

Degradación de hidrocarburos aromáticos por bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo en el estado Zulia, Venezuela.

Mariangela Bracho, Laugeny Díaz y Luz Marina Soto

Laboratorio de Microbiología Acuática, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Apartado 526. Maracaibo, Venezuela. E-mail:

mabracho@hotmail.com

Resumen

Se evaluó la degradación de algunos hidrocarburos aromáticos por bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo en el estado Zulia, Venezuela. El aislamiento bacteriano se llevó a cabo a través del inóculo de un gramo de suelo, en 30 mL de medio mínimo mineral y antraceno al 0,05% p/v, en fiolas de 150 mL, las cuales se incubaron con 37°C con agitación constante. La capacidad degradativa de las bacterias aisladas sobre naftaleno, antraceno, fenantreno y DBT se analizó a través de la técnica de Kiyohara. Se aisló un total de 37 cepas bacterianas, de las cuales 54,05% correspondieron a bastones Gram negativos, 24,32% a bastones Gram positivos y 21,62% a cocos Gram positivos. El mayor número de aislamientos por géneros fue: Pseudomonas (54,05%) > Bacillus (24,32%) > Staphylococcus (16,21%) > Micrococcus (5,40%). El 100% de las cepas estudiadas degradaron los hidrocarburos naftaleno y antraceno. El fenantreno fue degradado por el 100% de los cocos Gram positivos, el 83,33% de los bacilos Gram positivos y el 78,57% de los bacilos Gram negativos; el DBT mostró una mayor resistencia a la degradación. Se demostró la capacidad que poseen algunas bacterias provenientes de suelos contaminados con petróleo para la degradación de hidrocarburos constituyendo éstas un potencial importante para la biorrecuperación de los sustratos impactados.

Palabras claves: Bacterias, biodegradación, hidrocarburos aromáticos, estado Zulia, Venezuela.

Degradation of aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from soils contaminated with petroleum, Zulia state, Venezuela

Abstract

In this research, the capacity to degrade several polycyclic aromatic hydrocarbons of bacteria isolated from a petroleum contaminated soil in Zulia State, Venezuela, was

evaluated. Bacterial isolation was carried out putting 1gr of soil, in 30 mL of minimum mineral media with 0.05% p/v of anthracene, in erlenmeyers of 150 mL. These were incubated to 37°C in constant agitation. Bacterial degradation was determined through the technique of Kiyohara et al. A total of 37 bacterial strains were isolated, 54.05% of these, corresponded to gramnegative rods, 24.32% to grampositive cocci and 21.62% to grampositive rods. The order of isolation by genus was Pseudomonas (54.05%) < Bacillus (24.32%) < Staphylococcus (16.21%) < Micrococcus (5.40%). Naphthalene and phenanthrene were degraded by 100% of the strains. Phenanthrene was degraded by 100% of grampositive cocci, 83.33% of the grampositive rods and 78.57% of the gramnegative rods, in contrast to DBT, which was degraded by 88.8% of the grampositive cocci, 71.42% of the grampositive rods and 50% of the grampositive cocci. These results demonstrate the ability of bacteria isolated from petroleum contaminated soil to degrade hydrocarbons which could be used in bioremediation of impacted substrates.

Key words:

Bacteria, biodegradation, polycyclic aromatic hydrocarbons, Zulia state, Venezuela.

Recibido: 30 Septiembre 2004 / Aceptado: 03 Diciembre 2004

INTRODUCCIÓN

En Venezuela, y especialmente en la región zuliana, los riesgos de contaminación con petróleo son muy altos, principalmente por el manejo de los depósitos de desechos de la industria y los accidentes que pueden ocurrir en los sitios de explotación (Kanaly y Harayama 2000).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos, presentes en el petróleo, constituyen contaminantes que tienen gran impacto en los ecosistemas, debido a que alteran el equilibrio ecológico, y pueden ser carcinógenos y mutágenos para el hombre (Atlas y Bartha 2002). El naftaleno, antraceno, fenantreno y dibenzotiofeno (DBT), han sido los hidrocarburos más estudiados debido a que forman parte de una amplia variedad de productos de importancia biológica, química e industrial (Van Hamme et al. 2003).

En los últimos años se ha incrementado el interés en el uso de biotecnologías destinadas a restaurar o recuperar suelos contaminados con petróleo, que complementen los métodos químicos y físicos tradicionales. Esta tecnología, denominada bio restauración, se basa en el uso de microorganismos para degradar los hidrocarburos presentes en el petróleo y otros combustibles, y representa uno de los principales mecanismos por los

cuales estos contaminantes hidrocarbonados se pueden eliminar del ambiente. Esta tecnología involucra el uso de microflora aislada de ambientes impactados, siendo hasta el presente los géneros más utilizados: Pseudomonas, Achromobacter, Arthrobacter, Brevibacterium, Corynebacterium, Micrococcus, Nocardia, Bacillus, Vibrio, Acinetobacter, Flavobacterium, Rhodotorula y Sporobolomice (Johsen et al. 2002).

Se han reportado numerosos trabajos sobre la biodegradación efectiva del petróleo en suelos contaminados, mediante el uso de metodologías que involucran el empleo de medios enriquecidos o condiciones que favorecen el desarrollo de cepas de interés con capacidades biodegradativas, y que a la vez limitan, por competencia, el desarrollo de cepas que no presentan estas propiedades (Wick et al. 2003).

El objetivo de este trabajo es aislar e identificar, morfológica y fisiológicamente, cepas bacterianas con potencial capacidad de degradar hidrocarburos aromáticos bicíclicos, tricíclicos y heterocíclicos, de suelos contaminados con petróleo, estado Zulia, Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

ORIGEN DE LA MUESTRA

Se tomaron muestras, por triplicado, de tres zonas seleccionadas al azar, impactadas por petróleo y con un largo período de contaminación, en el Centro de Acopio y Tratamiento de Materiales (CATE) del Campo La Concepción, municipio Jesús Enrique Lossada, estado Zulia, Venezuela.

Se midió in situ la temperatura y el pH del suelo, y en el laboratorio se determinó el contenido de aceites y grasas, hidrocarburos del petróleo y la concentración de antraceno del suelo, de acuerdo a la metodología de la Agencia del Protección al Ambiente de los Estados Unidos (EPA 1998) número: EPA 3550 & SM 195520C, EPA 3550 y EPA 418,1.

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

AISLAMIENTO DE LAS CEPAS BACTERIANAS

Se inoculó 1 gramo de cada muestra de suelo en fiolas de 150 mL con 30 mL de medio mínimo mineral (MMM) con antraceno. El MMM empleado fue el propuesto por Jobson et al. (1972), el cual contiene por litro de solución: NH_4Cl 1,2 g, KNO_3 2,4 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,00067 g, Na_2SO_4 2,4 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,04 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,65 g, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02 g.

El hidrocarburo se adicionó a una concentración de 0,05% p/v (Jobson et al. 1972), y las fiolas se incubaron a 37°C, con agitación constante de 150 rpm, durante 10 días hasta observar la turbidez característica del crecimiento bacteriano. Al transcurrir este período, se tomó 0,1 mL, de cada fiola, y se sembró en placas que contenían el mismo medio anteriormente descrito solidificado con agar al 2%. Las placas se incubaron a 37°C hasta observar el crecimiento y la aparición de colonias aisladas.

CARACTERIZACIÓN MACRO Y MICROMORFOLÓGICA DE LAS CEPAS BACTERIANAS QUE CRECEN EN PRESENCIA DE ANTRACENO

Se seleccionaron las colonias bacterianas, degradadoras de antraceno, que mostraron diferencias macromorfológicas entre sí. Se procedió a una caracterización macroscópica, la cual se realizó tomando en consideración aspectos como: margen, espesor, forma, opacidad, consistencia, color, tamaño y superficie de la colonia. A cada una se le realizó una caracterización micromorfológica con ayuda de la técnica de tinción de Gram para observar: afinidad tintorial, morfología bacteriana y arreglo celular (Murray et al. 1999).

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA E IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS

Se emplearon los protocolos para el aislamiento e identificación bacteriana, reportados por Holt (1984) y Murray et al. (1999).

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DEGRADATIVO DE LAS BACTERIAS AISLADAS

La evaluación de la capacidad de utilización de los hidrocarburos antraceno, naftaleno, fenantreno y DBT, como única fuente de carbono por las bacterias, se llevó a cabo a través del método propuesto por Kiyohara et al. (1982). Se utilizaron placas de MMM y agar al 1,5%, rociadas de manera homogénea con naftaleno, antraceno, fenantreno y DBT, disueltos en acetona al 0,05%. Las placas se incubaron, antes de su inoculación, durante toda la noche, con el fin de eliminar el solvente por evaporación.

Se utilizó un cultivo de cada una de las cepas estudiadas, como inóculo, con una densidad óptica correspondiente a la del tubo N° 2 del nefelómetro, el cual se sembró en forma de cuadrícula con un hisopo estéril en placas de agar nutriente y se incubaron a 37°C por 24 a 36 horas.

Posteriormente, con un palillo de madera estéril se transfirieron las colonias crecidas a las placas con hidrocarburo. Luego de la inoculación, las placas se incubaron a 37°C y se

observaron periódicamente, durante 15 días, a través de un transiluminador UVP CHROMATO-VUE modelo TM-36, para determinar el crecimiento o la aparición de zonas claras alrededor de las colonias, indicadores de la capacidad de la bacteria para degradar los hidrocarburos (Kiyohara et al. 1982).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La temperatura del suelo, en las tres zonas muestreadas, osciló entre 36 y 37 °C, con un promedio de 36,33 °C. La temperatura ejerce una marcada influencia en la biodegradación del petróleo, por su efecto en la naturaleza física y composición química del mismo, en la velocidad de degradación del hidrocarburo por los microorganismos y sobre la composición de la comunidad microbiana (Atlas y Bartha 2002). Numerosos trabajos señalan que la temperatura óptima para que los microorganismos degraden el petróleo se encuentra en un intervalo entre 20 a 35 °C (Van Hamme et al. 2003). Sin embargo, Bossert y Bartha (1984) demostraron que las temperaturas altas, entre 30 a 40 °C, incrementan al máximo la velocidad del metabolismo de los degradadores de hidrocarburos.

El pH varió entre 7,1 y 7,4 y se ubicó dentro de los límites establecidos por la normativa ambiental venezolana, la cual considera a este parámetro como un factor prioritario para controlar el crecimiento bacteriano, a los fines de garantizar la integridad biológica de los suelos, con un nivel aceptable en el intervalo de 5 a 10. Los estudios realizados con bacterias degradadoras señalan que en el rango de pH de 5,2 a 7,0 se produce la mineralización del hidrocarburo, siendo el pH óptimo 7,0 (Kastner et al. 1998).

El contenido porcentual de aceites y grasas fluctuó entre 1,5 y 6,9, con un valor promedio de 3,5; y las concentraciones de los hidrocarburos del petróleo oscilaron entre 4,1 a 4,3 con un promedio de 4,2. En cualquiera de los casos, estos valores fueron más altos que los reportados por Leahy y Colwell (1990) quienes demostraron que el incremento en las concentraciones de hidrocarburos en el suelo hasta un 1,5%, causa una disminución de la actividad microbiana, mientras que por encima de este valor se incrementa la toxicidad de los compuestos hidrocarbonados, presentes en el petróleo, sobre los microorganismos.

Se aislaron 37 cepas bacterianas capaces, en su totalidad (100%), de degradar los hidrocarburos aromáticos policíclicos naftaleno y antraceno; un 78,57% degradó el fenantreno y sólo un 71,42% el DBT. El menor porcentaje de bacterias que tuvieron acción en el DBT indica que este hidrocarburo es el más resistente al ataque microbiológico. La recalcitrancia de este compuesto podría estar relacionada tanto a factores físicos (estructura), como a restricciones enzimáticas de las bacterias (Baldi et al.

2003).

Kanaly y Harayama (2000) demostraron que los hidrocarburos aromáticos alquilsustituídos y heterocíclicos azufrados son más recalcitrantes que sus contrapartes no sustituidas. La estructura del DBT es mucho más compleja que la correspondiente al antraceno y al fenantreno. La presencia de un grupo funcional azufrado en la estructura del anillo aromático, afecta la acción de las enzimas dioxigenasas encargadas de oxidar los enlaces carbono-carbono de los compuestos aromáticos (Atlas y Bartha 2002).

De las 37 cepas bacterianas aisladas: 20 (54,05%) correspondieron a bastones Gram negativos, 9 (24,32%) a bacilos Gram negativos, y 8 (21,62%) a cocos Gram positivos. El orden, en cuanto al mayor número de aislamientos de cepas por grupos morfológicos, fue: bastones Gram negativos > bacilos Gram negativos > cocos Gram positivos. Estos resultados concuerdan con lo reportado en otros trabajos (Kastner et al. 1998, Langworthy et al. 1998, Kanaly y Harayama 2000, Dupontt 2000, Díaz 2001).

Las cepas bacterianas se biotipificaron de acuerdo a sus características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas como: *Pseudomonas* 20 (54,05%), *Bacillus* 9 (24,32%), *Staphylococcus* 6 (16,21%) y *Micrococcus* 2 (5,40%) (Tabla 1). El orden, en cuanto al mayor número de aislamientos por género bacteriano fue: *Pseudomonas* > *Bacillus* > *Staphylococcus* > *Micrococcus*. La capacidad degradativa de estas especies se ha reportado por otros autores (Bossert y Bartha 1984, Dupontt 2000, Díaz 2001).

Se identificaron 16 cepas de *Pseudomonas stutzeri* y 4 cepas de *Pseudomonas alcaligenes*. El género *Pseudomonas*, más abundante Tabla 1, probablemente es el más versátil en la utilización de los hidrocarburos (Finnerty et al. 1983, Fuenmayor y Rodríguez 1992, Williams et al. 1995, Kastner et al. 1998, Kanaly y Harayama 2000, Díaz 2001, Johsen et al. 2002).

TABLA 1. Cepas bacterianas aisladas.

Grupo bacteriano	Nº de aislamientos	Porcentaje
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	16	43,24%
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	4	10,81%
<i>Bacillus sp.</i>	9	24,32%
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	10,81%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	5,40%
<i>Micrococcus sp.</i>	2	5,40%
Total	37	100%

Las cepas pertenecientes al género *Staphylococcus*, se identificaron como: *Staphylococcus aureus* (4 cepas) y *Staphylococcus epidermidis* (2 cepas). Existen pocos registros que indican la capacidad de estas especies de degradar hidrocarburos; lo cual se puede relacionar con un desplazamiento competitivo de la microflora bacteriana mayoritariamente Gram negativa.

Los cocos Gram positivos, representados por los géneros *Micrococcus* y *Staphylococcus*, mostraron capacidades degradativas sobre un rango de sustratos mayor que el correspondiente a los bacilos *Pseudomonas* y *Bacillus*; el 100% y 88,8% de los cocos fueron capaces de degradar el fenantreno y el DBT, a diferencia del 83,3% y 71,4% de los bacilos Gram positivos y del 78,57% y 50% de los bacilos Gram negativos, respectivamente. Sin embargo, esto no determina que los mismos metabolicen un mayor porcentaje de los hidrocarburos.

Soto (2001) demostró que aunque los cocos Gram positivos (*Micrococcus*) muestran una mayor tasa de crecimiento sobre el DBT, los bacilos tienen la capacidad de utilizarlo de una forma más eficiente y a una mayor velocidad.

