

COMUNIDADES BACTERIANAS QUE DEGRADAN HIDROCARBUROS AROMÁTICOS EN CONDICIONES DE ALTA SALINIDAD

Meshler, Mónica; Pucci, Oscar Héctor y Pucci Graciela Natalia
CEIMA Centro de Estudios e Investigación en Microbiología Aplicada,
Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

Sinopsis

El Cordón Forestal es un suelo que pertenece a la formación Patagonia, que se caracteriza por la alta concentración de sales de sulfato. Esta incorporación salina se debe a sedimentos marinos, y posteriormente al mal manejo de riego en la zona, consecuencia de la actividad antrópica con el objeto de cultivar especies forestales. Sin contaminación previa con hidrocarburos, la selección natural de bacterias con capacidad de resistir la alta salinidad puede aprovecharse con fines de biorremediación en otros suelos, en aquellos que presentan contaminación con hidrocarburos. Con base en la composición físico-química y a estudios previos del suelo, se determinó que la concentración óptima para el desarrollo bacteriano correspondió a 37810 mg/L en sulfato de sodio. En los medios líquidos se observó desarrollo con todos los hidrocarburos ensayados: benceno-tolueno-xileno, hexano-heptano, la mezcla petróleo-gas oil y especialmente con fenantreno. A partir de estos crecimientos se obtuvo una importante recuperación de cepas bacterianas degradadoras de hidrocarburos (principalmente, los aromáticos), que desarrollaron con una alta concentración de sales de sulfato, y poca recuperación bacteriana en concentraciones salinas inferiores.

Introducción

El Cordón Forestal es un suelo que presenta incorporación salina por sedimentos marinos, y además es una zona que sufrió modificación antrópica, por ejecución de un emprendimiento privado que implicó el desmonte y cultivo de especies forestales, pero debido a un mal planeamiento de riego, principalmente en los primeros años, se intensificó el proceso de salinización en áreas bajas, con infiltrado y circulación del exceso de riego por el subsuelo, provocando la disolución y transporte de sales del suelo a estas áreas, y que por evaporación, se aumentó la concentración salina (Hirts, et al, 2000).

Es un suelo, que a diferencia de otros en la Patagonia, no posee contaminación con hidrocarburos, pero que debido a las condiciones extremas allí presentes, se seleccionan microorganismos con adaptación a elevadas concentraciones salinas y capaces de degradar hidrocarburos, principalmente aquellos más recalcitrantes (Nicholson y Fathepure, 2004).

Existe un amplio conocimiento sobre el efecto de la elevada concentración de NaCl sobre comunidades bacterianas provenientes de suelos contaminados con hidrocarburos (Riis et al, 2003; Nicholson y Fathepure, 2004;), suelos no contaminados (Nicholson, Carla y Fathepure, Babu, 2005) y sobre cepas testigos y aisladas sometidas a este estrés (Steil, Leif et al, 2003; Margesin, R, Schinner, F, 2001; Roebler, Marcus et al, 2003; Roy D. Sleator, Colin Hill, 2001). Pero poco se sabe sobre el efecto que causa la alta concentración de sulfato sobre las bacterias, y su interacción con la utilización de los hidrocarburos, encontrándose en la bibliografía algunos estudios comparativos con NaCl en cepas testigos (Roebler et al, 2003), que concluyen en que el crecimiento en medios hipertónicos depende de la presencia del ión cloruro, sin embargo, los estudios realizados no consideran comunidades bacterianas de suelos, que a lo largo de los años, tuvieron contacto, y como consecuencia, adaptación a las altas concentraciones de sulfato (Pucci et al, 2003). La posible utilización de estas comunidades con fines de biodegradación, hace importante el estudio con

detenimiento de sus capacidades metabólicas y el efecto de la salinidad sobre dicha actividad. El objetivo de este trabajo es estudiar la adaptación de las comunidades bacterianas cultivables a concentraciones de sulfato elevadas utilizando distintos hidrocarburos como única fuente de carbono y energía.

Desarrollo

Materiales y métodos

La muestra se obtuvo por extracción de suelo a partir de distintos puntos del Cordón Forestal, en una época del año que sigue a las lluvias, y que provoca el afloramiento de capas salinas, posterior mezclado, y finalmente el cuarteo correspondiente, para lograr una muestra representativa con la cual se realizaron todos los ensayos.

