

BIODEGRADACION DE HIDROCARBUROS EN TRES SUELOS PATAGONICOS POR MICROORGANISMOS ESPORULADOS.

Barquín, ML; Pucci, OH; Pucci, GN

CEIMA, Centro de Estudios E Investigaciones en Microbiología Aplicada. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Km 4, (9000), Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina.

SINOPSIS

A tres suelos pertenecientes a la Patagonia Central extraandina se les realizó la caracterización físico química, determinación de la clase textura y análisis microbiológico con el objeto de determinar la influencia de las bacterias esporuladas (muy resistentes a las condiciones ambientales adversas) en los procesos de biorremediación. Para ello se diseñaron sistemas de mineralización por triplicado con su respectivo blanco, tres de ellos se sometieron a un tratamiento térmico para obtener sólo las bacterias esporuladas. Se les agregó gasoil y nutrientes minerales, logrando una relación final C:N:P 100:5:1. A los sistemas se les realizó un seguimiento durante 103 días midiendo la cantidad de CO₂ producido. Se determinó la tasa de mineralización para cada sistema, observándose que los microorganismos esporulados juegan un rol importante en la biodegradación de gasoil.

INTRODUCCIÓN

La Patagonia central extraandina es una zona semiárida con un clima seco y suelos con bajo contenido de humedad, materia orgánica y nutrientes, desarrollándose en la zona costera una intensa actividad petrolera, siendo frecuente la contaminación del suelo por hidrocarburos.

Desde hace varios años, se han estudiado diversos procedimientos con el fin de remediar sitios contaminados, donde uno de los métodos posibles a llevar a cabo es la biorremediación de los hidrocarburos por parte de microorganismos, siendo uno de los métodos más efectivos, menos costosos y con una menor alteración del ecosistema.

Se ha investigado durante varios años la capacidad degradativa de hidrocarburos por microorganismos, se ha informado que existe un amplio número de géneros bacterianos, de los cuales podemos destacar a los géneros *Arthobacter*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas* (Peressutti, 2000; Pucci, et.al, 1998), entre otros.

Para que los microorganismos puedan llevar a cabo la biodegradación de los hidrocarburos en el suelo, existen una serie de parámetros físicos, como ser humedad, aireación, pH, temperatura, etc, que deben encontrarse dentro de rangos óptimos para tal fin, ocurriendo lo mismo para los diferentes nutrientes, donde se ha podido observar que los nutrientes limitantes para que este proceso ocurra son el nitrógeno y el fósforo.

Para la recuperación de las zonas contaminadas, se han realizado varios estudios de la aplicación de biorremediación en la región patagónica (Pucci OH, et.al 2000; Olivera et.al 1997), y de la capacidad de la flora microbiana autóctona de biodegradarlos (Alvarez y Pucci, 1993).

Dentro de los microorganismos esporulados se encuentran los bacilos gram positivos, aerobios pertenecientes al género *Bacillus*, presentando algunas especies capaces de degradar biopolímeros (Sneath, 1986).

Desde hace tiempo se han realizado varios estudios sobre el potencial de biodegradación de los microorganismos pertenecientes al género *Bacillus* (Ghazali et.al 2004; Rahman et.al 2002; Adams y Ribbons, 1988), detectándose que los mismos tienen capacidad de utilizar diferentes hidrocarburos en diversas condiciones ambientales ((Anneweiler et.al, 2000, Adams y Ribbons, 1988), como así también de las estrategias llevadas a cabo para la utilización de los mismos, como es la producción de biosurfactantes (Cybulski et.al, 2003, Calvo, et.al, 2004). El objeto de este trabajo es estudiar la presencia y cinética de biodegradación de microorganismos esporulados aislados de la Patagonia central, ya que éstos poseen la capacidad de supervivir en medios adversos y biodegradar hidrocarburos.

DESARROLLO

Análisis físico-químico y edafológico.

Se utilizaron tres muestras de suelo provenientes de diferentes zonas de Comodoro Rivadavia libres de contaminación. Se tomaron 20 muestras de 1 kg que fueron reducidas por cuarteos hasta una muestra de 2,5 kg sobre las que se efectuaron las determinaciones.