CONCLUSIONES

Se demostró la capacidad que poseen las cepas bacterianas autóctonas, aisladas de suelos contaminados con petróleo, para degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos.

LITERATURA CITADA

1. ATLAS R. y R. BARTHA. 2002. Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. Cuarta Edición. Editorial Pearson Educación, SA. Madrid. 677 p.

2. BALDI F., M. PEPI. y F. FAVA. 2003. Growth of *Rodospiridium* in dibenzothiophene cristal and orimulsion. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4689- 4696.
3. BOSSERT I. y R. BARTHA. 1984. The fate of petroleum in soil ecosystems. In: ATLAS R.M. (Ed.), *Petroleum Microbiology*. Macmillan Publishing Co., New York. 473 p.
4. DIAZ L. 2001. Caracterización del perfil plasmídico, susceptibilidad a antibióticos y a metales pesados en bacterias hidrocarbonoclasticas aisladas de sedimento marino. Trabajo de Grado para optar al Grado de Magister Scientiarum en Microbiología. Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. 262 p.
5. DUPONTT J. 2000. Resistencia a metales pesados y a antibióticos en cepas bacterianas biodegradadoras de antraceno aisladas de la playa "Caimare Chico". Trabajo Especial de Grado de Licenciatura en Biología. Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. 118 p.
6. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA) USA. 1998. Test methods for evaluating solid waste-physical / chemical methods. US-EPA SW-846, 3rd Edition. 322 p.
7. FINNERTY W.R., K. SHOCLEY y H. ATAWAY. 1983. Microbial desulfurization of fossil fuels: A review. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 16: 205-221.
8. FUENMAYOR S. L. y V. RODRÍGUEZ. 1992. Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons degradative soil *Pseudomonas*. *Acta Científica Venezolana* 43: 349-354.
9. HOLT J. G. 1984. *The Shorter Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Eighth Edition. The Williams & Wilkings Company. Baltimore. The United States of America. 197 p.
10. JOBSON A., F. D. COOK y D. W. S. WESTLAKE. 1972. Microbial utilization of crude oil. *Applied Microbiology* 23 (6):1082-1089.
11. JOHSEN A., A. WINDING, U. KARLSON y P. ROSLEV. 2002. Linking of microorganisms to phenanthrene metabolism in soil by analysis of C¹³-labeled cell lipids. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 6106-6113.
12. KANALY R y S. HARAYAMA. 2000. Biodegradation of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology* 182: 2059-2067.
13. KASTNER M., M. BREUER-JAMMALI y B. MARRO. 1998. Impact of inoculation

protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and survival of PAHs-degrading bacteria introduced into soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 359-462.

14. KIYOHARA H., K. NAGAO y K. YANA. 1982. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 454-457.

15. LANGWORTHY D., R. STAPLETON, G. SAYLER y R. FINDLAY. 1998. Genotypic and phenotypic responses of a riverine microbial community to polycyclic aromatic hydrocarbon contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3422-3428.

16. LEAHY J. G. y R. R. COLWELL. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews* 20: 30-315.

17. MURRAY P., E. BARON, M. PFALLER, F. TENOVER y R. YOLKEN. 1999. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th edition. ASM Press. Washington. D.C. 1773 p.

18. SOTO L. M. 2001. Influencia de las relaciones bacterianas interespecíficas en el proceso de biodesulfuración de hidrocarburos aromáticos. Tesis para optar al título de Doctor en Ecología. Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela. 132 p.

19. VAN HAMME J., A. SING y O. WARD. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67:503-549.

20. WICK L., N. PASCHE, S. BERNASCONI, O. PELZ y H. HARMS. 2003. Characterization of multiple-substrate utilization by anthracene-degrading *Mycobacterium frederiksbergense* LBSOIT. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:6133-6142.

21. WILLIAMS E., M. ALTEKEN y O. PELZ. 1995. Competitive metabolism of naphthalene, metylnaphthalene and fluorine by phenanthrene-degrading *Pseudomonas*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 357-362.