Para la determinación de los aniones y cationes se realizaron 2 diluciones del suelo en agua destilada, para obtener resultados representativos, una dilución 1:2.5 y otra realizada con 15 g de suelo en 50 mL de agua destilada, posterior centrifugado a 4000 RPM por 30 minutos y extracción del sobrenadante para realizar los ensayos. El resto de las determinaciones se efectuaron directamente sobre el suelo en estudio.

Para conocer las características químicas y la aptitud para a biodegradación del suelo se determinó la humedad por método gravimétrico (A.G. Tejo, 1981); los nitratos (API RP 45, 1968), nitritos (API RP 45, 1968) y fosfatos (adaptación del kit de Fosfatemia de Wiener) por métodos espectrofotométricos. El pH se determinó con peachímetro utilizando para su calibración soluciones estándares de pH conocido. El calcio, magnesio, carbonato y bicarbonatos se determinaron por titulación (API RP 45, 1968); y el sulfato por método turbidimétrico (API RP 45, 1968). El sodio y el potasio se determinaron por espectrometría de llama.

Para completar el análisis se realizaron otras determinaciones: residuo orgánico e inorgánico (A.G. Trejo, 1981); densidad aparente, real y porosidad (A.G. Trejo, 1981); capacidad de retención de agua (A.G. Trejo, 1981); determinación de hierro por método colorimétrico, con lectura a 495 nm (API RP 45, 1968); de urea y amonio por método colorimétrico (adaptación del kit de Fosfatemia de Wiener).

En función a estos resultados, y con conocimientos previos de este suelo en cuanto a su composición salina (Pucci, OH et al, 2003), se estudió la tolerancia de la comunidad bacteriana cultivable del suelo a las sales a partir de una concentración original de 50.41g/L de Na_2SO_4 , 3.19 g/L de MgCl , 1.6 g/L de KHCO_3 y 9.17 g/L de KCl (que corresponde al 100% de la salinidad), con el agregado de fuentes de nitrógeno (como sulfato de amonio y fosfato ácido de amonio), y fuente de carbono (gas oil 0.1 %), realizando diluciones al cuarto (obteniéndose 75%, 50% y 25% de la salinidad) de esta concentración original y utilizando como control un medio base mineral (MBM) común, cuya composición es: NaCl (5), KNO_3 (3), K_2HPO_4 (1), $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (1), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1), MgSO_4 (0.2), todas las cantidades en g/L, agua destilada 1000mL, pH 7. A continuación se realizaron diluciones al décimo del suelo en cada una de los medios con las concentraciones decrecientes de sal. Se realizó un seguimiento por 21 días con lectura de la densidad óptica (DO) cada 7 días en espectrofotómetro a 690 nm, por duplicado. Luego de este tiempo de adaptación, se obtuvo la concentración salina óptima para el desarrollo de la comunidad bacteriana utilizando hidrocarburos como fuente de carbono y energía. El seguimiento por 14 días más permitió ampliar conocimientos sobre el efecto salino en la comunidad en estudio.

En la evaluación de la capacidad de la comunidad bacteriana de degradar hidrocarburos, se utilizaron medios líquidos con la concentración salina óptima antes determinada (50 mL MBM-75% salinidad más 5 g de suelo) y el agregado de los siguientes hidrocarburos como fuente de carbono y energía: fenantreno (0.03 %), BTX (benceno-tolueno-xileno, 0.04 %), hexano-heptano (0.05%) y P-GO (petróleo-gas oil, en una relación 40:60, 0.1 %). Para favorecer el desarrollo, también se incorporó elementos trazas (solución SL-10B al 1 %) y complejo de vitaminas B (al 0.1 %). Los ensayos se realizaron por duplicado, con incubación a 28 °C y agitación orbital. Se realizaron repiques sucesivos cada 15 días con el fin de enriquecer y seleccionar a aquellos microorganismos con capacidades biodegradativas específicas. La turbidez observada se verificó con repiques en medios sólidos (MBM-75% salinidad con 15 g/L de agar), con la misma concentración salina que el medio líquido, y el mismo hidrocarburo ensayado: el fenantreno se colocó en doble capa, las mezclas BTX y hexano-heptano, en atmósfera (las placas de vidrio contenían en su interior papel de filtro estéril impregnado en el hidrocarburo correspondiente y fueron colocadas en bolsas de poliuretano y luego se sellaron) y la mezcla P-GO se distribuyó en el agar por la técnica de diseminación en superficie. En todos los casos se respetaron las proporciones utilizadas en los medios líquidos. Se incubaron en estufa a 28 °C, por un lapso máximo de 30 días.

