

Biodegradación de Hidrocarburos en Condiciones de Baja Temperatura

La principal actividad económica de la ciudad de Comodoro Rivadavia y sus alrededores es la explotación petrolera. Como consecuencia de esto, frecuentemente las costas de la región son contaminadas con hidrocarburos, fundamentalmente en zonas de carga y descarga de petróleo y derivados. La recuperación cuantitativa de los hidrocarburos derramados es casi imposible y en la mayoría de los casos la degradación microbiana constituye el principal mecanismo de remoción.

La biodegradación de hidrocarburos puede ocurrir en un amplio rango de temperaturas, habiéndose aislado microorganismos utilizadores de hidrocarburos *psicrófilos*, *mesófilos* y *termófilos*. Se definen como *termófilos* aquellos microorganismos que crecen a temperaturas elevadas (por encima de 50°C), como *mesófilos* aquellos que crecen bien en un rango intermedio (20°C a 45°C) y *psicrófilos* los que crecen bien entre 0°C y 7°C con temperatura óptima por debajo de 20°C.

El proceso de degradación depende de la composición de la comunidad microbiana y de su capacidad adaptativa a la presencia y composición de los hidrocarburos.

El clima y las estaciones seleccionan las diferentes poblaciones de microorganismos con capacidad de degradar hidrocarburos, los

que se adaptan a la temperatura ambiente.

La población microbiana del ambiente marino patagónico, contaminado con hidrocarburos es poco conocida. Las condiciones climáticas de la región, con bajas temperaturas y fuertes vientos, sumados a la presencia de hidrocarburos, pueden determinar la existencia de bacterias con capacidad de degradar hidrocarburos a bajas temperaturas (*psicrófilas*).

El presente trabajo tiene por objeto detectar la presencia, en nuestra región, de bacterias marinas con capacidad de degradar hidrocarburos en condiciones de baja temperatura.

MATERIALES Y MÉTODOS

Método de muestreo. Se tomaron muestras de agua de mar superficiales en cuatro puntos de la costa de Comodoro Rivadavia, entre los meses de julio a diciembre de 1992.

Se utilizó un colector metálico estéril con capacidad para dos l. Este fue transportado inmediatamente al laboratorio, en recipiente con hielo para su procesamiento.

Procesamiento de la muestra, medios de cultivo y condiciones de crecimiento. Con el fin de aislar microorganismos *psicrófilos* con capacidad de degradar hidrocarburos se utilizan medios de cultivo sólidos y líquidos para el método de enriquecimiento. Para este último, se filtraron 500 ml de muestra en membranas de 0,45µ para concentrar las bacterias. Las membranas se incubaron en *erlenmeyer* de 500 ml, con 100 ml de medio base

res a las del ambiente de donde fueron recuperadas.

Según los resultados registrados durante el crecimiento de las cepas a distintas temperaturas, las dividimos en dos grupos. Por un lado, aquellas bacterias que fueron incapaces de desarrollarse a 30°C, pero sí a temperaturas menores, creciendo incluso a 0°C (*psicrófilas*). El 33% del total de las cepas estudiadas pertenecieron a este grupo (Grupo I). El 67% restante poseen la capacidad de desarrollarse en un amplio rango de temperaturas que va desde 0°C a 30°C (Grupo II). De este grupo sólo 2 cepas (6%) no crecieron a 0°C (cepas 211 y 223). Ninguna de las 32 cepas crecieron a 37°C.

El crecimiento en las distintas temperaturas se produjo en diferentes lapsos de tiempo. Mientras que a 25-30°C produjeron turbidez visible en medios de cultivo líquido en 24-48 hs., a 0°C lo hicieron en 1-2 semanas.

Como era previsible, en el medio de cultivo sin hidrocarburo (*Plate-Count*) hubo mayor diversidad de cepas, de las cuales muchas no eran utilizadoras de hidrocarburos. En los medios de cultivo sólidos con petróleo como única fuente de carbono y energía, la diversidad fue más restringida, observándose colonias visibles a 7°C en un período de 1 a 2 semanas, mientras que a 0°C después de las 3 semanas. El crecimiento sobre mezclas de hidrocarburos tales como gas-oil, nafta, kerosene y sobre hidrocarburos simples como *pentano*, *hexano*, *tolueno* y *benzato de sodio*, se observan en el gráfico N° 2.