Las determinaciones de aniones y cationes solubles, así como la determinación de pH, se realizó a partir de un extracto de suelo con agua destilada, en una relación de 1:2,5 (A.G.Trejo, 1981). Las determinaciones de densidad aparente, densidad real, capacidad de retención de agua, humedad, materia orgánica, materia inorgánica y porosidad se determinaron directamente sobre el suelo, según indica bibliografía (A.G. Trejo, 1981).

La determinación de la textura al tacto, engloba todas las propiedades que las partículas confieren al suelo en su conjunto (pegajoso, plástico, áspero, etc). Se colocó 25 g de suelo seco en la palma de la mano y se le agrega agua gota a gota hasta formar una pasta y de las características de la misma se infiere la textura del suelo (Conti, 1998).

El método utilizado para la determinación de la granulometría de los distintos suelos analizados en este trabajo fue el de tamización, consistente en la separación de partículas mediante el uso de tamices, y por pesada de las fracciones retenidas en cada uno, se calcula el porcentaje correspondiente a cada fracción. Los tamices utilizados fueron: 40- Arena media. 120 – Arena fina. 170 – Arena muy fina. Las partículas retenidas en el tamiz 170 corresponden a limos y arcillas.

Cinética de mineralización.

Se denomina mineralización a la degradación completa de un compuesto en sus componentes minerales en el cual el carbono del compuesto es convertido en CO₂ por el proceso de la respiración bacteriana. El potencial de biodegradabilidad de un suelo se puede determinar midiendo el dióxido de carbono producido, que se fija en hidróxido de sodio y el carbonato originado se titula con ácido clorhídrico de normalidad conocida.

En este trabajo se diseñaron seis sistemas de mineralización, por triplicado, y con un blanco para cada uno. Tres sistemas fueron sometidos a un tratamiento térmico a una temperatura de 80°C durante 1 h, con el propósito de eliminar las formas vegetativas preservando las formas esporuladas (Sneath, 1986).

En los sistemas diseñados la relación final de carbono/nitrógeno/fósforo (C:N:P) fue de 100:5:1, lográndose con el agregado de gasoil, fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4) y sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). También se ajustó la humedad, con el agregado de agua destilada estéril.

El sistema constituido únicamente por el suelo, con el agregado de nitrógeno y fósforo, se realizó con el objetivo de obtener la biodegradación por fertilización del suelo.

Análisis microbiológicos.

Se realiza una dilución del suelo 1:10 con solución fisiológica estéril, homogeneizando en vortex por durante dos minutos. Dicho tratamiento se realiza para liberar a los microorganismos que pudieran estar retenidos entre las partículas del suelo. Se prepararon las diluciones decimales correspondientes y se sembraron por diseminación en superficie en medio TSA (Trypteína Soya Agar), incubándose a 28 °C durante 24-48 h. Al inicio del experimento se efectuó la enumeración de bacterias termorresistentes, calentando la suspensión 1:10 durante 10 minutos a 80 °C (Sneath, 1986), procediendo como se describió anteriormente.

El recuento se efectuó en aquellas placas correspondientes a una dilución que presenten entre 30 y 300 colonias, contando todas las colonias presentes en las mismas, se halló la media aritmética. Los resultados se expresaron como unidades formadoras de colonia por gramo de suelo (UFC/g).

RESULTADOS

De las características físico-químicas intrínsecas de cada suelo se observa que las hacen aptas para realizar estudios de biodegradación (tabla 1). De los parámetros analizados los que revierten importancia en un ensayo de biodegradación son: humedad, capacidad de retención de agua, porosidad y pH. La humedad y la capacidad de retención de agua son dos parámetros que en conjunto muestran la capacidad de retener en su interior agua suficiente para el desarrollo de biodegradación; la porosidad muestra el buen estado de aireación del suelo para el desarrollo bacteriano y el pH, dentro del rango de neutralidad indica que el desarrollo microbiano es posible. El contenido de cationes y aniones del suelo no muestra grandes concentraciones que impidan a los microorganismos desarrollar su metabolismo.