Resultados y discusión:

El análisis físico-químico del suelo muestra un pH levemente alcalino, con una elevada cantidad de iones sulfato (en comparación con la encontrada en otros suelos patagónicos, que rondan los 1000 mg/L, - observación personal-), y la baja cantidad o la ausencia de nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano (nitrógeno y fósforo). El suelo es pobre en cuanto a materia orgánica (en otros suelos de la región se encuentra en el rango del 8 al 13 %), que utilizarían los microorganismos como fuente de carbono. Se observa la ausencia de otras fuentes de carbono, como son los hidrocarburos.

Tabla 1: Características del Ecosistema

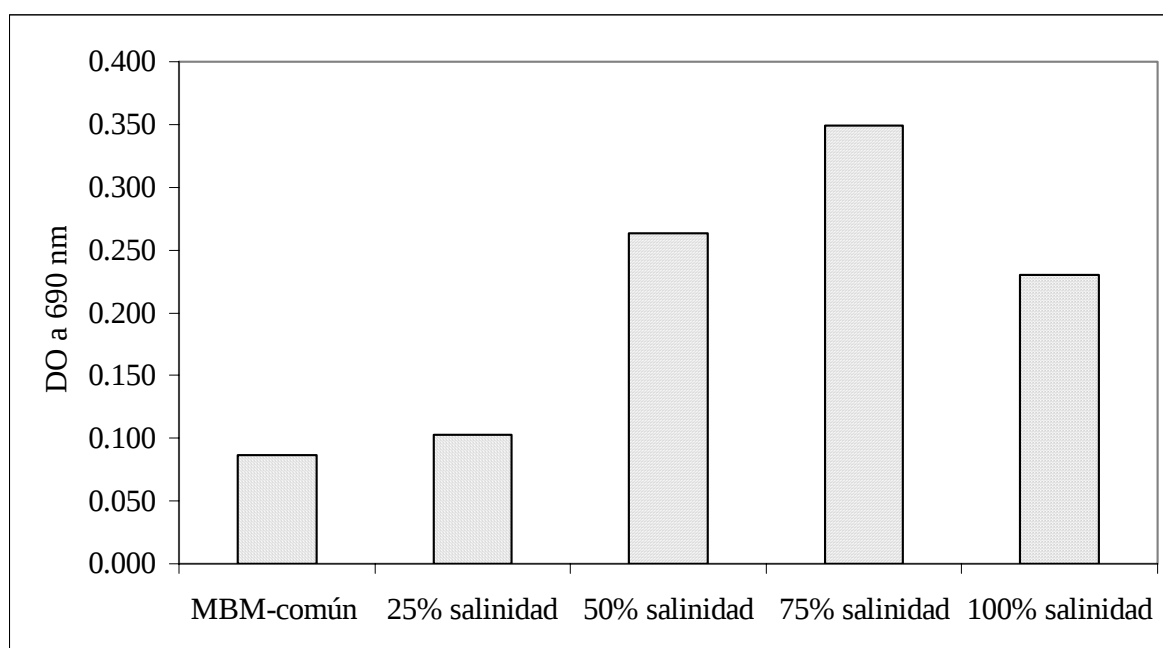
Características Físico-Químicas	
Humedad (%)	7.3 ± 0.05
PH	7.79 ± 0.21
Residuo orgánico (%)	1.85 ± 0.45
Residuo inorgánico (%)	98 ± 0.65
Densidad aparente (g/L)	1020 ± 60
Densidad real (g/L)	2805± 164
Porosidad (%)	56.8 ± 10.8
Capacidad de Retención de agua (%)	33 ± 7
Contenido de aniones y cationes	
Calcio (mg/L)	2050± 540
Magnesio (mg/L)	660 ± 130
Sodio/Potasio (mg/L)	45500 ± 638
Carbonatos (mg/L)	0.0
Bicarbonatos (mg/L)	600 ± 390
Sulfatos (mg/L)	35460 ± 4830
Cloruros (mg/L)	8190 ± 79
Hierro (mg/L)	1.56 ± 0.31
Contenido de nutrientes	
Amonio (mg/L)	0.31 ± 0.11
Nitratos (mg/L)	0.0

Nitritos (mg/L)	1.64 ± 0.81
Fosfatos (mg/L)	0.0
Urea (mg/L)	0.5 ± 0.1
Contenido de hidrocarburos	
TPH (mg/L)	0.0

Estudios realizados en otros suelos (Nicholson, Fathepure, 2004) sugieren que las bacterias halófilas poseen un potencial biodegradativo mayor al que se suponía en un principio, por lo que es de esperar que en este suelo, que posee condiciones tan extremas para la vida, se seleccionen comunidades bacterianas con capacidades adaptativas y biodegradativas interesantes para su ulterior estudio.

