

Aislamiento y caracterización de bacterias hidrocarburohíticas degradadoras de gasolina y diésel

MARTÍNEZ, José*†, JÍMENEZ, Mariana, SOTO, Diana, LOMAS, Marcos y SÁNCHEZ, Salvador

Universidad Iberoamericana Torreón, Calzada Iberoamericana 2255, Torreón, Coahuila, México. 27020.

Recibido 2 de Enero, 2015; Aceptado 26 de Marzo, 2015

Resumen

En este estudio hemos investigado la capacidad de algunos microorganismos, aislados de suelos en diferentes sitios contaminados en la ciudad de Torreón Coahuila, para degradar una mezcla de hidrocarburos presentes en la gasolina y diésel. Se seleccionaron 7 cepas aisladas y cultivadas en medio mínimo de sales (MMS). Como única fuente de carbono y energía se adiciono el 1% de diésel o gasolina. Las cepas mostraron crecimiento durante las cinéticas a pH 7, resaltando los aislados nombrados como DF1 y DF2 que tuvieron las más altas tasas de crecimiento con los 3 sustratos (Diésel, gasolina de 87 y 92 octanos respectivamente). Estas cepas tienen la capacidad metabólica de producir complejos enzimáticos para que el sustrato orgánico (hidrocarburo) sea el donador de electrones, y generar su fuente de energía. Así podemos seguir asumiendo que la remediación de hidrocarburos es un proceso de descontaminación biológico de suma importancia, eficaz y no invasivo.

Diésel, gasolina, biorremedación, cinéticas de crecimiento y degradación.

Abstract

In this study we investigated the ability of some microorganisms isolated from contaminated soils at different sites in the city of Torreón Coahuila, to degrade a mixture of hydrocarbons in gasoline and diesel. 7 strains isolated and grown in minimal salts medium (MMS) were selected. As the sole source of carbon and energy was added 1% of diesel or gasoline. The strains showed growth during the kinetics at pH 7, highlighting the isolated appointed as DF1 and DF2 that had the highest growth rates with the 3 substrates (diesel, gasoline octane 87 and 92 respectively). These strains have the metabolic capacity to produce enzymatic complexes for organic substrates (hydrocarbon) and use them as electron donor, and generate its power source. So we continue to assume that the remediation of hydrocarbons is a process of critical biological decontamination, effective and non-invasive.

Diesel, gasoline, bioremediation, growth kinetics and degradation.

Citación: MARTÍNEZ, José, JÍMENEZ, Mariana, SOTO, Diana, LOMAS, Marcos y SÁNCHEZ, Salvador. Aislamiento y caracterización de bacterias hidrocarburohíticas degradadoras de gasolina y diésel. Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias 2015, 2-2:155-161

* Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: jose.martinez@iberotorreon.edu.mx)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

Introducción

En México, la industria del petróleo ha tenido un impacto ambiental negativo. Apenas hace pocos años se le ha dado importancia a esta problemática, ya que no se conocía el grado de dificultad y el costo que representa la remediación de los suelos y cuerpos de agua. Los residuos oleosos producidos por la industria petrolera continúan siendo un problema tanto económico como ambiental respecto a su tratamiento y disposición final. Los hidrocarburos han sido aprovechados benéficamente por los humanos como fuente de energía y materia prima para el transporte, industrias químicas, farmacéuticas, y la manufactura de plásticos y otros materiales. Son la principal fuente de energía en la historia de la humanidad, alimenta un porcentaje muy alto en este rubro, entre el 32% de Europa y Asia, el 40% de Norteamérica, hasta el 53% de Oriente Medio (Vasallo y Herrera, 2002). Se estima que en 2013, se tuvo un aumento en el suministro y consumo de petróleo y sus derivados a nivel mundial. En donde, México destaca como uno de los principales productores, impactando gravemente al ambiente, economía y recursos naturales (Yorder, 2014).

