

Caracterización de la comunidad bacteriana de un Ripo de perforación y aislamiento de un consorcio bacteriano con capacidad hidrocarburoclástica

Reyna Windevoxhel^{1*,a}, Nora Malaver^b, Héctor Bastardo^b, Neudis Subero^a, Nereida Sánchez^a, Lily Marciano^a

^aLaboratorio de Investigación y Tecnología de Suelo y Ambiente LITSA, Facultad de Ingeniería, Universidad de Carabobo
Valencia, Edo. Carabobo, Venezuela

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

Resumen.-

La utilización de microorganismos es de gran importancia en áreas como la producción de alimentos, la medicina y la agricultura. En el área ambiental, la biorremediación es el método más recomendado en la recuperación de suelos impactados con hidrocarburos del petróleo, por su efectividad, amigabilidad con el ambiente y bajo costo relativo. También es de interés para la industria petrolera la potencial utilidad de ciertos microorganismos en la recuperación mejorada de crudos, gracias a la síntesis de biosurfactantes, que además poseen aplicación en el área médica, de alimentos, de limpieza, de construcción y la ambiental, entre otras. Se aislaron colonias bacterianas de un ripo de perforación base aceite, se caracterizaron micro y macromorfológicamente y se estudiaron distintas repuestas enzimáticas. Se encontraron colonias con actividad hidrocarburoclástica, lipolítica, *beta*-hemolítica, ureásica, proteolítica y productora de gas, y ausencia de colonias sulfato-reductoras. Se conformó un cultivo degradador y se sometió a una prueba de eficiencia en la degradación de gasoil rango *diesel*. Se cuantificaron los heterótrofos mesófilos y la concentración de aceites y grasas, la cual se redujo en un 73,7 % en 20 días, con lo que el consorcio bacteriano demostró tener potencial para la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos.

Palabras clave: Microorganismos, biorremediación, hidrocarburos, aceites y grasas

Bacterial Colonie Characterization from a Perforation Waste and Isolation from a Bacterial Consortium with Hydrocarbonclastyc Capacity

Abstract.-

Microorganisms performance is of great importance in areas as the production of food, the medicine and the agriculture. In environmental area, bioremediation method is the most recommended in the recovery of soils impressed with petroleum hydrocarbons, due to its efficiency and relative low cost. Also the potential utility of certain microorganisms is of interest for the petroleum industry to better recovery of perforation waste, thanks to the synthesis of biosurfactantes that in addition possess application in areas as medicine, food, cleanliness, construction and the environmental one, among others. Bacterial colonies were isolated from a base oil perforation waste and characterized micro-macromorphologicall. Different enzymatical responses were studied. Colonies with hydrocarbonclastyc, lipolytic, *beta*-hemolytic, ureasic, and proteolytic activity and producing of gas were found, but no colonies sulfate - reducers. A degradator culture was conformed and submit to test of efficiency in the degradation of gasoil diesel. Aerobic mesophyles were quantified and to the concentration oil and grease diminished in 73,7 % in 20 days. Bacterial consortium demonstrated to have potential for the recovery of soils contaminated with hydrocarbons of the oil.

Keywords: Microorganisms, bioremediation, hydrocarbons, oil and grease

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 sus conocidas bondades, los distintos procesos asociados a la misma

frecuentemente generan grandes volúmenes de desechos como rípios de perforación, lodos petrolizados, aguas de formación, 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 a la alteración de la biodiversidad de los ecosistemas, ha causado daños ecológicos de gran importancia en el mundo, por lo que la recu-

* Autor para correspondencia

Correo-e: rwindevo@uc.edu.ve (Reyna Windevoxhel1)

peración de terrenos y aguas contaminadas con hidrocarburos, 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, algunos microorganismos desarrollan la capacidad de subsistir en estos medios, metabolizando el contaminante y convirtiéndolo en sustancias más simples, lo cual imprime al estudio de estas especies microbianas una gran importancia científica por su potencial aplicabilidad en procesos de descontaminación amigables con el ambiente. El interés no se limita sólo a su capacidad degradadora, también resulta de gran importancia el estudio de capacidades bioquímicas de los microorganismos como son la producción de enzimas, gases, ácidos y metabolitos tensioactivos, debido al amplio espectro de usos que tienen en distintas áreas de la biotecnología, como la recuperación de menas, biorremediación asistida, formulación de detergentes, recuperación mejorada de crudos y otros.

2. Metodología

2.1. Recolección de muestras, aislamiento y purificación de colonias

La muestra de desecho se extrajo de una fosa de residuos de un campo inhabilitado de extracción de petróleo, en el estado Monagas. Se colectó y transportó a temperatura ambiente en frascos de vidrio estériles. Inicialmente se realizó la activación de la comunidad bacteriana presente en el desecho, para lo cual se suspendió una muestra del sólido en caldo nutritivo a temperatura ambiente. Una vez detectado el crecimiento bacteriano se realizaron diluciones seriadas de alícuotas del sobrenadante y se sembraron en agar para el conteo de heterótrofos mesófilos siguiendo técnicas estándar de recuento en placas [3,4]. Se aislaron para su purificación 20 colonias bacterianas. El repique de las colonias se realizó al azar, tomando como referencia una tabla de números aleatorios [5,6] y por duplicado. Cada cepa se purificó varias veces mediante la técnica de repiques sucesivos [7], hasta obtener cepas aisladas, las cuales se sembraron en agar nutritivo inclinado [8,9] para su mantenimiento -a temperatura ambiente- y posterior reactivación.

2.2. Caracterización micro y macromorfológica de colonias

Se realizó una caracterización preliminar de las colonias en términos de macromorfolología considerando

metodologías sugeridas en la bibliografía del área [8, 10], que implican el reconocimiento de la forma, cromogénesis, opacidad, elevación, superficie, borde, consistencia y olor. Se procedió a realizar el estudio de la micromorfolología mediante el método de tinción Gram [7], con el fin de identificar la forma celular (cocos, bastones y espirales) y la composición de la pared celular (Gram positiva y Gram negativa).

2.3. Caracterización funcional de colonias

Una vez purificadas, las cepas fueron activadas para la aplicación de pruebas bioquímicas que permitieran conocer su capacidad para reducir sulfatos, producir gas, y degradar y metabolizar ciertos sustratos complejos, indicativa de su potencial en la aplicación de procesos biotecnológicos de remediación y recuperación terciaria de petróleo (MEOR, por sus siglas en inglés) [6, 11], entre otros. Se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas:

ACTIVIDAD LIPOLÍTICA: Detecta la capacidad de los microorganismos de degradar ciertos compuestos lipídicos, lo cual puede ser utilizado como indicativo del potencial para degradar aceites y grasas presentes en los hidrocarburos de petróleo.

ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA: Indica la capacidad del organismo de producir enzimas que fraccionan proteínas, las cuales, debido a su gran tamaño original, presentan una gran dificultad para su absorción por parte del microorganismo. Esta capacidad permite inferir una potencial habilidad para fragmentar otros compuestos de gran tamaño, y facilitar su absorción y posterior degradación.

ACTIVIDAD UREÁSICA: Permite conocer la habilidad de los microorganismos de producir la enzima ureasa, relacionada con la descomposición de compuestos orgánicos, por atacar los puentes C-N, los cuales se pueden encontrar presentes en distintos componentes complejos del petróleo y otros compuestos tóxicos como plaguicidas.

ACTIVIDAD SULFATO-REDUCTORA: Se ha encontrado que las bacterias sulfato-reductoras están involucradas en la oxidación de hidrocarburos [12, 13], y ha sido comprobada su efectividad en procesos de biorremediación en la contaminación con metales pesados al causar la precipitación de metales a partir de soluciones [14].

POTENCIAL PARA PRODUCIR COMPUESTOS TENSO-ACTIVOS: Existe una fuerte evidencia que asocia la actividad β -hemolítica y la degradación de acetato [6, 15, 16] a la capacidad de producir surfactantes, compuestos de gran interés en la MEOR por reducir la viscosidad de los

crudos facilitando su extracción, en la biorremediación asistida, al emulsificar la fase oleosa y la acuosa, y en otros campos, en todos los casos, por su biodegradabilidad.

ACTIVIDAD HIDROCARBUROCLÁSTICA: El crecimiento de bacterias en un medio cuya única fuente de carbono es el gasoil, es indicativo del potencial de las mismas de degradar hidrocarburos del petróleo [11, 17].

PRODUCCIÓN DE GAS: Las bacterias aerógenas son de interés en estudios en la MEOR, ya que pueden aumentar la presión en los pozos facilitando la extracción del crudo.

2.4. *Conformación de un cultivo bacteriano con capacidad hidrocarburoclástica*

Se prepararon cultivos con cada una de las colonias que presentaron actividad hidrocarburoclástica y luego de su incubación a temperatura ambiente se preparó un cultivo mixto en el que se inocularon 50 μ L de cada uno de estos pre-inóculos. La mezcla se incubó a temperatura ambiente hasta crecimiento.

2.5. *Ensayo de biodegradación*

El cultivo degradador fue sometido a un ensayo de biodegradación de hidrocarburos [18], con el fin de determinar la efectividad de la actividad degradadora. Para lograrlo se montaron por duplicado microcosmos con una mezcla constituida por 93 % de medio mínimo mineral libre de carbono [19, 20] contentivo de macronutrientes y elementos traza necesarios para el crecimiento bacteriano (constituyentes: MgSO_4 , CaCl_2 , FeCl_3 , KNO_3 , KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$). El resto de la composición de la mezcla: 2 % de gasoil como única fuente de carbono y 5 % del inóculo bacteriano [11]. El gasoil es un aceite intermedio procedente del proceso de refinación; utilizado como combustible en motores diesel, quemado en sistemas de calefacción central y como carga de alimentación para la industria química. Está compuesto por hidrocarburos con cadenas de 15 a 40 átomos de carbonos, básicamente saturados y aromáticos, que son las fracciones biodegradables de los crudos [2].

Se montaron simultáneamente dos controles (testigos): uno negativo, sin inocular, el cual sirve como referencia para detectar la posible remoción del sustrato por vías distintas a la biodegradación. El segundo, un control positivo, con sacarosa (sustrato de degradabilidad comprobada) en sustitución del gasoil, con la finalidad de verificar o descartar el efecto tóxico del gasoil sobre

el cultivo, esto es, si no se observa crecimiento en el ensayo con gasoil pero sí en el control, el fenómeno puede ser atribuido a la toxicidad del gasoil sobre las bacterias utilizadas, pero en caso de no haber crecimiento en el control ni en el ensayo, se debe presuponer como causa algún error en el montaje o el diseño del experimento.

Todos los microcosmos se incubaron obturados con tapones de gasa y algodón a temperatura ambiente durante 20 días, con agitación constante en una incubadora marca Gallenkamp modelo B1304 a 80 rpm, y a oscuras para evitar la ocurrencia de reacciones fotoquímicas. El experimento se montó por duplicado. Para el ensayo de biodegradación de gasoil se tomaron muestras –sin reposición– cada cinco días, y para los controles, únicamente los días cero y cinco. El crecimiento bacteriano fue evaluado mediante la determinación del título bacteriano (heterótrofos mesófilos) cada cinco días, empleando la técnica de recuento en placa [3,4]. La utilización de hidrocarburos por las bacterias se detectó a través de la determinación de la concentración de aceites y grasas en el sistema cada cinco días, según el Standard Method 5520– B [3], utilizando *n*-hexano como solvente. El porcentaje de remoción de hidrocarburos se calculó según la ecuación (1):

$$PdR(\%) = \frac{C_0 - C_F}{C_0} \cdot 100 \quad (1)$$

donde,

PdR = porcentaje de remoción,

C_0 = concentración inicial,

C_F = concentración final

3. Resultados y Discusión

El conteo bacteriano arrojó un título de $3,8 \cdot 10^7$ unidades formadoras de colonia (UFC) por mg de muestra, indicativo de una alta densidad bacteriana, considerando el origen y composición del material. De las 20 colonias aisladas inicialmente, dos no sobrevivieron al proceso de purificación, resultando un total de 18 colonias para su caracterización, las cuales fueron identificadas con un código alfanumérico para su diferenciación. Se observó una amplia diversidad macromorfológica, y el análisis micromorfológico arrojó como resultado que todas las cepas aisladas resultaron bastones (bacilos) grampositivos.

La actividad enzimática analizada a partir de la aplicación de las distintas pruebas bioquímicas (Figura 1). A partir de los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas se conformó un cultivo mixto con potencial

para la degradación de hidrocarburos, constituido por las ocho cepas que presentaron actividad hidrocarburoclástica positiva. Dado que el carbono es el principal nutriente para el crecimiento bacteriano, la presencia del gasoil como única fuente de carbono asegura que sólo los microorganismos con capacidad de asimilar el carbono presente en los hidrocarburos del gasoil serán capaces de crecer en este medio. Las ocho cepas degradadoras presentaron adicionalmente actividad β -hemolítica positiva en su totalidad, un 88 %, actividad proteolítica, 13 % actividad lipolítica, 25 % y actividad ureásica. La amplia diversidad funcional de las cepas que conforman el consorcio degradador es un aspecto a favor en los eventos de degradación de hidrocarburos ya que generalmente amplía el espectro de mecanismos de ataque del cultivo sobre el sustrato y sobre los metabolitos que pudieran generarse a partir de su utilización.

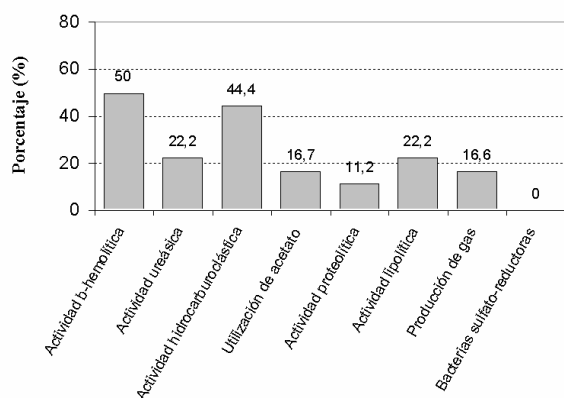


Figura 1: Actividad enzimática de las colonias aisladas

Como se muestra en la Figura 2, en el ensayo de biodegradación se encontró un significativo aumento de la densidad bacteriana, del orden de $10 \cdot 10^{11}$ UFC/mL, para el día del montaje del ensayo, a $10 \cdot 10^{21}$ UFC/mL durante los primeros 15 días, para luego decaer a los 20 días hasta $1,14 \cdot 10^9$ UFC/mL. Este crecimiento inicial es indicativo de una rápida adaptación de los microorganismos a la utilización del sustrato (gasoil), ya que por ser la única fuente de carbono en el medio, un crecimiento de la población bacteriana necesariamente implica la metabolización de los hidrocarburos presentes para aprovechar el imprescindible carbono. La caída del crecimiento posiblemente se deba a un descenso de la actividad metabólica a causa del agotamiento progresivo de la fuente de carbono, y/o de los nutrientes aportados por el medio mineral, ya que no hubo reposición de los mismos. Posiblemente en un tratamiento con reposición de nutrientes se hubiese lo-

grado una mayor degradación. También es probable que la acumulación de metabolitos tóxicos generados por la utilización del gasoil, en ausencia de microorganismos capaces de utilizarlos (poblaciones secundarias), interfiera en la degradación del sustrato en consideración.

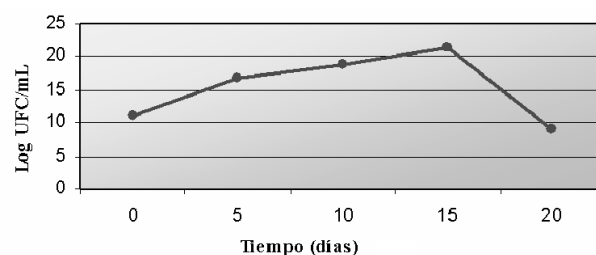


Figura 2: Curva de crecimiento bacteriano

El incremento en la densidad poblacional se considera una medida indirecta de la actividad metabólica de la población [21,22], lo cual se ve reflejado en los datos de degradación del gasoil, única fuente de carbono suministrada. En la Figura 3 se muestra que la concentración de aceites y grasas en los ensayos de biodegradación decreció continuamente, con una mayor tasa de disminución durante los primeros cinco días aproximadamente, esto, debido posiblemente, a que inicialmente los microorganismos degradan las fracciones menos complejas, y por ende, más fáciles de degradar, para posteriormente atacar las fracciones más recalcitrantes [1,2,11].

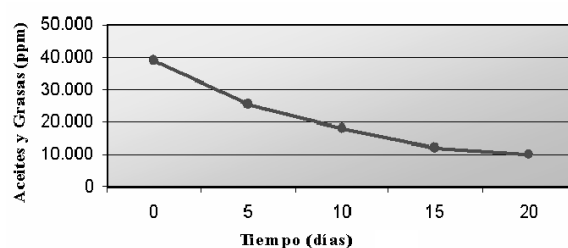


Figura 3: Concentración de aceites y grasas

El porcentaje de remoción total de aceites y grasas (Tabla 1) obtenido fue de un 73,7 % (promedio) en los ensayos de degradación, y de 2,4 % (promedio) en los controles, lo cual permite atribuir la remoción de los hidrocarburos al proceso de biodegradación llevado a cabo por el consorcio bacteriano, salvo una pequeña fracción que pudo haberse evaporado. Esta actividad también permite presumir un potencial para la utilización de otros hidrocarburos de petróleo, ya que los saturados y aromáticos, principales constituyentes

del gasoil, se encuentran presentes en todos los crudos, y en consecuencia, para el saneamiento de sitios contaminados por estos compuestos.

Tabla 1: Remoción de aceites y grasas

Cultivo	Tiempo (días)	porcentaje de remoción(%)
1	0	0
2	5	33.99
3	10	53.55
4	15	69.10
5	20	73.73
Control (-) ₁	20	0
Control (-) ₂	20	4.2

Agradecimientos

Al Laboratorio de Microbiología Ambiental y al Laboratorio de Plantas Acuáticas del Instituto de Zoología Tropical de la Universidad Central de Venezuela por la colaboración prestada para la realización de los ensayos y análisis. Al Proyecto ALMA MATER de la OPSU por el financiamiento.

4. Conclusiones

- El conteo bacteriano arrojó un título de $3,8 \cdot 10^7$ UFC/mg de muestra. Las cepas bacterianas presentan: actividad β -hemolítica: 50 %; actividad ureásica: 22,2 %; utilización de gasoil: 44,4 %, utilización de acetato: 16,7 %; actividad proteolítica: 11,2 %; actividad lipolítica: 22,2 %; producción de gas: 16,6 % y no se encontraron bacterias sulfato-reductoras.
- Se conformó un cultivo mixto de 8 cepas con actividad hidrocarburoclástica, las cuales además presentan actividad ureásica, lipolítica y proteolítica, producción de gas y potencial para la producción de surfactantes.
- El cultivo mixto fue capaz de utilizar el gasoil favorablemente como fuente de carbono y energía, con un crecimiento máximo a los 15 días del estudio, arrojando un nivel de degradación del gasoil del 73,7 % después de 20 días.
- El consorcio bacteriano presenta potencial para ser utilizado en procesos de biorremediación de sistemas impactados por hidrocarburos del petróleo.

Referencias

- [1] Levin, M. y Gealt, M.A. (1997) *Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos*. McGraw- Hill, Interamericana de España, pp. 1-17.
- [2] Eweis, J., Ergas, S., Chang, D., y Schoeder, E. (1999) *Principios de Biorrecuperación*. Edit. McGraw-Hill.Madrid.
- [3] APHA.(1998) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20va Edition, APHA, AWWA, WEF New York. 1427 pp.
- [4] Song, H. y Bartha, R. (1990). *Effect of fuel jet spills on the microbial community of soil*. Applied and Environmental Microbiology 56:641-651.
- [5] Sokal, R. y Rohlf, J. (1973) *Introduction to biostatistics*. Edit. W. H. Freeman and Company. San Francisco.
- [6] Coneo, O. y Bastardo, H. (2001) *Simulación a Escala de Laboratorio de la Técnica de Biorremediación en Rípios de Perforación Base Aceite (Diesel)*. Trabajo de Grado. Universidad Central de Venezuela. Caracas.
- [7] BBL (1974) *Manual de Procedimientos de Laboratorio y de Productos*. Editores Asociados. México.
- [8] Kerr, T. (1981) *Applications in General Microbiology. A Laboratory Manual*. 2da ed. Hunter. North Carolina. EEUU. 224 pp.
- [9] MC Faddin, J. (2004) *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica*. Editorial Panamericana. Buenos Aires.
- [10] Harrigan W. y MC Cance, M. (1968) *Métodos de Laboratorio en Microbiología*. Editorial Americana. León.
- [11] Araujo I., Montiulla, M., Angulo, N., Cárdenas, C., Herrera, L., Cárdenas, C. y MORILLO, G. (2006) *Lodods activados y cepas bacterianas en la Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos*. Interciencia, abril año/vol. 31 N° 004. pp 268-275.
- [12] Fenchel, T., King, G. y Blackburn, T. (1998). *Bacterial biogeochemistry*. 2da Edición. Edit. Academic Press. California.
- [13] Eweis, J., Ergas, S., Chang, D., y Schoeder, E. (1999) *Principios de Biorrecuperación*. Edit. McGraw-Hill.Madrid.
- [14] Velasco, J., De La Rosa, D., Ramírez, M. y Volke, T. (2005) *Evaluación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales de México.
- [15] Velásquez, W.; Sulbarán, M.; Rojas, J.; Bahsas A. (2005) *Caracterización de Biosurfactantes producidos por Pseudomonas Fluorescentes aisladas de emulsiones de petróleo pesado*. Ciencia Vol. 13, Nro. 2 Abril - Junio de 2005. p. 228-239 : il. ISSN 1315-2076.
- [16] Hernández, A. (2003) *Caracterización Química de Biosurfactantes*. 1-10 pp. Trabajo no publicado. Universidad Central de Venezuela. Caracas
- [17] Araujo I., Angulo, N., Cárdenas, C., Méndez, M., Morante, M. y Machado, M. (2004) *Biorremediación de suelos con consorcio bacteriano, compostaje y fertilización*. Bol. Centro Invest. Biol., dic. 2004, vol.38, no.3, p.186-202. ISSN 0375-538X.
- [18] Atlas, R. Y Bartha, R. (2002) *Ecología microbiana y microbiología Ambiental*. Cuarta Edición. Edit. Pearson-Addison Wesley. Madrid.
- [19] Juven, Cox, Bailey, Thomson, Charles y Schutze. (1984). J. Food Prot. 47:299
- [20] Kleinheinz, G. Y Bagley, S. (1997) *A Comprehensive Approach to a Laboratory Two-Phase Liquid Biodegra-*

dation Study. Documento en línea disponible en:
<http://www.epress.com/w3jbio/vol2/kleinheinz/kleinheinz.html>.
[Consulta: 2.006, septiembre 20]

- [21] Atlas, R. (1.984) *Petroleum Microbiology*. Macmillan Publishing Company. New York. 691p.
- [22] Bartha, R. (1.986) *Biotechnology of Petroleum Pollutant Biodegradation*. *Microbiol. Ecol.* 12: 155-172.