La clase textural para los tres suelos correspondió: suelo 1, franco arenoso, suelo 2, arenoso y suelo 3, franco a franco arcilloso.

Tabla 1: Características físico-químicas de los suelos analizados.

	Suelo 1	Suelo 2	Suelo 3
Características físicas			
Humedad (%)	7.48	6.25	11.46
pH	7.1	7.4	8.5
Materia orgánica (%)	8.82	13	15.8
Materia inorgánica (%)	91.18	87	84.2
Densidad aparente	1.02	0.83	1.03
Densidad real	2.67	2.06	1.63
Porosidad	61.80	59.71	36.81
Capacidad de retención de agua C.R.A (%)	44.06	37.81	26.93
Hidrocarburos totales (mg/L)	N/c	N/c	N/c
Características químicas			
Carbonatos (mg/L)	N/c	N/c	78.31

Bicarbonatos (mg/L)	210.36	236.66	138.85
Sulfatos (mg/L)	6919	1278	42.99
Cloruros (mg/L)	12596	6061	94.14
Calcio (mg/L)	1298	107.214	113.226
Magnesio (mg/L)	393.822	130.06	68.67
Hierro (mg/L)	0.118	0.428	1.25
Sustancias Nitrogenadas			
Amonio (mg/L)	2.49	0.39	0.197
Nitratos (mg/L)	37.40	9.06	11.31
Nitritos (mg/L)	0.335	0.910	0.22
Urea (mg/L)	34.91	14.47	12.66

El recuento de microorganismos aerobios totales y termorresistentes se muestran en la tabla 2.

De los recuentos iniciales y finales, expresados en ufc. g⁻¹ de suelo, se observa que la población inicial de microorganismos esporulados representa menos del 1 % de la población microbiana cultivable, y el recuento a los 103 días nos indica que existe desarrollo a expensas de la fuente de carbono agregada, lo cual se correlaciona con las tasas de mineralización, que expresada en mg. CO₂. kg. de suelo⁻¹. día⁻¹ para los sistemas sin tratar fueron de 27.65, 24.46, 28.16, y para los sistemas con tratamiento fueron: 11.97, 18.08, 24.73, representando la de los sistemas sometidos al tratamiento térmico el 43.3 %, 73.9 % y 87.8 %, respecto de los sistemas sin tratamiento, lo cual evidencia la actividad de los microorganismos esporulados.

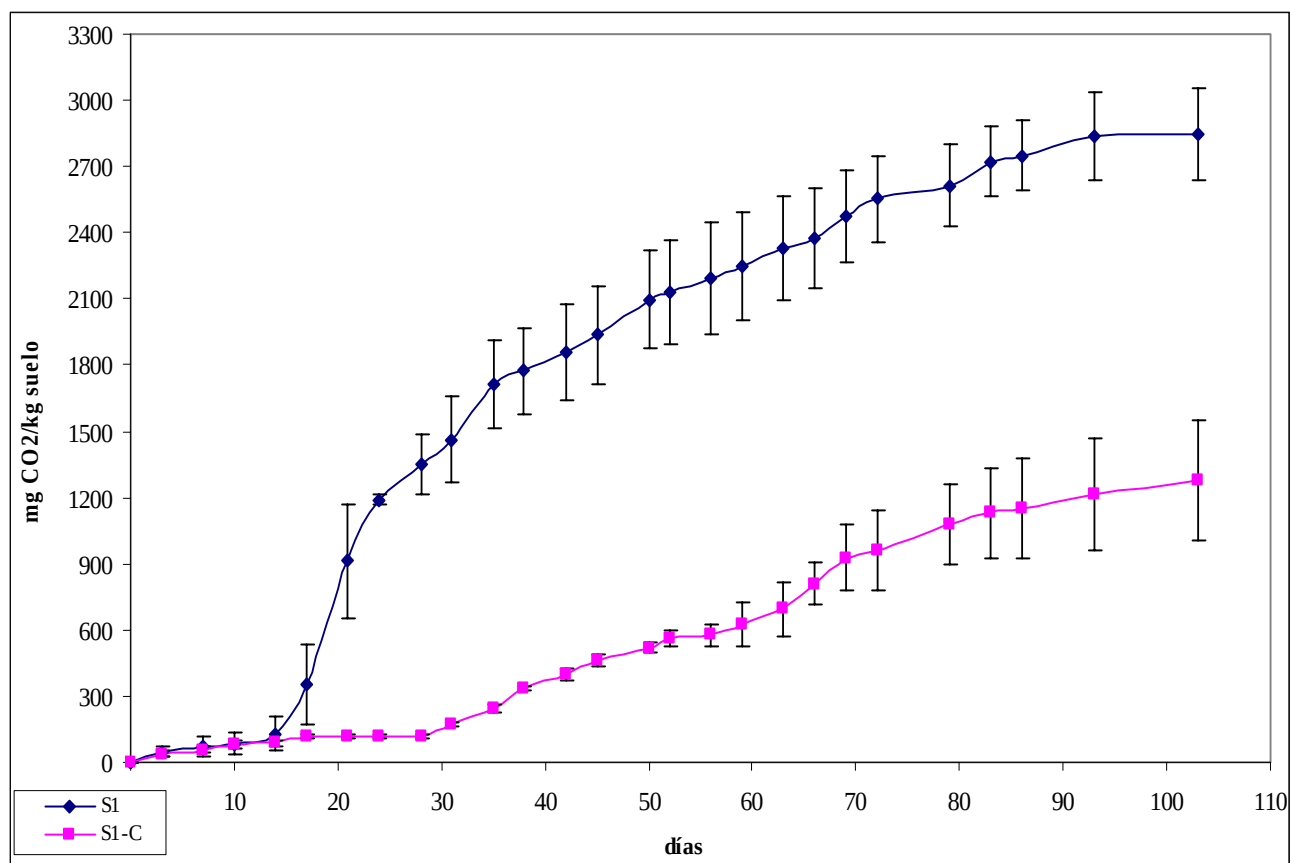
Tabla 2: Enumeración de bacterias aerobias totales y de bacterias termo resistentes.

	Control	Control	Biorreactor
	inicial	103 días	103 días
Suelo 1	1.06 x10 ⁵	1.38 x 10 ⁴	1.06 x10 ⁶
Suelo 1 con calentamiento	1.85 x 10 ⁴	4.4 x10 ⁴	6 x10 ⁴
Suelo 2	1.68 x 10 ⁵	7.4 x10 ⁵	2.7 x10 ⁷
Suelo 2 con calentamiento	2.3 x 10 ⁴	1.08 x10 ⁵	9.5 x10 ⁵
Suelo 3	1.77 x 10 ⁵	3.4 x10 ⁶	3.5 x10 ⁷
Suelo 3 con calentamiento	7 x 10 ⁴	1.24 x10 ⁵	5.6 x10 ⁶

En las figuras 1, 2 y 3, se observa que los sistemas que recibieron el tratamiento térmico, presentaron cinéticas menores que los que no fueron sometidos al tratamiento

Las tres muestras de suelo de diferentes características granulométricas y texturales permiten observar la variación de la mineralización por parte de la población microbiana presente.

Figura 1: Cinética de mineralización del suelo 1.

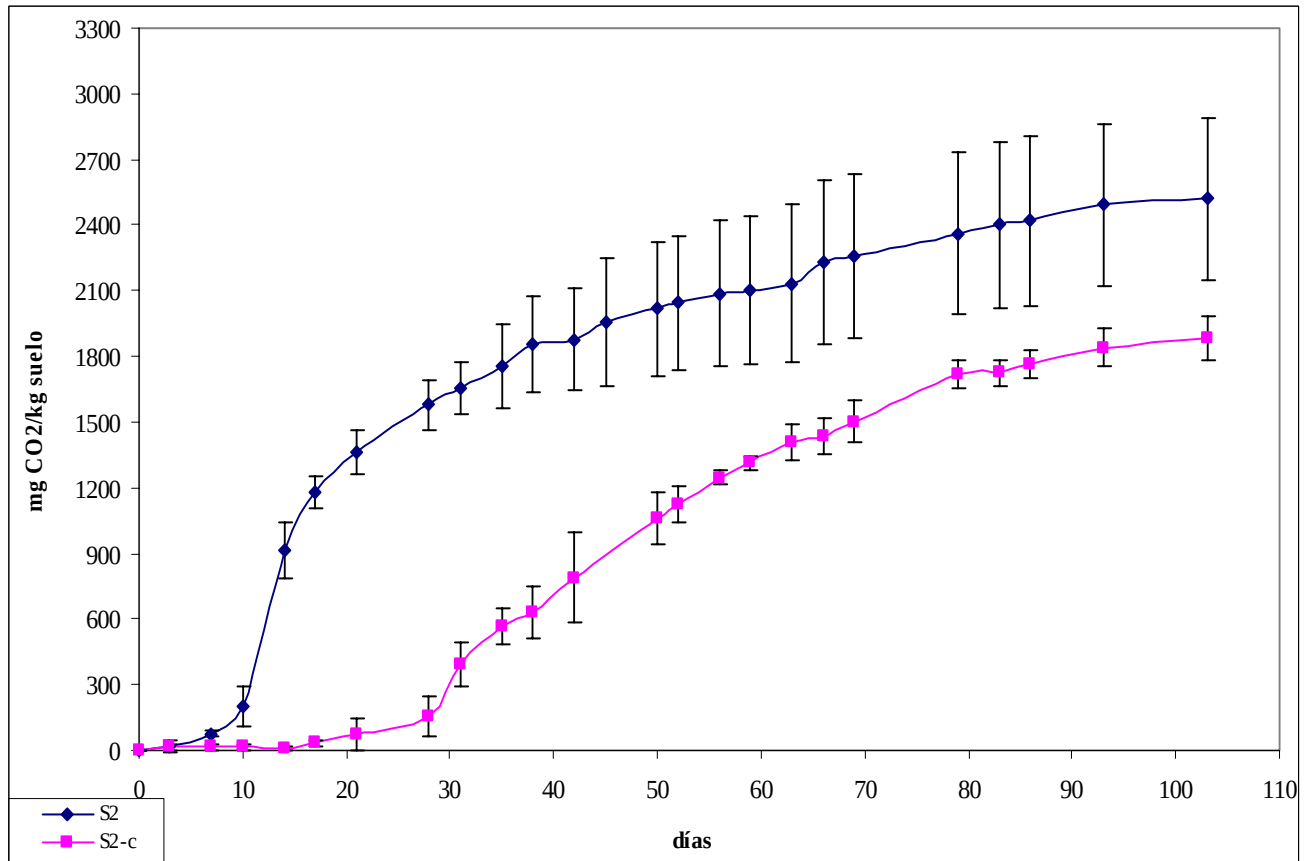


S1: Suelo 1 sin el tratamiento térmico. S1-c: Suelo 1 con el tratamiento térmico.

La cinética de mineralización de ambos sistemas difiere, mostrando que la biodegradación por parte de los microorganismos esporulados es menor respecto de la población total. Hasta el día 14 ambos sistemas siguen cinéticas similares para luego diferenciarse. La cinética de mineralización del sistema denominado S1 puede ser explicada desde el día 14 al 28 con una curva logarítmica, y a partir del día 28 al 103 con una ecuación lineal. El sistema S1-c, no presenta cambios en la mineralización desde el día 14 al 24 y del 24 al 103 se puede explicar con una ecuación lineal. En ambos casos los coeficientes de correlación son del orden de 0,98, siendo la tasa de mineralización del sistema S1 mayor respecto del otro sistema (S1-c).

En la figura dos se representan la cinética de mineralización del suelo 2. En el sistema S2, hasta el día 10, no existen cambios muy marcados en su cinética, a partir del día 14 al 38 la curva se explica con una ecuación logarítmica con un coeficiente de correlación de 0,99, y del día 42 al 103 con una ecuación lineal, cuyo coeficiente de correlación es de 0,97, en el sistema S2-c hasta el día 28 no muestra cambios y desde el día 31 al 103 la cinética de mineralización es explicada con una ecuación logarítmica, cuyo coeficiente es de 0,99.

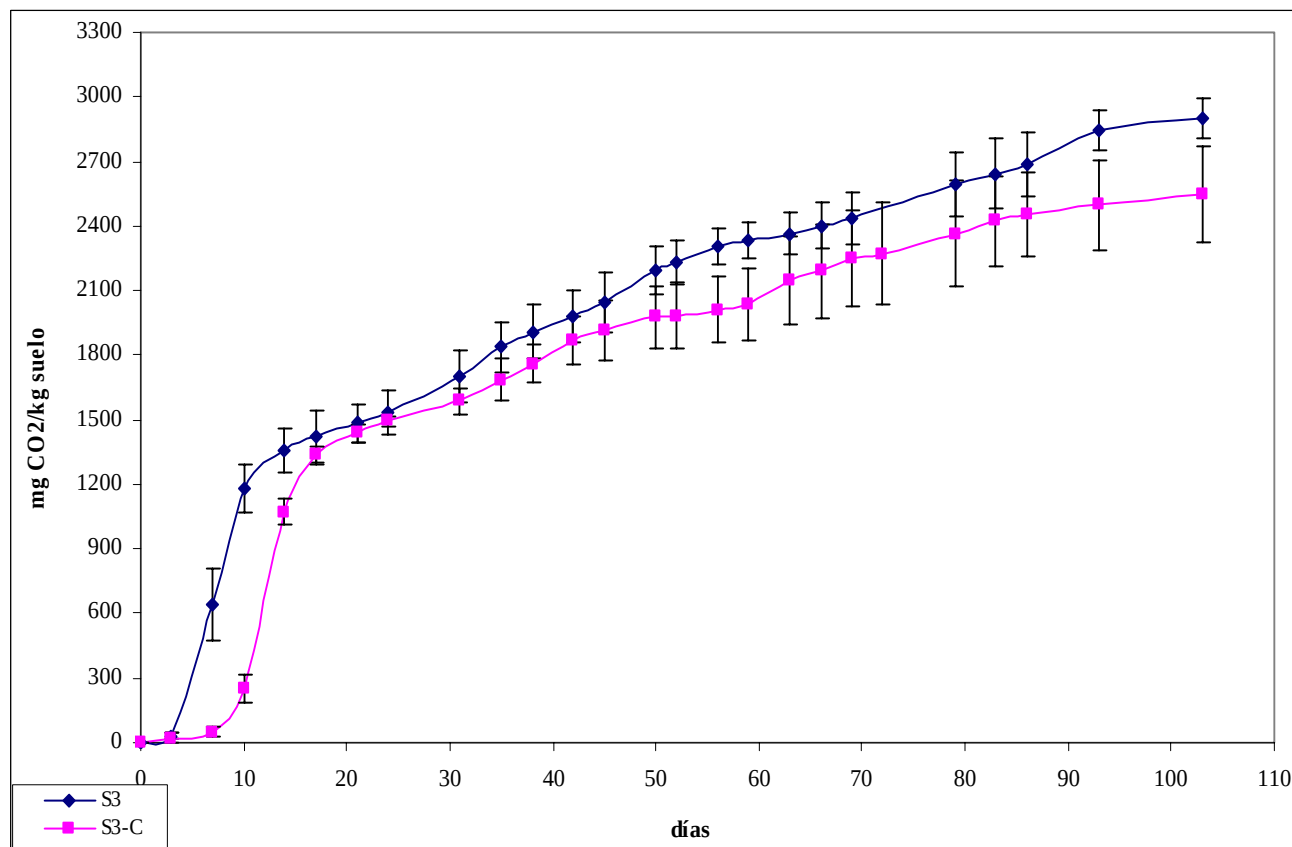
Figura 2: Cinética de mineralización suelo 2.