Sin embargo, si los hidrocarburos llegan a contaminar el suelo y agua pueden presentar actividad carcinogénica en perjuicio del hombre y los animales. De tal manera, que la presencia de estas sustancias químicas en agua subterránea es un enorme peligro para el consumo humano. Son estas zonas afectadas por hidrocarburos, los que deben ser recuperados eliminando la mayor cantidad posible del contaminante. De no llevarse a cabo una solución rápida puede ocasionar serios problemas de salud como; mutaciones genéticas, tumores malignos y malformaciones en embriones y fetos (Vives et al., 2001).

Para la limpieza de sitios contaminados con hidrocarburos, se han aplicado diversos tratamientos fisicoquímicos y de biorremediación. Las técnicas de biorremediación son rentables, benéficas para el ambiente, y pueden llegar a degradar completamente el contaminante.

La utilización de bacterias con capacidad hidrocarburofítica es ampliamente usada en este proceso. Los microorganismos hidrocarburofíticos emplean varias rutas metabólicas para la transformación total de las moléculas orgánicas en CO₂, H₂O, y algunos residuos inorgánicos inertes. Mediante estas rutas de degradación, el contaminante orgánico funciona como donador de electrones, de modo que la actividad metabólica de la célula acaba degradando y consumiendo dicha sustancia necesaria para la biosíntesis celular o biomasa microbiana (Fuentes et al., 2014).

En este estudio, se evaluó las capacidades biodegradativas de siete cepas aisladas resultantes de enriquecimientos en distintas fuentes de carbono. Se intentó confirmar si los distintos hidrocarburos utilizados implicaban comportamientos metabólicamente distintos. El estudio se divide en cuatro fases. El presente trabajo muestra los resultados obtenidos de la primera fase: que incluye el muestreo, aislamiento, análisis bioquímico y efecto del hidrocarburo en el crecimiento bacteriano.

Metodología a desarrollar

Muestreo

Se recolectaron 10g de suelo de distintos sitios que presentaban contaminación por hidrocarburos de la ciudad de Torreón, Coahuila. Las muestras fueron tomadas en condiciones asépticas y se guardaron en bolsas de polietileno estéril, fueron trasladadas al laboratorio y almacenadas a 4°C hasta su uso.

Aislamiento

Las bacterias fueron aisladas de las muestras de suelo utilizando la técnica de diluciones seriadas y Agar Luria Bertani (LB), enriquecido con gasolina de 92 octanos (GP), gasolina de 87 octanos (GM) y diésel (DS) comerciales. Cada uno de ellos se agregó separadamente a una concentración del 1% al de cultivo. Los hidrocarburos antes mencionados fueron añadidos después de esterilizar el medio en una autoclave a 121°C o 15 Lbs de presión por 15 minutos. Se añadió 1.0 mL de cada dilución y se transfirió placas con LB. Se utilizó la técnica spread con un asa de drigalsky. A continuación, se incubaron por 24 horas a 37°C (Hemalatha y Veeramanikandan, 2011).

Posteriormente, las colonias viables se pasaron a un medio mínimo de sales (MMS) (0.4% NH₄NO₃, 0.47% KH₂PO₄, 0.0119% Na₂HPO₄, 0.001% CaCl₂•2H₂O, 0.1% MgSO₄•7H₂O, 0.001% MnSO₄•4H₂O, y 0.0015% FeSO₄•4H₂O, pH 7.0.), al cual, se le agregó individualmente los diferentes hidrocarburos como única fuente de carbono al 1%. Este procedimiento se repitió hasta tener colonias aisladas (Wongsa et al., 2004).

Análisis bioquímico de cepas aisladas

Las bacterias aisladas fueron identificadas física y bioquímicamente de acuerdo al manual de bacteriología de Bergey's (Holt, 1994).

La actividad de la catalasa fue determinada por el desprendimiento de burbujas después de añadir una gota peróxido de hidrogeno al 30% sobre una muestra de nuestra colonia aislada. Para determinar la presencia del citocromo C se realizó la prueba de la oxidasa, añadiendo sobre un papel filtro una gota del reactivo de oxidasa, inmediatamente se añadió masa bacteriana para detectar una coloración azul-violeta (Al-Thani et al., 2009).

