

Consumo de Hidrocarburos Aromáticos por Bacterias Fijadoras de Nitrógeno Atmosférico Aisladas de Suelos Contaminados por Derrames

Josefina Pérez-Vargas¹; Claudia Castañeda López;
Felipe Palma-Cruz²; Valeria Sandoval González,
Graciano Calva-Calva²



Resumen

Se eligieron los suelos de tres sitios aledaños a pozos petroleros del Activo Cinco Presidentes en Tabasco, México. En ellos se encontraron las siguientes concentraciones de hidrocarburos: Sitio 1, con 80,000 ppm; Sitio 2, con 10,000 ppm, y Sitio 3, con menos de 200 ppm. Son gleysoles permanentemente inundados, originalmente cubiertos por *Thalia geniculata* y *Typha latifolia*. Actualmente están dominados por plantas de *Cyperus laxus* y *Cyperus esculentus*. En cada uno de estos suelos contaminados, se aislaron microorganismos y se detectó la presencia de flora microbiana de vida libre, fijadora de nitrógeno atmosférico (BFNA).

Acerca de los autores...

¹ División de Ingeniería Química y Bioquímica, Posgrado en Ingeniería Bioquímica, Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec

² Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

El interés por estudiar de manera específica estos microorganismos, se debió a que estudios previos de fitorremediación mostraron que la flora microbiana perteneciente a la fijadora libre de nitrógeno atmosférico, se veía aumentada. Una característica de estos microorganismos fijadores, es que para utilizar los hidrocarburos deben fijar nitrógeno atmosférico. Estas BFNA fueron probadas con un compuesto más simple, como queroseno, el cual removieron con una eficiencia del 75%. La concentración inicial utilizada fue de 5000 ppm para un cultivo 12k, y para microorganismos axénicos fue del 50-85% de 1500 ppm de hidrocarburos aromáticos, en un periodo de 13 días cuando se cultivaron en un medio líquido de Rennie modificado. Se encontró que estos microorganismos tuvieron la capacidad de utilizar xilenos, naftaleno y antraceno, y se requería que los cultivos crecieran primero en queroseno y luego en el hidrocarburo aromático correspondiente. Se aislaron 28 cultivos diferentes, de los cuales siete han mostrado las mejores características de crecimiento en los hidrocarburos. Asimismo, se encontró una inusual característica para este tipo de microorganismos: la existencia de una correlación lineal positiva entre la remoción de queroseno y la capacidad de fijación de nitrógeno, tanto para los cultivos axénicos como para el consorcio identificado como 12K.

Introducción

La contaminación por hidrocarburos del petróleo, constituye un serio riesgo para los ecosistemas terrestres en todo el mundo (Vitousek *et al.* 1997), debido a que su impacto produce inmediatamente una reducción en la abundancia y la diversidad tanto vegetal y animal, así como la inhibición de la actividad microbiana. Además, la pérdida de la diversidad y la alteración del funcionamiento normal de los ecosistemas afectados, se incrementa como resultado de la modificación de las condiciones abióticas en los sitios contaminados (Mackey & Currie, 2001; Vavrek *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2002; Keeland *et al.*, 2003).

Las nuevas condiciones ecológicas, aunque inapropiadas para sustentar el desarrollo de la biodiversidad natural de la zona, resultan un buen ecosistema para soportar aquellas formas de vida que muestren la habilidad para establecerse y sobrevivir bajo las condiciones ambientales y nutricionales de tal ecosistema. Así, en varios trabajos sobre estudios de biorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos del petróleo, se ha reportado la presencia de especies vegetales (Gallegos *et al.*, 2000) y microbianas (Pérez *et al.*, 2001) específicas de estos sitios.

