	29	46	34
sin N₂	30	21	30	36	38	36	52	39	30	34	50

En la tabla 2 y 3 se observan los perfiles de biodegradación de hidrocarburos individuales en presencia como en ausencia de nitrógeno, respectivamente. Cuando el nitrógeno se encuentra presente en el medio de cultivo, las cepas bacterianas con mejores perfiles de biodegradación resultaron ser la cepa 38, que posee la capacidad de crecer en todos los compuestos alifáticos, cíclicos, aromáticos y poliaromáticos ensayados, demostrando así, un amplio rango metabólico para biorremediar diferentes tipos de contaminantes, la cepa 59A, que posee capacidades similares a la anterior, con la excepción de no utilizar como fuente de carbono y energía al xileno.

Quando en el medio de crecimiento no colocamos el nitr3geno, se observa que los perfiles de biodegradaci3n no sufren grandes modificaciones, a excepci3n de lo observado cuando los hidrocarburos estudiados son de tipo poliaromáticos, en esta situaci3n parecería que la capacidad de biorremediar los mismos se encontraría inhibida por la falta de nitr3geno en el medio de desarrollo.

Tabla 2: Perfil de biodegradación de hidrocarburos de cepas aisladas en presencia de nitrógeno

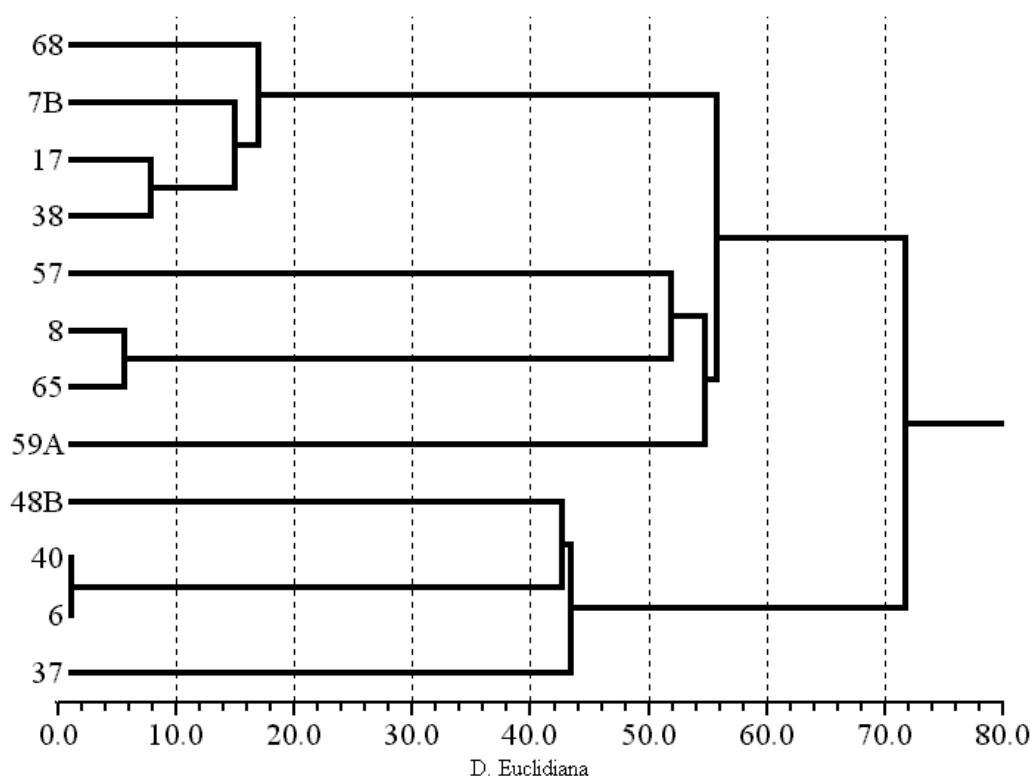
Tabla 3: Perfil de biodegradación de hidrocarburos de cepas aisladas en ausencia de nitrógeno

El estudio de agrupamiento realizado con los cultivos bacterianos aislados del suelo contaminado con hidrocarburos (figura 1) mostró claramente una gran diversidad entre los mismos, observándose que dichos cultivos se agrupan en tres grupos diferentes bien marcados.

El primer grupo esta formado por los aislamientos 68, 7B, 17 y 38, el segundo grupo por los microorganismos 57, 8, 65 y 59A y un tercer grupo constituido por las cepas 40, 6 y un aislamiento número doce denominado 37 que no pudo ser sometido a los estudios anteriores.

En base a todo lo realizado, fueron seleccionados los cultivos 38, 59A y 40 para ser identificados, encontrándose que los mismos corresponden a los géneros *Pseudomonas*, *Gordonia* y *Bacillus* respectivamente.

Figura 1: Análisis de agrupamiento de los cultivos bacterianos aislados.



Los microorganismos identificados demostraron ser los mas aptos en función a los estudios realizados, pudiéndose destacar que los tres poseen característicos bien diferenciales debido a que se encontró un bacilo Gram negativo (*Pseudomona*), y dos bacilos Gram positivos, uno con capacidad de formar esporas (*Bacillus*)y otro que carece de dicha propiedad (*Gordonia*).

CONCLUSIONES

Los aislamientos 38, 59A y 40 correspondientes a los géneros bacterianos *Pseudomonas*, *Gordonia* y *Bacillus* respectivamente, demostraron ser los mas aptos para ser utilizados en bioaumentación de suelos contaminados con hidrocarburos carentes de nitrógeno debido a su gran versatilidad de utilización de sustratos e hidrocarburos cuando éste nutriente no se encuentra disponible.

BIBLIOGRAFÍA

Bartha R (1986) Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. *Microb. Ecol.* 12:155-172.

Pucci G, Pucci O (2003) Biodegradabilidad de componentes de mezclas naturales de hidrocarburos previamente sometidas a landfarming. *Rev. Arg. Microbiol.* 35:62-68.

Van Hamme J, Singh A, Ward O (2003) Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Reviews.* 67:503-549.

Eckford R, Cook F, Saul D, Aislabie J, Foght J (2002) Free-living heterotrophic nitrogen-fixing bacteria isolated from fuel-contaminated Antarctic soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5181-5185.

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GMBH (DSMZ) (1998) Catalogue of Strains. Fourth edition. Pag. 327