Para determinar la motilidad y la presencia de indol se utilizó el medio de cultivo SIM. Se realizó la prueba de la producción de H₂S con el medio de cultivo Triple Sugar Iron (TSI), al igual con éste se determinó si la bacteria fermenta azúcares. De igual forma, se hizo el ensayo para identificar si la bacteria tiene la capacidad de usar citrato como única fuente de carbono y energía, con el medio de cultivo Simmons Citrato Agar. Finalmente, se realizó las pruebas rojo de metilo y Voges Proskauer (VP).

Efecto del hidrocarburo en el crecimiento bacteriano

Se prepararon reactores de tipo Batch con MMS enriquecido con GP, GM y DS como única fuente de carbono al 1%. Se inocularon los reactores para obtener finalmente un volumen de 50 mL a una concentración final del 5% con bacterias ajustadas. Se incubaron por 12 horas a 37°C.

Una vez transcurrido este tiempo, se hicieron lecturas de OD a una longitud de 600 nm en un espectrofotómetro (Vela Quin VE-5100 UV) cada dos horas por un periodo de tres días. La prueba se hizo por triplicado (Sutiknowati, 2007).

Parámetros óptimos de crecimiento

A continuación, se procedió a obtener los parámetros óptimos de crecimientos de las cepas aisladas con cada uno de los hidrocarburos. Las bacterias se inocularon en MMS a un pH 7 enriquecido con GP al 1%. Se incubaron por 12 horas a 37°C. Se tomó 1 mL de muestra para medir OD (600 nm) (Hemalatha y Veeramanikandan, 2011) y proteína extracelular de acuerdo al método de Bradford (Bradford, 1976).

Este procedimiento se realizó por triplicado cada dos horas por dos días. Cabe mencionar que para este proceso solo se realizó la cinética con gasolina de 92 octanos.

Resultados y Discusión

Muestreo y aislamiento

En el presente estudio, siete cepas fueron aisladas de diferentes sitios contaminados por diésel y gasolina en la ciudad de Torreón, Coahuila. Estas cepas fueron las que mejor se adaptaron a un medio MMS con el hidrocarburo como única fuente de carbono (Figura 1).

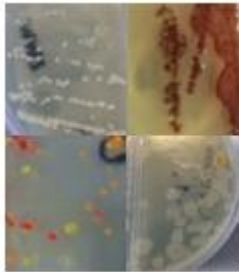


Figura 1 Cepas aisladas de suelo contaminado con diésel.

Análisis bioquímico de cepas aisladas

A las cepas aisladas se le realizó la caracterización bioquímica de acuerdo al manual de Bergey's. Como se muestra en la tabla 1, predomina en un 57 % las bacterias tipo Gram negativo; en comparación, con el 43% de Gram positivas. En su mayoría se aislaron bacterias de tipo bacilo (72%) y solo un 28% de cocos.

Efecto del hidrocarburo en el crecimiento bacteriano

Por otra parte, se determinó la capacidad degradativa de las cepas aisladas con los tres hidrocarburos en estudio.

Los resultados se presentan en la tabla 2. En ellos se demuestran que se tiene una mayor facilidad para metabolizar diésel en comparación con la gasolina de 87 y 92 octanos. Los microorganismos tolerantes a este ambiente de estrés (al estar en contacto con el hidrocarburo) desarrollan y utilizan respuestas enzimáticas y fisiológicas especializadas para la degradación del hidrocarburo (Rivera-Cruz et al., 2002).

