

Grupos funcionales de bacterias con potencial para Biodegradación de Hidrocarburos

Reyna Windevoxlhel^{*a}, Nereida Sánchez^a, Neudis Subero^a, Héctor Bastardo^b, Nora Malaver^b

^aFacultad de Ingeniería de la Universidad de Carabobo, Laboratorio de Investigación y Tecnología en Suelo y Ambiente LITSA.

^bLaboratorio de Microbiología Ambiental, Instituto de Zoología Tropical, Universidad Central de Venezuela

Resumen.-

La capacidad de ciertos microorganismos para utilizar hidrocarburos como fuente de carbono y energía resulta de gran importancia para la industria petrolera por su potencial en la recuperación mejorada de crudos y en la recuperación de ambientes impactados por la actividad petrolera. El objetivo principal de este estudio consistió en la conformación de un banco de cultivos bacterianos que puedan ser utilizados en tratamientos de biorremediación. Se analizaron tres suelos impregnados de crudo. Se aislaron y purificaron 40 colonias bacterianas de cada fuente, que fueron caracterizadas fenotípicamente, y en las cuales se identificó su respuesta enzimática ante una serie de pruebas bioquímicas, con el fin de determinar su capacidad para degradar sustratos complejos y producir metabolitos tensio-activos. El procesamiento estadístico de estos resultados permitió la identificación de los distintos grupos funcionales y de identidad funcional para cada residuo, así como para todos los residuos en conjunto.

Palabras clave: microorganismos, grupos funcionales, biorremediación, potencial degradador, biosurfactantes, derrames de petróleo

Functional Groups of Bacteria with Potential Capacity by Hydrocarbons Biodegradation from Oil Spills

Abstract.-

The capacity of certain microorganisms to use fractions of hydrocarbons as source of energy is of great attention for the petroleum industry, because of their potential in the microbial enhanced oil recovery (MEOR) and in recovering environments impacted by the petroleum activity. The principal aim of this study consisted of the conformation of a bank of bacterial cultures that could be used in treatments of bioremediation. There were analyzed three samples from soils. There were isolated and purified 40 forming colonies unities (FCU) of every source, which were characterized phenotípically and in which their enzymatical activity was identified before a series of biochemical tests, in order to determine their capacity to degrade complex substrates and to produce tense-actives metabolites. The statistical processing of these results allowed the identification of the different functional groups and of functional identity for every residue, as well as for all the residues as a whole.

Keywords: microorganisms, functional groups, bioremediation, degradative potential, biosurfactants, oil spills

1. Introducción

La industria del petróleo constituye una de las empresas más importantes del mundo y es la principal fuente de ingresos para Venezuela. No obstante las conocidas bondades de esta industria, la extracción, transporte y procesamiento del crudo, conllevan procedimientos y en muchos casos, accidentes, generadores de grandes volúmenes de desechos como ripsos, lodos petrolizados, aguas de formación, petróleo crudo y suelos y acuíferos contaminados con petróleo y sus derivados, cuyos constituyentes son difíciles de degradar de manera natural debido a la complejidad de su estructura. Esta situación, debido a la acumulación de desechos y alteración de la biodiversidad de los ecosistemas, ha causado daños ecológicos de gran importancia en el mundo, por lo que la recuperación de terrenos y aguas contaminadas no sólo con hidrocarburos, sino también con otros productos, se ha convertido en una importante industria en todo el mundo

[1,2], incluyendo a Venezuela. Afortunadamente, se ha encontrado que en sustratos con historia de contaminación por hidrocarburos y por otras sustancias orgánicas, ciertos microorganismos (bacterias, levaduras, algas y hongos) desarrollan la capacidad de subsistir en estos medios, utilizando el contaminante como fuente de energía para la formación de material celular y realización de sus funciones metabólicas, convirtiéndolos en sustancias más simples. Evidentemente, el estudio de estas especies es de gran importancia científica por su potencial aplicabilidad en procesos biotecnológicos, como la degradación de sustancias xenobióticas, para el saneamiento de ambientes impactados por hidrocarburos u otros compuestos contaminantes. El fundamento de estas técnicas está basado en que muchos de los compuestos xenobióticos son semejantes a los naturales y, por tanto, factibles de degradación o inertización.