En estudios de biorremediación se han probado tanto microorganismos nativos como exógenos del sitio impactado, sin embargo en el caso de plantas sólo se han probado especies exógenas (Palmroth *et al.*, 2002), pero no aquellas nativas de los sitios impactados. Igualmente, en general, las plantas probadas han sido de origen boreal (Simonich & Hites, 1995; Hester & Mendelssohn, 2000; Vavrek & Campbell, 2000; Ke *et al.*, 2002). Se obtuvieron cultivos de los estudios de fitorremediación en la zona de Tabasco, proporcionadas por el CINVESTAV-Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. De cada una de las diferentes condiciones del

suelo utilizado se pudo observar una gran variedad de microorganismos. En el trabajo se ha encontrado que los suelos tenían microorganismos con capacidad de crecer en el petróleo y además eran fijadores de nitrógeno atmosférico, los cuales mostraron una gran capacidad de utilizar hidrocarburos aromáticos en condiciones de fijación de nitrógeno.

Metodología

Obtención de Cultivos de Bacterias Fijadoras Libres de Nitrógeno Atmosférico

Se propagaron cultivos de los suelos contaminados con petróleo obtenidos de un estudio de fitorremediación en la zona de Tabasco, realizados por Calva y colaboradores. En el CINVESTAV-IPN, del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería en el Laboratorio de Ingeniería Metabólica. Para el aislamiento de los cultivos se utilizó un medio específico para microorganismos fijadores de nitrógeno diseñado por Rennie en 1987. Se realizaron diluciones de suelo y se sembraron en caja y en medio líquido en matraces Erlenmeyer. El total de cultivos obtenidos fue de 11, de los cuales se descartaron aquellos que no tuvieron crecimiento abundante en 5000 ppm de queroseno. Los cultivos seleccionados fueron crecidos en medio de Rennie modificado (Rennie 1987), en donde las fuentes de carbono han sido substituidas por queroseno, una fuente menos compleja que el petróleo de donde fueron aislados.

Determinación de la Capacidad de Crecimiento en Queroseno

El cultivo 12K y los Cultivos 1, 2, 3, 5, 8, 9 y 11 se sembraron en 50 ml de medio mineral de Rennie (1987), en un matraces Erlenmeyer de 125 ml, se incubó a 120 r.p.m. y 28°C durante cuatro días. Los cultivos así obtenidos se utilizaron para determinar la capacidad de crecimiento en medio sólido y líquido con queroseno y comprobar si en esas condiciones tenían la capacidad de crecer. Para dosificar el queroseno sobre las placas de agar, se ha utilizado papel filtro Watman 121. El papel filtro impregnado de queroseno, se colocó sobre la parte superior de la tapa de cada una de las cajas de petri. Las placas fueron inoculadas con el cultivo 12K y con Cepas 1, 2, 3, 5, 8, 9 y 11, por estría los cultivos fueron incubados a 28°C durante cuatro días.

Estudios de Degradación de Hidrocarburos

Los cultivos con crecimiento abundante en queroseno, fueron probados en compuestos aromáticos puros para determinar si éstos utilizaban como fuentes de carbono a xilenos, naftaleno y antraceno. Los cultivos fueron inoculados en matraces y en viales para establecer su capacidad para remover el hidrocarburo; utilizando un cultivo para cada tiempo de muestreo, se tomaron tres muestras de cada punto y se hicieron tres extracciones de 15, 4 y 4 ml de diclorometano respectivamente, para determinar la cantidad remanente del hidrocarburo. Las muestras fueron colectadas y guardadas para su análisis por cromatografía. El

cromatógrafo utilizado fue un Varian 3200, con automuestreador, con un detector de ionización de flama. La columna que se utilizó fue una capilar WCOT de sílica fundida, con fase CP-Sil-8CB de 25 m. El programa empleado para la separación de los componentes de hidrocarburos fue temperatura del inyector 220 °C, temperatura de la columna 100 °C (2 min.), 10 °C/min., hasta alcanzar 270 °C, la temperatura del detector fue de 260 °C, el volumen de inyección fue de 5 µl. La concentración de hidrocarburos fue determinada como la sumatoria de las áreas de los picos en cada uno de los cromatogramas de acuerdo con Mondello (1989).

$$R(\%) = \left[\frac{(\sum A_i - \sum A_f) - (\sum A_{ic} - \sum A_{fc})}{\sum A_i} \right] * 100 \quad (1)$$

Donde; i = condiciones iniciales; f = condiciones finales; c = control abiótico; A área bajo la curva del cromatograma, utilizando esta fórmula se da una aproximación más real de la remoción biológica de los hidrocarburos probados.

Resultados

Obtención de Cultivos de Bacterias Fijadoras Libres de Nitrógeno Atmosférico

Se encontraron 11 cultivos de bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno; siete de los cultivos fueron obtenidos de sitios contaminados con petróleo en la zona de Tabasco. Éstos fueron crecidos en queroseno, que es una de las fracciones de la destilación del petróleo consecutiva al craqueo. Los cultivos fueron probados utilizando 5000 ppm del queroseno como fuente de carbono en medio de Reenie modificado (1987). A continuación se reportan tanto las metodologías desarrolladas como los resultados obtenidos para los cultivos 1, 2, 3, 5, 8, 9, y el 11 obtenidos. Estas cepas mostraron la capacidad de crecer en los hidrocarburos, y en los específicos como queroseno, xilenos naftaleno y antraceno, sólo se muestran los que tuvieron crecimiento abundante en ellos.

Los cultivos fueron incubados durante cuatro días a 28 °C, 120 rpm, fue adicionado medio fresco e incubados cuatro días más. Estos cultivos obtenidos fueron utilizados como inóculo para el crecimiento en medio de Rennie modificado, donde las fuentes de carbono se sustituyeron por 1500 ppm de xilenos, naftaleno y antraceno. La determinación del crecimiento de los cultivos fue a las 72 horas, a una temperatura de 28 °C.

En la Tabla 1 se pueden observar los resultados para el crecimiento en placa con las diferentes fuentes de carbono; aquí solo se determinó la capacidad de los

cultivos a crecer en las diferentes concentraciones de los hidrocarburos probados y descartar así a todos aquellos cultivos que no tuvieran la capacidad de crecer primero en queroseno y así sucesivamente. En ella se encontrará que el crecimiento abundante se señala con tres cruces; de un total de 28 cultivos, sólo 11 tuvieron la capacidad de crecimiento de queroseno como fuente de carbono. Con estos resultados, únicamente los cultivos que mostraron crecimiento abundante fueron probados con los compuestos aromáticos.

Cultivo	Queroseno (5000 ppm.)	Xilenos (5000 ppm.)	Naftaleno	Antraceno
1	+++	+++	+++	+++
2	+++	+++	+++	+++
3	+++	+++	+++	+++
4	+++	+++	+++	Neg.
5	+++	+++	Neg.	Neg.
6	+++	+++	Neg.	Neg.
7	+++	+++	+++	Neg.
8	+++	+++	+++	Neg.
11	+++	+++	+++	Neg.

+++ = crecimiento abundante, Neg. = crecimiento negativo

Tabla 1. Crecimiento de los cultivos de bacterias de vida libre fijadora de N₂, crecidas en diferentes fuentes de carbono.

Degradación del Hidrocarburo

Las soluciones patrón de Naftaleno de 1500 ppm, fueron disueltas en etanol de acuerdo con lo descrito por Budavari (1996); a partir de esta medida se prepararon soluciones de 1000 ppm, 500 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 10 ppm y 5 ppm, las cuales se mantuvieron en refrigeración y en la oscuridad. Las soluciones patrón de Antraceno se prepararon en acetonitrilo, para mantener el hidrocarburo en solución. Como los xilenos y el queroseno son líquidos, fueron preparados en hexanos para la curva estándar, y se inocularon al matraz, se adicionaron de manera directa. El medio de Rennie Modificado y 5000 ppm de keroseno, fue inoculado con los microorganismos fijadores de nitrógeno atmosférico y se conservaron en incubación durante cuatro días a 120 ppm. Se preparó un medio de Rennie modificado, utilizando como fuente de carbono al hidrocarburo, e incubados durante cuatro a cinco días para observar crecimiento. Los resultados se presentan en función de la turbidez de los medios de cultivo de Rennie líquido modificado utilizando como fuente de carbono el hidrocarburo, durante un tiempo de incubación en el agitador orbital a lo largo de 96 horas (cuatro días); en la Tabla 1 se muestran los resultados de crecimiento en el medio de cultivo.

Se aislaron 28 cultivos de la rizosfera de las plantas que se recolectaron en el sitio contaminado de Tabasco; sólo nueve de ellas fueron bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno, que mostraron capacidad de crecimiento en 5000 ppm de queroseno y en 1500 ppm de xilenos. Los cultivos presentaron un mejor crecimiento en los diferentes hidrocarburos cuando los inóculos fueron crecidos de manera inicial con queroseno. Un hecho interesante es que los cultivos aislados, mostraron distintas coloraciones, lo cual permitió que se nombraran los cultivos con base en estas coloraciones. Los resultados expuestos en las tablas, corresponden al crecimiento en medio líquido para cada uno de los cultivos probados.

Cultivo	Queroseno	Xilenos	Observaciones
Blanco	5000 ppm	1500 ppm	Solución heterogénea de color blanco
1	5000 ppm	1500 ppm	Se observa el crecimiento microbiano con un color amarillo después de 10 días de cultivo
2	5000 ppm	1500 ppm	Se observa el crecimiento microbiano con un color naranja en el fondo
3	5000 ppm	1500 ppm	Se observa el crecimiento microbiano con un color blanca amarillenta en el fondo
4	5000 ppm	1500 ppm	Se observa el crecimiento microbiano con un color blanco del cultivo
5	5000 ppm	1500 ppm	Se observa el crecimiento microbiano con un color anaranjado claro
6	5000 ppm	1500 ppm	Se observa el crecimiento microbiano con un color amarillo canario
7	5000 ppm	1500 ppm	Se observa el crecimiento microbiano con un amarillento con una alta viscosidad
8	5000 ppm	1500 ppm	Se observa el crecimiento microbiano con un color anaranjado
11	5000 ppm	1500 ppm	Se observa el crecimiento microbiano con un color amarillento del cultivo

Tabla 2. Crecimiento de cultivos de BFNA en queroseno y xilenos en medio de Rennie modificado.

En la Tabla 3 se pueden observar los cultivos que mostraron capacidad de crecer en naftaleno como fuente de carbono y en condiciones de fijación de nitrógeno. Cabe destacar que los cultivos conservaron las características de pigmentación; en este caso, el crecimiento se ve un poco retardado, debido a que la fuente de carbono es insoluble en el medio de cultivo, entonces es necesario que el microorganismo la incorpore, así que al inicio se observa un crecimiento lento y una turbidez elevada; debido a la insolubilidad del compuesto, ésta se ve disminuida conforme el microorganismo la utiliza como fuente de carbono, además de presentar una mayor cantidad de biomasa.

Cultivo	Naftaleno	Observaciones
Blanco	1500 ppm	Solución heterogénea de color blanco
1	1500 ppm	Se observa el crecimiento microbiano con un color amarillo después de 10 días de cultivo
2	1500 ppm	Se observa el crecimiento microbiano con un color naranja en el fondo
3	1500 ppm	Se observa el crecimiento microbiano con un color blanca amarillenta en el fondo
4	1500 ppm	Se observa el crecimiento microbiano con un color blanco del cultivo
7	1500 ppm	Se observa el crecimiento microbiano con un amarillento con una alta viscosidad
8	1500 ppm	Se observa el crecimiento microbiano con un color anaranjado
11	1500 ppm	Se observa el crecimiento microbiano con un color amarillento del cultivo

Tabla 3. Crecimiento de cultivos de BFNA en Naftaleno en un medio de Rennie modificado.

Los resultados obtenidos para los cultivos creciendo en antraceno como fuente de carbono y en condiciones de fijación de nitrógeno, se muestran en las Tabla 4. Como se puede observar, sólo tres de los 11 cultivos seleccionados mostraron la capacidad de crecer en esta fuente de carbono. Los resultados nos indican que a medida que la fuente de carbono se empieza a hacer mas compleja e insoluble, los microorganismos tienen dificultad para utilizarlos, ya que hasta después de casi 10 días se observa que se ha utilizado el hidrocarburo en comparación con los resultados presentados en queroseno, que es líquido, y el cual es utilizado y casi terminado en un lapso no mayor a cinco días. El uso de naftaleno es favorecido si el inóculo es crecido primero en queroseno como fuente de carbono y luego en el antraceno, de lo contrario, el tiempo se retarda hasta más de 20 días o no se presenta.

Cultivo	Antraceno	Observaciones
Blanco	1500 ppm	Solución heterogénea de color blanco
1	1500 ppm	Se observa el crecimiento microbiano con un color amarillo después de 10 días de cultivo
2	1500 ppm	Se observa el crecimiento microbiano con un color naranja en el fondo
3	1500 ppm	Se observa el crecimiento microbiano con un color blanca amarillenta en el fondo

Tabla 4. Crecimiento de las cepas en Antraceno en medio de Rennie modificado.

Los resultados presentados son los primeros estudios realizados específicamente con bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno que muestran la capacidad de utilizar hidrocarburos aromáticos como fuente de carbono y energía.

Remoción de Hidrocarburos

Se realizaron cinéticas de crecimiento de los microorganismos para determinar cuáles serían los tiempos de muestreo, de esta forma, se determinó que el microorganismo presenta actividad en medio de Rennie completo durante las primeras 48 horas de cultivo. Para los cultivos ensayados, puede apreciarse que aislado tienen un comportamiento diferente al que muestran cuando están en el consorcio. En la Tabla 5 se indican los resultados obtenidos para la remoción en un periodo de 15 días de incubación de cada uno de los cultivos seleccionados.

Cultivo	Queroseno Removido (%)	Xilenos Removidos (%)	Naftaleno Removido (%)	Antraceno Removido (%)
1	70	75	70	50
2	80	70	75	70
3	50	75	65	65
4	65	85	70	0
5	80	75	0	0
6	75	75	0	0
7	70	65	50	0
8	60	80	60	0
11	75	80	50	0

Tabla 5. Crecimiento de cultivos de BFNA en medio de Rennie modificado en diferentes fuentes de carbono.

Como puede verse, los cultivos seleccionados muestran gran capacidad de remoción de hidrocarburos del queroseno, debido a la diversa composición del hidrocarburo (compuestos saturados 80%, aromáticos 20%); esto nos permite asumir que los cultivos poseen una capacidad metabólica amplia, que se manifiesta en la versatilidad que presentaron para utilizar diversas fuentes de carbono. Se pudo observar también, que cuando los hidrocarburos son aromáticos y de un solo anillo, como en el caso de xilenos, los cultivos muestran una buena remoción de estos componentes que van desde el 65 al 85%.

En el caso de naftaleno se puede comprobar que los porcentajes de remoción son menores y que incluso los cultivos 5 y 6 no lo pueden utilizar como fuente de carbono. Esto es algo comprensible, debido a la baja solubilidad del naftaleno en agua, por ello se ha pensado en la adición de agentes tensoactivos para aumentar la remoción. Para los cultivos restantes, los porcentajes van desde el 50 al 75% de remoción. Los resultados obtenidos para el antraceno muestran que esta última fuente de carbono fue muy compleja para los cultivos y se ve reflejada en los resultados, en donde solamente los cultivos 1, 2 y 3 mostraron capacidad degradadora del 50 al 70% de remoción. Los resultados son prometedores, ya que se trata de los primeros datos reportados para este tipo de cultivos que puedan remover hidrocarburos aromáticos en concentraciones tan altas como 1500 ppm y que no les son tóxicas.