S2: Suelo 2 sin el tratamiento térmico. S2-c: Suelo 2 con el tratamiento térmico.

En la figura 3 se gráfico la cinética de mineralización correspondiente al suelo 3, en donde el sistema S3 y el sistema S3- c, no muestran grandes diferencias. Ambos sistemas muestran curvas similares diferenciándose al inicio, luego ambas curvas de mineralización se explican desde el día 10 al 35 para S3 y desde 14 al 38 con una ecuación logarítmica y desde 42 al 103 con una ecuación lineal, con un coeficientes de correlación de 0,96.

Figura 3: Cinética de mineralización suelo 3.



S3: Suelo 3 sin el tratamiento térmico. S3-c: Suelo 3 con el tratamiento térmico.

CONCLUSIÓN

Los microorganismos esporulados encontrados en los suelos analizados tienen un buen potencial de biodegradación de hidrocarburos, sus características de persistencia serían muy útiles para aplicarlos en técnicas de biorremediación de hidrocarburos.

BIBLIOGRAFÍA.

- Adams, D, Ribbons, D.W, 1988. The metabolism of aromatic compounds by thermophilic bacilli. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 17, 231-244.
- Alvarez, H. M. & Pucci, O. H. 1993 Biodegradation de hidrocarburos en condiciones de baja temperatura. *Petrotecnica*, 342, 3 I-34.
- Annweiler, E, Richnow, H.H, Antranikian, G, Hebenbrock, S, Garms, C, Franke, S, Franke, W y Machaelis, W, 2000. Naphtalene degradation and incorporation of naphtalene-derived carbon into biomass by thermophile *Bacillus thermoleovorans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 518:523.
- Calvo, C, Toledo, F.L, Gonzalez-López, J. 2004. Surfactant activity of naphtalene degrading *Bacillus pumilus* strain isolated from oil sludge. *Journal of biotechnology*, 109, 255-262
- Cybulski, Z, Dziurla, E, Kaczorek, E, Olszanowski, A, 2003. The influence of emulsifiers on hydrocarbon Biodegradation by *Pseudomonadacea* and *Bacillacea* strains. *Spill Science and technology bulletin*, Vol 8, 505:507.

- Conti, Marta. Primera edición. 1998. Principios de edafología, con énfasis en suelos Argentinos. Pág. 40-50.
- García Trejo A (1981) Experimentos en microbiología de suelos. Ed. Compañía Editorial Continental S.A. Primera edición. México. Pág. 11-17.
- García Trejo A (1981) Experimentos en microbiología de suelos. Ed. Compañía Editorial Continental S.A. Primera edición. México. Pág. 18-30.
- Ghazali, FM; Rahman N; Salleh, AB; Basri, M. 2004 Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. International biodegradation and biodegradation 54, 61:67.
- Olivera, N.L, Esteves, J.L y Commendatore, M.G. 1997 Alkane Biodegradation by a Microbial Community from Contaminated Sediments in Patagonia, Argentina. International Biodeterioration and Biodegradation, 40, 75-79
- Pucci OH, Back MA, Peressutti SR, Klein I, Hartig C, Alvarez HM, Wunsche L. (2000) Influence of crude oil contamination on the bacterial community of semiarid soils of Patagonia (Argentina). Acta Biotechnol. 30:129-146
- Rahman, K.S.M, Thahira-Rahman, Lakshmanaperumalsamy, P y Banat, I.M, 2002. Toward efficient crude oil degradation by mixed bacterial consortium. Biosource Technology 85, 257:261
- Sneath, P. H. 1986. Bergey's Manual of Systematic bacteriology. Vol. 2, Sección 13. Endospore forming gram positive rods and cocci., pág1115
- Sneath, P. H. 1986. Bergey's Manual of Systematic bacteriology. Vol. 2, Sección 13. Endospore forming gram positive rods and cocci. Vol. 2, pág1114