2. Procedimiento Experimental

Se tomaron muestras compuestas de tres residuos (sin tratar) de la actividad petrolera provenientes del oriente del

* Autor para correspondencia

Correo-e: rwindevo@uc.edu.ve (Reyna Windevoxlhel)

país (Centro de Acopio de Residuos de PDVSA). Las mismas fueron colectadas y transportadas al laboratorio en frascos de vidrio estériles colocados en bolsas de polietileno negro. Se resuspendieron dos muestras de cada residuo en un medio nutritivo con trazas de agente antifúngico y las mezclas se incubaron durante 24 horas a 37° C. Se determinó la densidad bacteriana (número de células viables por unidad de masa de suelo) mediante técnicas estándar de recuento en placa. Se realizaron diluciones seriadas (por duplicado), para luego sembrar por inclusión en Agar Plate Count (Difco). Se incubó por 24 horas a 37° C. Para el aislamiento de las colonias bacterianas el repique de las mismas se realizó al azar y por duplicado. Cada cepa se purificó varias veces mediante la técnica de repiques sucesivos, hasta obtener cepas aisladas. Una vez purificadas, se sembraron para su activación y mantenimiento. Se realizó una caracterización preliminar en términos de morfología considerando: forma, cromogénesis, opacidad, elevación, superficie, borde, consistencia y olor [3]. Transcurridas 24 horas desde la inoculación, se procedió a realizar el estudio de la micromorfología mediante el método de tinción Gram [4], con el fin de identificar la forma celular y composición de la pared celular. Una vez purificadas, las cepas fueron activadas para la aplicación de pruebas bioquímicas de actividad enzimática, las cuales permitirían conocer su capacidad para utilizar ciertos sustratos y potencial para producir surfactantes [5,6,7,8]

- Actividad lipolítica
- Actividad proteolítica
- Actividad ureásica
- Actividad β -hemolítica
- Utilización de Acetato
- Actividad hidrocarburoclástica

3. Resultados

Se obtuvieron los títulos indicados en la Tabla 1. Se encontró una gran diversidad macromorfológica, mientras que la micromorfología observada se presenta en la Tabla 2. Los resultados obtenidos para la actividad enzimática estudiada se presentan en las Figuras 1 y 2.

Tabla 1: Densidad bacteriana

Residuo	DENSIDAD BACTERIANA (UCF/mg muestra)
RD	6,3E06
RT	2,5E06
AP	3,4E06

Estos resultados fueron procesados -para cada residuo- mediante un método estadístico de agrupamiento (Análisis de Cluster, programa MVSP Multi-Variate Statistical Package 3.12d). Los dendogramas resultantes se observan en las figuras 3, 4 y 5. Puede apreciarse la conformación de 24 grupos funcionales de bacterias, entre ellos, cuatro grupos de

Tabla 2: Micromorfología de las colonias aisladas

Residuo	Cocos %		Bastones %	
	Gram +	Gram -	Gram +	Gram -
RD	16,7	0	0	83,3
RT	13,3	13,3	33,3	40,0
AP	16,7	10,0	3,33	70,0