Las cifras obtenidas son extraordinariamente interesantes, ya que pueden contribuir al desarrollo de una tecnología de biorremediación, en donde se encuentren hidrocarburos aromáticos en concentraciones elevadas y puedan ayudar inclusive a los microorganismos autóctonos, debido a su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. Sin embargo, estos resultados están siendo estudiados con mayor detalle.

Bibliografía...

- Gallegos M.A., Gómez S.A., González C.L., Montes de Oca G.M.A., Yáñez T.L. Zermeño E.J.A. & M. Gutiérrez R. 2000. Diagnostic and resulting approaches to restore petroleum-contaminated soil in a Mexican tropical swamp. *Water Sci. Technol.* 42(5-6): 377-384.
- Hester M.W. & I.A. Mendelssohn. 2000. Long-term recovery of a Louisiana brackish marsh plant community from oil-spill impact: vegetation response and mitigating effects of marsh surface elevation. *Marine Environ. Res.* 49: 233-254.
- Ke L., Wong T.W.Y. & N.F.Y. Tam. 2002. Fate of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination in a mangrove swamp in Hong Kong following an oil spill. *Marine Pollut. Bull.* 45: 339-347.
- Keeland B.D., McCoy J.W. & J.K. Otton. 2003. Effects of produced water and hydrocarbon releases on vegetation at site A of the Osage-Skiatook petroleum environmental research project, Osage County, Oklahoma. In: Proceedings of 10th International Petroleum Environmental Conference. Houston TX.
- Lin Q., Mendelssohn I.A., Siudan M. T., Lee K. & A.D. Venosa. 2002. The dose-response relationship between No. 2 fuel oil and the growth of salt marsh grass, *Spartina alterniflora*. *Marine Pollut. Bull.* 44: 879-902.
- Mackey R.L. & D.J. Currie. 2001. The diversity-disturbance relationship: is it strong and peaked? *Ecology* 82: 3479-3492.
- Mondello (1989). Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Pseudomonas* strain LB400 genes encoding piklychlorinate biphenyl degradation. *J. Bacteriol.* 171 (3): 1725-1752.
- Palmroth M.R.T., Pitchel J. & J.A. Puhakka. 2002. Phytoremediation of subarctic soil contaminated with diesel fuel. *Biores. Technol.* 84: 221-228.
- Pérez, V. J., Poggi V. H. M., Calva C. G., Ríos L. E., Rodríguez V. R., Ferrera-Cerrato R. & G. F. Esparza. 2000. Nitrogen-fixing bacteria capable of utilizing kerosene hydrocarbons as a sole carbon source. *Water Sci. Technol.* 42 (5-6): 407-410.
- Rennie R. J. (1987). A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Can J. Microbio.* 27: 8-14.
- Simonich S.I. & R.A. Hites. 1995. Organic pollutant accumulation in vegetation. *Environ. Sci. Technol.* 29(12): 2905-2914.
- Vavrek M.C. & W.J. Campbell. 2000. Identification of plant traits that enhance biodegradation of oil. OSRAD Technical Report Series 00-012. 18 p.
- Vavrek M.C., Colgan III W. & W.J. Campbell. 2001. The role of plant-bacterial-fungal interaction in remediation of terrestrial oil spill. In: Proceeding of 8th International Petroleum Environmental Conference. Albuquerque NM
- Vitousek P.M., Mooney H.A., Lubchenco J. & J.M. Melillo. 1997. Human domination of earth's ecosystems. *Science* 277: 494-499.