A los 21 días de desarrollo se decidió que el tiempo resultó suficiente para determinar la concentración óptima de sales para el desarrollo bacteriano. Esta concentración correspondió al 75% de la salinidad original ensayada del medio, es decir, una concentración de sulfato de 37.810 g/L, valor que se ubica dentro del rango de concentración encontrada en el suelo. Esta misma muestra en medios con menor salinidad logró un menor desarrollo.

Figura 1: Medida de densidad óptica del desarrollo de las comunidades bacterianas cultivables en concentraciones decrecientes de la salinidad ensayada luego de 21 días de incubación.

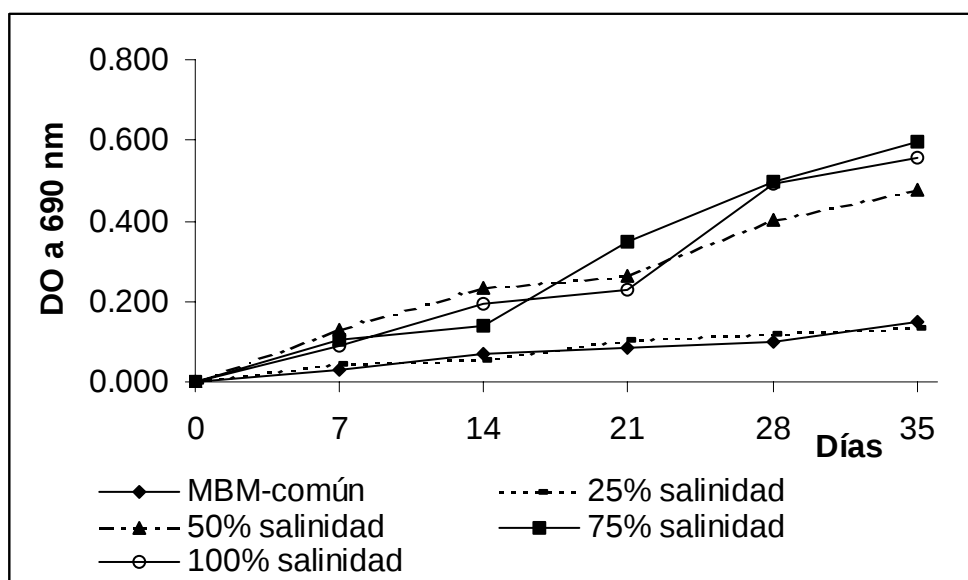


Al continuar con las lecturas por 35 días, se observó que la tendencia se mantuvo en todos los medios.

En los medios MBM común y el que posee el 25% de la salinidad ensayada, se obtuvo el menor desarrollo, muy similares entre sí a lo largo de toda la incubación, con un crecimiento 73% inferior al observado con la salinidad del 75%. Esto sugiere que las bacterias presentes en el suelo están bien adaptadas a la salinidad del suelo, y que menores concentraciones resultan inadecuadas para su recuperación. En la concentración superior ensayada (100% de salinidad) pareciera que existe cierta toxicidad sobre la comunidad bacteriana, ya que si bien el desarrollo es superior que el observado en los medios de menor concentración, parte de la comunidad no soporta tales concentraciones (en comparación con el medio de 75% de salinidad), sin embargo, al continuar con las lecturas por más

tiempo, se observa que tanto con el 50% como con el 100% de la salinidad, se obtiene una turbidez similar a la obtenida en el medio con el 75% de la concentración salina, lo que demuestra que la comunidad en estudio requiere de mayor tiempo de contacto para adaptarse a esta nueva situación, tiempo que se consideró excesivo, es por esta razón que la decisión se tomó a los 21 días.

Figura 2: Seguimiento de la densidad óptica del desarrollo de las comunidades bacterianas cultivables en concentraciones decrecientes de la salinidad.



Las curvas de desarrollo se presentan en 2 grandes grupos (figura 2), observándose que concentraciones inferiores a 25.21 g/L de sulfato de sodio resultan nocivas para la comunidad bacteriana en estudio, y si bien una determinada cantidad de microorganismos son capaces de desarrollar, la mayoría sufrió selección negativa.

Al ensayar la comunidad bacteriana con distintos hidrocarburos, se observa una importante recuperación bacteriana a los 45 días, con crecimiento en todos los medios.

Tabla 2: Capacidad de degradar hidrocarburos en concentraciones salinas óptimas de la comunidad bacteriana cultivable.

Sustratos	1° Repique	2° Repique	3° Repique
BTX	+	+	+
Fenantreno	+	+	++
Hexano-heptano	+	+	+
Gas Oil	++	++	+++
Desarrollo en medio sólido	+	+	+

+ indica intensidad de desarrollo (turbidez observada)

Es importante la presencia de bacterias degradadores de hidrocarburos aromáticos, tanto en los medios líquidos como en los sólidos, con un tiempo de aparición de colonias en este último de 30 días aproximadamente, con una adaptación a medios salinos, ya que a concentraciones inferiores la utilización del hidrocarburo fue inferior y requirió de mayor tiempo, superior a los 60 días (datos no mostrados). Aunque con reconocidas características de ser tóxicos de membrana, se presentó desarrollo en los medios con hexano-heptano y BTX como fuentes de carbono y energía, encontrándose menor cantidad de tipos morfológicos.. Como era de esperarse, el mayor crecimiento se obtuvo cuando se utilizó la mezcla petróleo-gas oil, ya que para su degradación, las bacterias

utilizan una vía metabólica común a la utilizada para degradar ácidos grasos. Estos resultados demuestran que en la comunidad en estudio se encuentran grupos metabólicos diferentes, con una o más capacidades degradativas en común, y todos adaptados a la alta salinidad.

Los aislamientos mostraron colonias mucosas, blancuzcas, muy similares entre sí, aislándose cepas que resultaron ser bacilos gram negativos, con desarrollo en 24 horas en medios que poseen altas concentraciones de sulfato; al comparar con los crecimientos obtenidos en blancos de MBM común, la recuperación bacteriana fue sensiblemente inferior.

Conclusiones

Estos resultados preliminares, sumados a la obtención de cepas en los medios sólidos correspondientes, indican la presencia de bacterias con capacidades de degradar hidrocarburos, principalmente compuestos poliaromáticos (fenantreno) y tóxicos de membrana (BTX y hexanoheptano).

Los microorganismos presentes en el suelo muestran una gran adaptación a la presencia de altas concentraciones de sales de sulfato (37.81 g/L de Na₂SO₄).

Concentraciones inferiores de sales causan una disminución en el desarrollo bacteriano y un potencial de biodegradación inferior o nulo respecto a los observados con alta concentración, lo que indica una posible asociación positiva entre la biodegradación y la concentración de sulfato, que será objeto de posteriores y más profundos estudios.

Bibliografía

- A.G.Trejo. 1981. Experimentos en microbiología del suelo. Compañía Editorial Continental S.A.
- API Recommended Practice for Analysis of oil-field Waters, API RP 45, 2nd edition, November 1968
- Dexil Corporation and Petroleum flagsistem (2001). Field measurement technologies for total petroleum hydrocarbons in soil. E.P.A. 600-R-01-060.
- Hirts, Nestor et al. 2000. Carta geoambiental de la ciudad de Comodoro Rivadavia. PI 170 FCN. UNPSJB. Secretaría de Ciencia y Técnica.
- Margesin, R., Schinner, F., 2001. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56: 650-663.
- Nicholson, Carla y Fathepure, Babu. 2004. Biodegradation of benzene by halophilic and halotolerant bacteria under aerobic condition. Appl. Environ. Microbiol. 70: 1222-1225.
- Nicholson, C. y Fathepure, B. (En prensa). Aerobic biodegradation of benzene and toluene under hypersaline conditions at the Great Salt Plains, Oklahoma. FEMS Microbiology Letters.
- Pucci, OH., Barrionuevo, C., Pozas, A.L., Acuña, A. y Pucci, G. 2003. Biodegradación de hidrocarburos en suelos con alto contenido de sulfato. IAPG, 5° Jornadas de preservación de agua, aire, y suelo de la industria del petróleo y del gas.
- Riis, V., Kleinstuber, S. And Babel, W. 2003. Influence of high salinities on the degradation of diesel fuel by bacterial consortia. Can. J. Microbiol. 49: 713-721.
- Roebler, M., Sewald, X. And Müller, V. 2003. Chloride dependence of growth in bacteria. FEMS Microbiology Letters. 225: 161-165.
- Roy D., Sleator, Colin Hill. 2001. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. FEMS Microbiology Reviews. 26: 49-71.
- Steil, L., Hoffmann, T., Budde, I., Völker, U. And Bremer, E. 2003. Genome-wide transcriptional profiling analysis of adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity. Journal of Bacteriol. 185: 6358-6370.