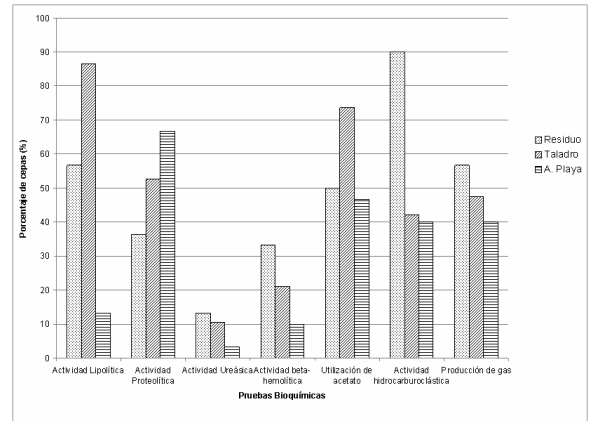


Figura 1: Actividad bioquímica para las cepas de cada residuo

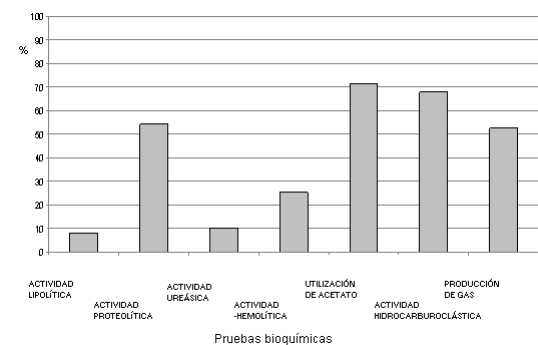


Figura 2: Actividad bioquímica para el conjunto de cepas aisladas

identidad funcional [9], para el residuo SD; 21 grupos funcionales de bacterias con seis grupos de identidad funcional en el residuo ST, y 19 grupos funcionales de bacterias con siete grupos de identidad funcional para el residuo AP. El análisis conjunto de todas las cepas estudiadas arrojó el dendograma que se presenta en la figura 6, en el cual se observa la conformación de 46 grupos funcionales de bacterias con 24 grupos de identidad funcional, uno de los cuales, agrupa tres cepas (RT13, RT29 y ET15) que presentaron respuesta positiva a todas las actividades estudiadas. El índice de diversidad funcional (ob. cit.) del conjunto es de 76,7.

Agradecimientos

Al Laboratorio de Investigación y Tecnología en Suelo y Ambiente (LITSA) de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Carabobo y al Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad Central de Venezuela por la colaboración prestada para la realización de los ensayos y análisis.

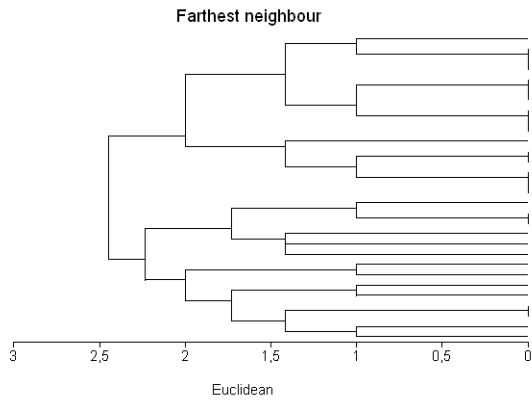


Figura 3: Análisis multivariable de la funcionalidad de las cepas aisladas de la arena de playa contaminada

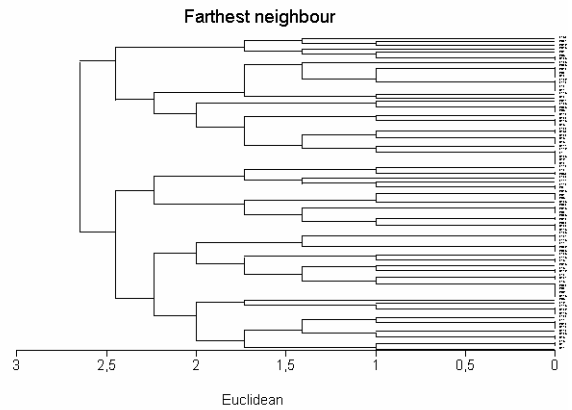


Figura 6: Análisis multivariable de la funcionalidad de las cepas aisladas del residuo de taladro

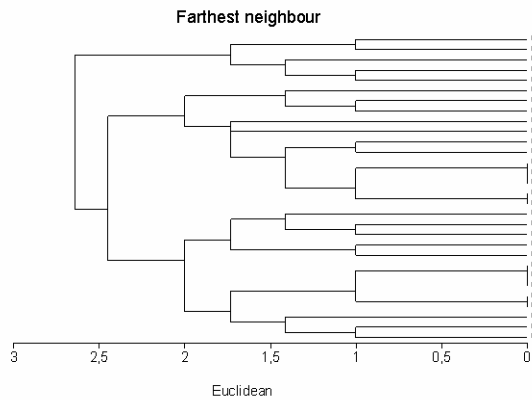


Figura 4: Análisis multivariable de la funcionalidad de las cepas aisladas del suelo de un derrame de crudo