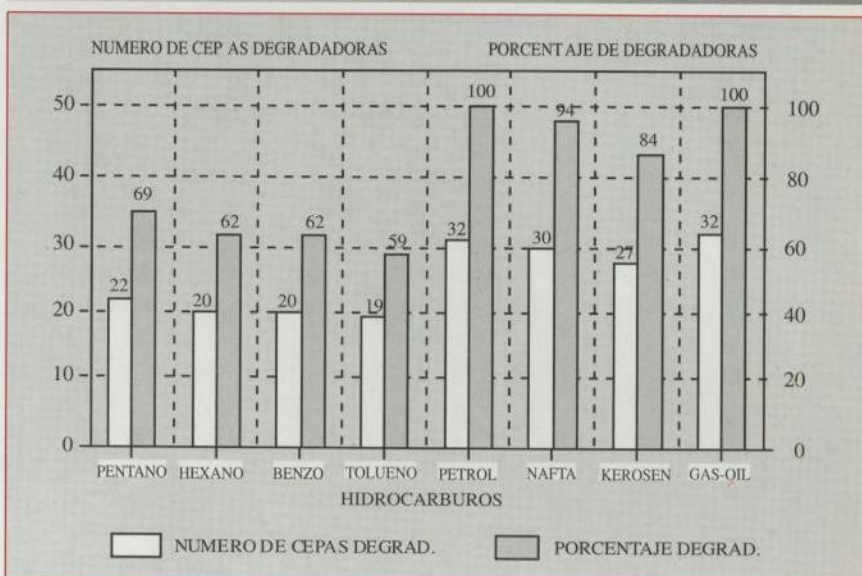
No fue posible la identificación de las cepas a nivel de género con los tests realizados, excepto en el caso de la cepa 320 que según los resultados de las pruebas, sumados a la sensibilidad al agente vibriostático 0-129, se supone que es un *Vibrio sp.*

Teniendo en cuenta las características tinctoriales de cada cepa, se observó que hay un predominio de bacterias *Gram negativas*. De las 32 cepas estudiadas, el 78% fueron *Gram negativas* y el 22% *Gram positivas*.

De acuerdo con los resultados del test de

Gráfico • 2

Crecimiento en base a Hidrocarburos



Hugh y Liefson para evaluar el metabolismo bacteriano fermentativo u oxidativo, se los dividió en dos grupos: *fermentadores* y *no fermentadores*. Dentro de estos últimos, encontramos a las oxidadoras y a las inertes. (Gráfico N° 3).

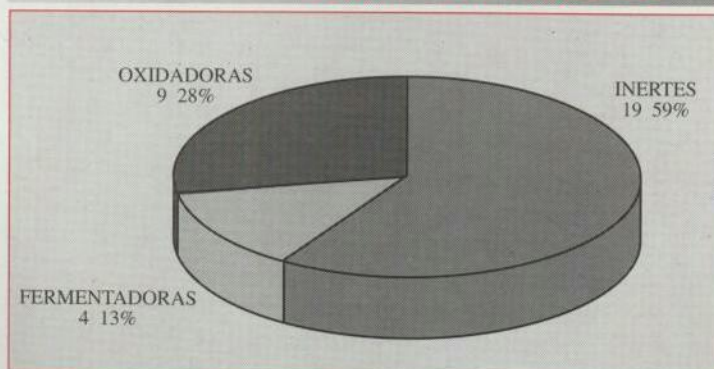
Según se observa en este gráfico, el 87% de las cepas fueron no fermentadoras de glucosa, mientras que el 13% restante sí.

DISCUSIÓN

La población microbiana de las costas del Golfo San Jorge, poseen la capacidad no sólo de sobrevivir sino también de

Gráfico • 3

Características Metabólicas



desarrollarse en ambientes con bajas temperaturas. Los resultados indican que la comunidad microbiana durante el período investigado está formada predominantemente por microorganismos psicrófilos. Éstos parecen tener una ventaja selectiva en el ambiente marino de nuestra localidad en la época invernal.

La presencia de contaminantes químicos en el mar como son los hidrocarburos, parecen haber producido una selección de la población bacteriana autóctona, determinando la presencia de microorganismos con capacidad de utilizar hidrocarburos a temperaturas entre 6°C y 18°C, temperaturas del agua de mar en invierno y verano respectivamente.

Las cepas estudiadas demostraron tener capacidad de utilizar hidrocarburos a bajas temperaturas (7°C), de crecer en un amplio rango de temperaturas y de tolerar la concentración salina del mar (3,5%) y aun mayores. Por lo tanto, la presencia de este tipo de microorganismos en el mar hace suponer que el proceso de degradación de hidrocarburos puede ser continuo a lo largo del año, con variaciones en el índice de degradación de invierno a verano.

De todos modos, al afirmar esto, deben ser considerados tres puntos importantes.

- 1) Si bien las cepas recuperadas utilizan hidrocarburos a bajas temperaturas, es necesario determinar la velocidad de degradación, es decir los índices de degradación.
- 2) Se deben tener en cuenta algunos factores importantes que actúan en los ambientes fríos, como son los cambios de viscosidad de las mezclas de hidrocarburos y la retención del potencial tóxico de algunos hidrocarburos livianos, que tienen un gran efecto sobre la actividad bacteriana.
- 3) La degradación de mezclas complejas de hidrocarburos, como es el petróleo, puede no ser completa ya que cada microorganismo puede metabolizar sólo un rango limitado de hidrocarburos.

Cabe considerar algunos aspectos que surgen del análisis de los resultados obtenidos y que sin duda deben ser profundizados en futuros estudios.

Siete de las cepas estudiadas han demostrado tener la capacidad de utilizar benzoato pero no tolueno. Según Atlas, existen dife-

rentes formas de ataque oxidativo inicial del tolueno, dependiendo del tipo de bacteria:

- En una de estas vías, el tolueno es oxidado inicialmente en su grupo *metilo a ácido benzoico*, seguido posteriormente a la ruptura del anillo aromático.
- En la otra, el anillo aromático es atacado por una *dioxigenasa* formando un *dihidrodiol*, permaneciendo el grupo metílico del tolueno intacto durante este ataque inicial, sin convertirse en ácido benzoico.

Las siete cepas (306-314-315-317-319-408-410) utilizarían esta última vía de ataque al tolueno, no teniendo la capacidad de degradar el benzoato. Mientras que, el resto de las cepas estudiadas, podrían utilizar la primera ruta o ambas a la vez.

Puede también desatacarse que alguna de las cepas analizadas, utilizan nafta y gas-oil pero no kerosene. En estos casos, puede ocurrir que algunos de los componentes del kerosene a la concentración utilizada en el ensayo ejerza algún efecto tóxico sobre las cepas que impida su desarrollo. Lo mismo puede ocurrir con aquellas cepas que crecen en gas-oil y kerosene pero no en nafta.

Con los tests realizados no fue posible la identificación de las cepas recuperadas. Esto concuerda con lo expuesto por Austin respecto de la identificación de bacterias marinas. La mayoría de los test bioquímicos usados para determinar características fenotípicas de las bacterias están basados en los utilizados en bacteriología clínica, por lo tanto, pueden no ser aplicables a la gran diversidad genética y funcional de las bacterias ambientales.

El presente trabajo es un estudio preliminar sobre el proceso de biodegradación de hidrocarburos en las costas del Golfo San Jorge, que ha de servir como base para futuros estudios sobre el tema en la Patagonia.

Héctor M. Álvarez - Oscar H. Pucci

Cátedra de Microbiología; Universidad Nacional de la Patagonia, San Juan Bosco.