Pruebas Bioquímicas	Bacterias aisladas							
	MM1	MM2	MM3	DF1	DF2	CD1	CD2	
Morfología	Circular, plana, elástica y rojiza	Circular, elevada elástica y cremosa	Irregular, plana, elástica y roja	Irregular, plana, rígida y transparente	Irregular, elevado, elástica y transparente	Irregular, elevado, elástica y cremosa	Circular, convexo elástica y rojiza	
Gram	-	-	-	+	-	+	+	
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	
Lactosa	-	-	-	+	-	-	-	
Citrato	+	+	+	-	+	+	+	
Catalasa	+	+	+	+	+	-	-	
Oxidasa	+	+	-	+	+	-	-	
Indol	-	-	+	+	+	-	-	
Motilidad	+	-	+	-	+	-	+	
Rojo metilo	-	-	-	-	-	-	-	
VP	-	-	-	-	-	-	-	
Urea	-	-	-	-	-	-	-	
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	

Tabla 1. Caracterización bioquímica de bacterias aisladas de suelos contaminados con diésel y gasolina en la ciudad de Torreón, Coahuila.

Tabla 1 Caracterización bioquímica de bacterias aisladas de suelos contaminados con diésel y gasolina en la ciudad de Torreón, Coahuila.

Tanti y colaboradores en el 2012, demostraron que bacilos gram negativos, tienen la habilidad de oxidar los hidrocarburos mediante complejos enzimáticos. Estas bacterias, descomponen los hidrocarburos a estructuras más sencillas mediante un proceso llamado mineralización. Utilizan enzimas de tipo oxigenasa. Lo que nos da una idea de que las bacterias aisladas tienen la capacidad de producir enzimas catabólicas para utilizar los diferentes hidrocarburos como fuente de carbono.

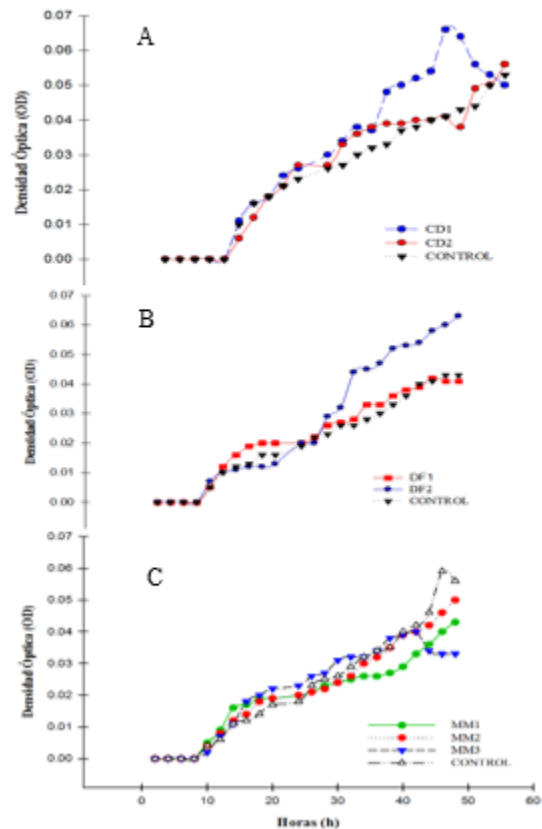
Cepa aislada	Densidad Óptica (600 nm)		
	Diésel	Gasolina 92 octanos	Gasolina 87 octanos
MM1	0.050	0.053	0.055
MM2	0.075	0.073	0.058
MM3	0.088	0.056	0.049
DF1	0.154	0.060	0.206
DF2	0.132	0.067	0.154
CD1	0.129	0.054	-
CD2	0.123	0.059	0.162

Tabla 2 Efecto del hidrocarburo en el crecimiento bacteriano.

Parámetros óptimos de crecimiento

Finalmente, se llevó a cabo una cinética de crecimiento por 48 horas usando gasolina de mayor octanaje como fuente única de carbono (Gráfica 1). Las cepas CD1 y DF1, fueron las que mejor se adaptaron al medio mostrando un mayor crecimiento. En contraste, MM1 es la que desarrolla menor actividad. La cinética muestra una tendencia en la degradación de GP con el paso de las horas.

No solamente el hidrocarburo es importante en un proceso de biorremediación, la temperatura y pH son fundamentales. Debido a que ambos factores juegan un papel crítico en dicho metabolismo. Estos elementos dan estabilidad fisicoquímica a la célula para una mayor degradación del hidrocarburo. A una temperatura igual o mayor a los 37°C y pH entre 6 y 8, permite una mayor solubilidad de los hidrocarburos lo que ayuda al proceso de biorremediación (Hemalatha y Veeramanikandan 2011).



Gráfica 1 Cinéticas de crecimiento de 48 h en gasolina de 92 octanos a 37 °C y pH 7. a) Bacterias aisladas de gasolinera, b) bacterias aisladas de taller mecánico y c) bacterias aisladas de suelo contaminado con diésel.

Es importante mencionar que las cinéticas son para determinar los parámetros óptimos de crecimiento de las bacterias aisladas. En este caso solo se presenta la cinética a pH 7 con gasolina de 92 octanos.

Agradecimientos

Algunos reactivos, para la realización de este trabajo, fueron financiados por el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Gómez Palacio, Durango.

Conclusiones

Solo siete cepas fueron las que tuvieron la habilidad para crecer en presencia de hidrocarburos de un total de 12; de las cuales, el mayor porcentaje fue bacilos Gram negativos.

Las bacterias aisladas presentan mayor capacidad para metabolizar diésel como fuente de carbono. La gasolina de mayor octanaje, presentó la menor tasa de crecimiento para las siete cepas. Las cepas marcadas como DF1 y DF2 presentan la mayor tasa de crecimiento en los tres sustratos.

Perspectivas Futuras

Después de determinar los parámetros óptimos de crecimiento, se identificará genéticamente a las cepas aisladas. Así mismo, se cuantificará la degradación de hidrocarburos por cromatografía de gases y diferenciarán proteínas extracelulares por medio de electroforesis en 2D.

Referencias

Al-Thani, R. F., Abd-El-Haleem, D. A., and Al-Shammri, M. 2009. Isolation and characterization of polyaromatic hydrocarbons-degrading bacteria from different Qatari soils. *African Journal of Microbiology Research*, 3(11), 761-766.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1), 248-254.

Fuentes, S., Méndez, V., Aguila, P., and Seeger, M. 2014. Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(11), 4781-4794.

Hemalatha, S., and Veeramanikandan, P. 2011. Characterization of aromatic hydrocarbon degrading bacteria from petroleum contaminated sites. *Journal of Environmental Protection*, 2, 243-254.

Holt, J. G. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th Edit. Williams and Wilkins, Philadelphia.

Prathiba, G., Deshpande, A., and Bhattacharya, S. 2014. Molecular identification of the isolated diesel degrading bacteria and optimization studies. *Journal of Biochemical Technology*, 5(3), 727-730.

Rivera-Cruz, M. D. C., y Ferrera-Cerrato, R. V. Volke H., R. Rodríguez V., y L. Fernández L. 2002 b. Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo. *Terra*, 20, 423-434.

Sutiknowati, L. I. 2007. Hydrocarbon degrading bacteria: isolation and identification. *Makara Sains*, 11(2), 98-103.

Tanti, B., Ray, S. K., and Buragohain, A. K. (2012). Differentiation of petroleum hydrocarbon-degrading *Pseudomonas* spp. based on PCR-RFLP of the 16S-23S rDNA intergenic spacer region. *Folia microbiologica*, 57(1), 47-52.

Vasallo, J., y Herrera, D. 2002. Seminario de hidrocarburos. Escuela Superior de Salud y Ambiente. Universidad Nacional del Comahue. Neuquén. Argentina.

Vives, I., Grimalt, J. O., and Guitart, R. 2001. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos y la salud humana. *Apuntes de Ciencia y Tecnología*, 3, 45-51.

Yorder, Y. 2014. Oil Prices Rise as World Walks Supply-Demand Tightrope. Pipeline & Gas Journal. 241(8), 28-36.

Wongsa, P., Tanaka, M., Ueno, A., Hasanuzzaman, M., Yumoto, I., and Okuyama, H. 2004. Isolation and characterization of novel strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* possessing high efficiency to degrade gasoline, kerosene, diesel oil, and lubricating oil. Current microbiology, 49(6), 415-422.