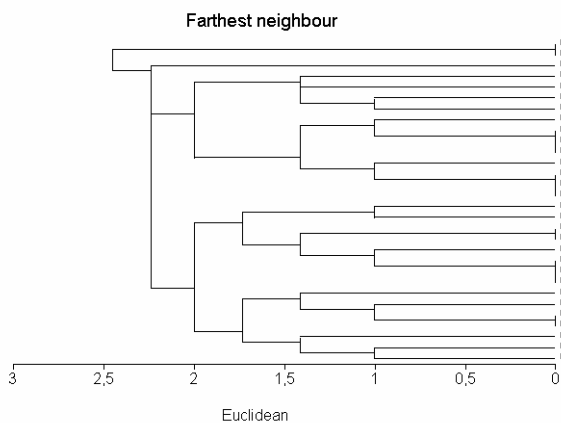


Figura 5: Análisis multivariable de la funcionalidad de las cepas aisladas del residuo de taladro

4. Conclusiones

Se logró el estudio de 90 colonias bacterianas procedentes de residuos de la industria petrolera, en las cuales se detectó actividad lipolítica en un 50,8 %, ureásica en un 10,2 %, proteolítica en un 54,2 %, β -hemolítica en un 25,4 %, hidro-

carburoclástica en un 67,8 %, y utilizadora de acetato en un 71,2 %. La presencia de estas capacidades enzimáticas en las colonias aisladas es indicativa de su potencial biotecnológico en ciertas aplicaciones por lo cual serán utilizadas para la realización de trabajos de investigación en el área de técnicas de biorremediación para el saneamiento de suelos, y de producción y efectividad de la utilización de biosurfactantes en la biorremediación asistida y en la reducción de la viscosidad de crudos. Se encontraron tres colonias que presentan todas las características estudiadas. Se recomienda extender el espectro de actividades enzimáticas estudiadas para un conocimiento más amplio del potencial de estas cepas para su uso en procesos biotecnológicos.

Referencias

- [1] LEVIN, M y GEALT, M. «Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos: Selección, estimación, modificación de microorganismos y aplicaciones». Editorial McGraw-Hill. Madrid, 1.997.
- [2] EWEIS, J., ERGAS, S., CHANG, D., SCHOEDER, E.: «Principios de Biorrecuperación». Mc Graw Hill. Madrid, 1.999.
- [3] HARRIGAN W. Y MC CANCE, M.: «Métodos de Laboratorio en Microbiología». Editorial Americana. León, 1.968.
- [4] BBL: «Manual de Procedimientos de Laboratorio y de Productos». Editores Asociados. México, 1.974.
- [5] BASTARDO, H., VIERMA, L. y ESTEVEZ, A.: «Microbial Characteristics and Metabolic Activity of Bacteria from Venezuelan Oil Wells». Developments in Petroleum Science. VOL 39, 307-318 pp., 1.993.
- [6] BASTARDO, H. Y RANGEL, O. «Production of Biosurfactants from Heavy Crude Oil Deposited in Oil Pits». Proceeding of III International Congress. Energy, Environment and Technological Innovation. 2:3-10., 1.995.
- [7] BASTARDO, H. HERNANDEZ, A. MALAVER, N. y RAMOS, J. «Importancia del Uso de Microorganismos en la Recuperación Mejorada de Crudos y en Saneamiento Ambiental». Visión Tecnológica. INTEVEP., 1.998.
- [8] HERNÁNDEZ, A. «Caracterización Química de Biosurfactantes». 1-10 pp. Trabajo no publicado. Universidad Central de Venezuela. Caracas, 2.003.
- [9] MALAVER, N. (1.996) «Aspectos ecológicos de la asociación microorganismos-raíz en Eichhornia crassipes (Mart.) Solm-Laub (Pontederiaceae) expuestas a un efluente modificado». Tesis Doctoral. Postgrado de Ecología. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela.