



Conference Paper

Biodegradación de Hidrocarburos en Sedimento de la Bahía de Manzanillo

Ariel Antonio Grey Garibaldi

Universidad Tecnológica de Panamá

Abstract

The capacities of biodegradable were evaluated, isolated microbial consortia in the port area near the Panama Canal, resulting from enrichment in different carbon sources. The inoculation was performed with 5 g of sediment in 250 ml Erlenmeyer flasks with 0.055% naphthalene, phenanthrene and pyrene. Growth was determined by the optical density (OD) colorimetric method and the droplet counting method. The identification procedure was performed using biochemical tests API Coryne System (bioMérieux). This study the growth capacity, triplicate concentrations ranging from 125 ppm to 2000 ppm were added and incubated at 28 ° C with constant stirring at 150 rpm. *Rhodococcus equi* strains were found with greater abundance relative to *Corynebacterium propingun* (3:2). According to the Monod Equation, K_s of 458 mg/L and K_s of 403 mg/L were obtained and the μ_{max} obtained were 1.38×10^7 CFU/mL/h and 1.11×10^8 CFU/mL/h. It is recommended to analyze the kinetics of biodegradation at concentrations higher than 2000 mg/L in order to find the inhibition constant; Perform bioassays with different combinations of hydrocarbons and compare the kinetics of isolated versus kinetic strains in a consortium.

Keywords: Growth capacity, enrichment, carbon source, insulation, biodegradation kinetics.

Resumen

Se evaluaron capacidades biodegradativas, consorcios microbianos aislados en la zona portuaria cerca al Canal de Panamá, resultantes del enriquecimiento en distintas fuentes de carbono. La inoculación se realizó con 5 g de sedimento en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 0,055% de naftaleno, fenantreno y pireno. El crecimiento se determinó por el método colorimétrico por densidad óptica (OD) y el método de recuentos en gotas. El procedimiento de identificación se realizó mediante pruebas bioquímicas API Coryne System (bioMérieux). Para estudiar la capacidad de crecimiento, se les adicionó concentraciones en triplicado que van desde 125 ppm a 2000 ppm e incubados a 28 ° C con agitación constante a 150 rpm. Se hallaron cepas *Rhodococcus equi* con mayor abundancia en relación a la *Corynebacterium propingun*

Corresponding Author:

Ariel Antonio Grey Garibaldi
ariel.grey@utp.ac.pa

Received: 15 November 2017

Accepted: 5 January 2018

Published: 4 February 2018

Publishing services provided
by Knowledge E© Ariel Antonio Grey
Garibaldi. This article is
distributed under the terms of
the Creative CommonsAttribution License, which
permits unrestricted use and
redistribution provided that
the original author and source
are credited.Selection and Peer-review
under the responsibility of the
ESTEC Conference Committee.

(3:2). De acuerdo a la Ecuación de Monod, se obtuvo K_s de 458 mg/L y K_s de 403 mg/L y las μ_{max} obtenidas fueron 1.38×10^7 UFC/mL/h y 1.11×10^8 UFC/mL/h. Se recomienda analizar las cinéticas de biodegradación a concentraciones mayores a 2000 mg/L con la finalidad de encontrar la constante de inhibición; realizar bioensayos con diferentes combinaciones de hidrocarburos y comparar las cinéticas de cepas aisladas versus cinéticas en consorcio.

Palabras claves: capacidad de crecimiento, enriquecimiento, fuente de carbono, aislamiento, cinética de biodegradación.

1. Introduction

Los microorganismos se adaptan o desarrollan su metabolismo en función de los parámetros físico-químicos (pH, temperatura, humedad) así como de los compuestos químicos que se encuentran en su ambiente inmediato. El petróleo y los hidrocarburos se encuentran naturalmente presentes en el suelo, lo que ha permitido a muchos microorganismos acostumbrarse a su presencia y utilizarlos para sobrevivir (Wayens, 2004). *Pseudomonas* es el género que con mayor frecuencia se aísla de ambientes contaminados con hidrocarburos (Norman *et al.*, 2002) y de la cual mayor información ha sido registrada; se conoce su capacidad para crecer sobre una amplia variedad de hidrocarburos del petróleo como benceno, naftaleno, tolueno (Haigler *et al.*, 1993), gasolina, kerosene y diésel (Wongsa *et al.*, 2004). En su gran mayoría las bacterias degradadoras de hidrocarburos se encuentran en el grupo de Gram negativas (Ruberto *et al.*, 2003). En esta investigación se presentan resultados y discusiones de diferentes bioensayos de crecimiento bacteriano a diferentes concentraciones de naftaleno como única fuente de carbono. Por otra parte, se aísla e identifica las cepas con capacidad degradativa y se realiza una cinética de crecimiento.

2. Metodología

Se evaluaron las capacidades biodegradativas, de tres consorcios microbianos resultantes del enriquecimiento en distintas fuentes de carbono y energía. El naftaleno, pireno, y fenantreno, adquirido de Sigma-Aldrich, fueron utilizados como única fuente de carbono para el enriquecimiento de bacterias degradantes. El consorcio bacteriano fue aislado a partir de cinco sitios de muestreo en la zona cerca al Canal de Panamá

(Bahía de Manzanillo). La inoculación se realizó con 5 g de sedimento en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 0,055% naftaleno, fenantreno y pireno. El crecimiento se determinó por el método colorimétrico densidad óptica (OD). Se utilizó un medio basal HC como única fuente de carbono (MN), la composición del medio basal en 1 litro fue: NaH_2PO_4 , 3 ml; KH_2PO_4 , 10 mL; NH_4SO_4 10 mL; MgSO_4 , 1 mL; y Elementos Trazas, 10; con 23 gramos de NaCl, Hernandez *et al.* (2001). El procedimiento de identificación se realizó mediante pruebas bioquímicas convencionales utilizando el sistema comercial API Coryne System (bioMérieux). Para estudiar la capacidad de crecimiento, al medio, se les adicionó diferentes concentraciones de naftaleno en triplicado que van desde 125 ppm y 2000 ppm e incubados de 28 ° C con agitación constante a 150 rpm. Cada 24 h se tomaron alícuotas para su análisis por espectroscopia UV y recuento en placas con agar nutritivo (Aranda *et al.*, 2003). Paralelamente, 1 ml de muestra se almacenó a -20 °C para su posterior análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD). El crecimiento de las colonias fue medido utilizando la técnica estándar de recuento en gotas de acuerdo a Domínguez *et al.* (2004).

3. Resultado y discusión

En las cinco muestras de sedimentos se aislaron aquellos microorganismos que son capaces de consumir naftaleno, pireno y fenantreno como única fuente de carbono, el aislamiento se realizó mediante (Hernández, 1997) para aumentar las probabilidades de obtención de un consorcio microbiano. Este hecho, permitió seleccionar bacilos y cocabacilos Gram negativos y positivos en los cinco hábitats estudiados. Al final de las transferencias sucesivas se obtuvieron cinco cepas, se identificaron las bacterias mediante la utilización de un API Coryne, de los cuales tres de las cepas pertenecían a la cepa *Rhodococcus equi* y las otras dos a la *Corynebacterium propingun*, dos a pH 7.3 y tres a pH 6.2 con un buen crecimiento celular. En la Figura No. 1, las dos bacterias encontradas, fueron incubadas en medio mínimo mineral (MMN) a iguales condiciones ambientales, demostrando mejor condición la bacteria *Rhodococcus equi*, siendo esto objeto de este estudio.

Se observa que los microorganismos fueron capaces de crecer exponencialmente utilizando como única fuente de carbono el naftaleno. En los casos del Pireno y Fenantreno, no hubo evidencia de crecimiento exponencial en el período estudiado (430 h). Esto coincide con resultados como los obtenidos por González *et al.*, (2010); Haritash y Kaushik (2009); Salazar (2010) que encontraron que mientras menor es la

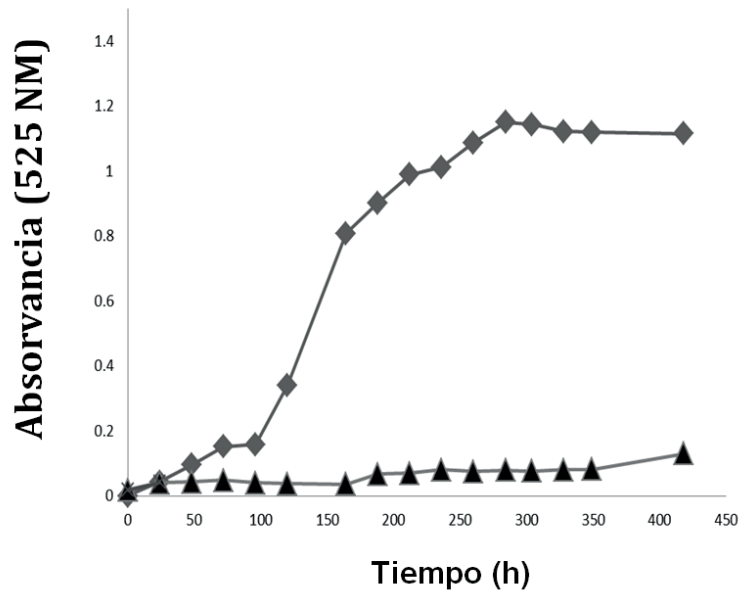


Figura 1: Curva de tolerancia de los microorganismos estudiados *Rhodococcus equi* (◆) y *Corynebacterium propingun* (▲)

cantidad de anillos en la molécula, mayor es la capacidad de biodegradación de las bacterias. (Figura No. 2)

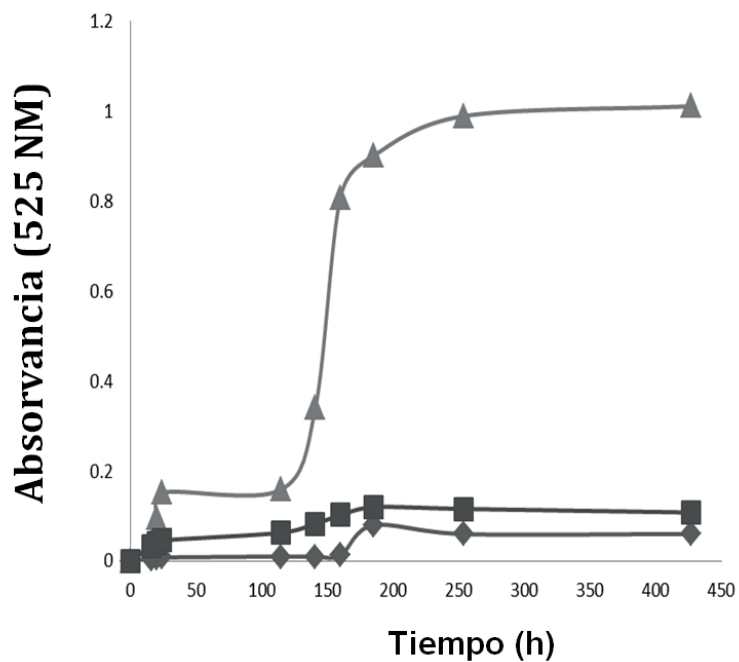


Figura 2: Curva de tolerancia en medio líquido del consorcio bacteriano. La curva manifiesta los sustratos Pireno (▲), Naftaleno (■) y Fenantreno (◆).

Estos resultados muestran que este tipo de cepa bacteriana que se encontró en el sedimento (*Rhodococcus equi*) tiene una buena capacidad de crecer en el sustrato

de fácil asimilación; además, también es un indicativo de que contiene una población microbiana activa, lo cual es típico de zonas cercanas a descargas de aguas con alta materia orgánica (Ramírez, 1998). Sin embargo, también muestran que tiene una baja capacidad para adaptación y/o degradación de compuestos poliaromáticos de alto peso molecular como es el caso del fenantreno y pireno. Para modelar la cinética de crecimiento, la cual de acuerdo a autores como Mihelcic (2001) y Mihelcic *et al.* (2012) es proporcional al consumo de sustrato (en este caso naftaleno), se utilizaron las velocidades iniciales de crecimiento. Como se observa en la Figura No.3, ambas curvas (septiembre 2012, julio 2013) tienden a modelar la cinética de tipo Monod, sin inhibición, y llegando a una capacidad de carga, de la *Rhodococcus equi*. Sin embargo, en la cinética de crecimiento de septiembre de 2012, todavía no se evidencia la llegada a la capacidad de carga.

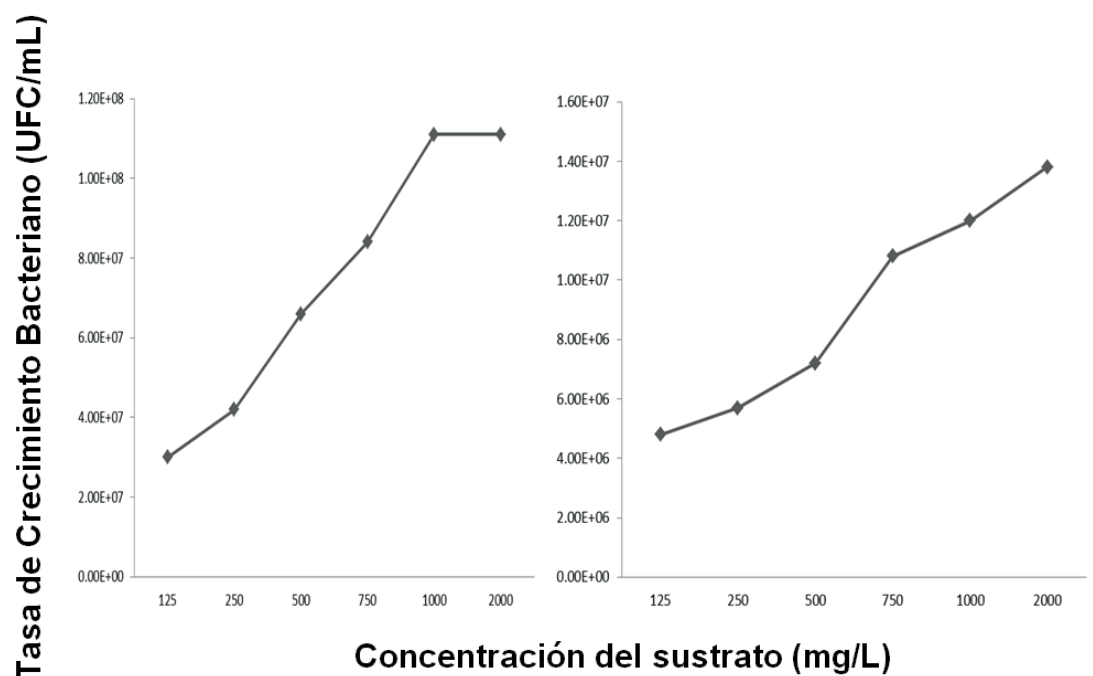


Figura 3: Modelo de crecimiento de la *Rhodococcus equi* correspondiente (a) septiembre de 2012 y (b) julio de 2013.

De acuerdo a Navdeep, *et al.* (2013), demostrarán que la velocidad de crecimiento depende de la afinidad del compuesto al microorganismo, como también la influencia del tóxico y de la adición de otro compuesto como co-sustrato, lo cual es determinante en la obtención de la constante de saturación y de inhibición en el caso de Young *et al.*, (2005), la K_s fue 2874 mg/L utilizando lodo contaminado de hidrocarburo como co-sustrato. En este estudio, utilizando naftaleno como única fuente de carbono, se observó que la K_s fue mayor (458 mg/L) a la T° de 30°C en relación a cuando la T° fue

menor de 26°C, donde la K_s tuvo un valor de 403 mg/L, esto sustenta lo encontrado por Bitton (2005); Huertas (2010); Lara (2011), que a mayores temperaturas mayor es la capacidad de un organismo de consumir un sustrato. Si existe una población tolerante a la contaminación, esta contaminación puede participar en la recuperación del equilibrio del sitio contaminado como fue reportado por (David y Raymond, 1998). Como se observa en la Figura No. 3, ambas curvas tienden a modelar la cinética de tipo Monod, sin inhibición, y llegando a una capacidad de carga, de la *Rhodococcus equi*. Sin embargo, en la cinética de crecimiento, todavía no se evidencia la llegada a la capacidad de carga.

4. Conclusiones y recomendaciones

En el sedimento de la Bahía de Manzanillo se encontró que las cepas *Rhodococcus equi* y *Corynebacterium propingun*, cuentan con la capacidad de degradar naftaleno como única fuente de carbono. Para el caso del fenantreno y pireno, no se evidenció crecimiento. Es importante resaltar que no se han encontrado otros estudios en los cuales el *Rhodococcus equi*, se halla utilizado como agente biodegradador de algún compuesto orgánico recalcitrante. El *Rhodococcus equi* fue la cepa que se encontró con mayor abundancia, en relación a la *Corynebacterium propingun* (3:2). De acuerdo a la Ecuación de Monod, se encontraron la μ_{max} , $\mu_{max}/2$ y K_s (constante de saturación), para ambos períodos. La K_s refleja la capacidad de un organismo para adquirir recursos (sustrato, en este caso naftaleno en mg/L). Así, las tasas máximas de crecimiento específico (\square_{max}) obtenidas fueron para septiembre de 2012, 1.38×10^7 UFC/mL/h y para julio de 2013 1.11×10^8 UFC/mL/h. Cabe señalar que en ambos escenarios la temperatura fue de 30 °C para los ensayos de septiembre de 2012 y de 26°C para los ensayos de julio 2013. De los seis (6) bioensayos de crecimiento de la cepa *Rhodococcus equi* utilizando como única fuente de carbono naftaleno, se presentaron los dos comportamientos de crecimiento y los dos modelos cinéticos de crecimiento más representativos (septiembre 2012 y julio 2013); obteniendo K_s de 458 mg/L a la T°de 30°C y K_s de 403 mg/L a la T°de 26°C, esto sustenta lo encontrado por Bitton (1994); Huertas (2010); Lara (2011), que a mayores temperaturas mayor es la capacidad de un organismo de consumir un sustrato. Se recomienda analizar las cinéticas de biodegradación de naftaleno a concentraciones mayores a 2000 mg/L con la finalidad de encontrar la constante de inhibición; además, realizar bioensayos con diferentes combinaciones de hidrocarburos. Por último, se deben comparar las cinéticas de cepas aisladas versus cinéticas en consorcio.

Referencias

- [1] Aranda, C., Godoy, F., Becerra, J., Barra, R. y Martínez, M., (2003). Aerobic secondary utilization of a nongrowth and inhibitory substrate -2,4,6-trichlorophenol by *Sphingopyxis chilensis* S 37 and *Sphingopyxis*-like strain S 32. *Biodegradation* 14: 265-274.
- [2] Bitton, G., (2005). Wastewater microbiology. 3rd edition. Wiley Serie in Ecological and Applied Microbiology. Wiley and Sons Publications. New Jersey. P. 213-222.
- [3] Davis, B. y Raymond, L., (1998). Oxidation of alkyl substituted cyclic hydrocarbons by a *Nocardia* during growth on *n*-alkanes. *Appl. Microbiol.* 9:383-388
- [4] Domínguez, V., Vidal, G. y Martínez, M., (2004). Sorptive behavior of chlorophenols on river volcanic sediment. *Bull Environ Contam Toxicol* 73:519-526.
- [5] González, R., Bustillos, T., Fernández, M., Cortes, B., y Moroyoqui, G., (2010). Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Química Viva*, 9(3), 120-145.
- [6] Haigler, B. y Spain, J., (1993). Biodegradation of 4-nitrotoluene by *Pseudomonas* sp. strain 4NT. *Applied and Environmental Microbiology*. 59 (7): 2239-2243.
- [7] Haritash, K. Y Kaushik, P., (2009). Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *J Hazard Mater.* 2009 Sep 30; 169(1-3):1-15.
- [8] Hernandez, B., Koh, C., Chial, M. y Focht, D., (1997). Terpene-Utilizing Isolates and their Relevance to Enhanced Biotransformation of Polychlorinated Biphenyls in Soil. *Biodegradation*. 1997; 8:153-158.
- [9] Huerta, H., (2010). Determinación de propiedades físicas y químicas de suelos con Mercurio en la Región de San Joaquín y su relación con el crecimiento bacteriano. Tesis de Grado. Universidad Autónoma de Querétaro. México.
- [10] Lara, A., (2011). Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista mexicana de ingeniería química*, 10 (2), 209-223
- [11] Mihelcic, J., (2012). Fundamentos de Ingeniería Ambiental. Limusa Wiley. México, D.F.
- [12] Mihelcic, J., (2001). Fundamentos de Ingeniería Ambiental. Limusa Wiley. México, D.F.
- [13] Monod, J., (1949). "The growth of bacterial cultures". *Ann. Re'v. Microbiol* 3 371-394.
- [14] Mueller, J., Chapman, P., Blattmann, B. y Pritchard, P., (1990). Isolation and characterization of a fluoranthene-utilizing strain of *Pseudomonas paucimobillis*. **Appl. Environ. Microbiol.** 56:1079-1086.

- [15] Navdeep, S., Yuvneet, R., Maninder, K. y Ashna, G., (2013). The Isolation & Characterization of Several Strains of Naphthalene Degrading Bacteria obtained from oil-contaminated sites. Institute of Pharmaceutical Sciences, Dept. Of Biotechnology, Punjab Technical University, Punjab. India
- [16] Ramirez, M., (1998). Biodisponibilidad y Biodegradación de Naftaleno en Suelo. Tesis de grado. Universidad Autónoma Metropolitana. Mexico.
- [17] Ruberto, L., Vázquez, S. y Mac Cormack, W., (2003). Effectiveness of the natural bacterial flora. Biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. *Internat. Biodeter. Biodegr.*, 52: 115-125.
- [18] Salazar Ruales, C., (2010). Evaluación de la remoción de hidrocarburos totales de petróleo, a nivel de laboratorio, mediante consorcios de microorganismos seleccionados por su capacidad degradadora, aislados de suelos y aguas contaminadas con crudo de la parroquia San Carlos, provincia de Orellana, bajo condiciones aerobias y anaerobias.
- [19] Wayens, C., (2004). Estudio del potencial de degradación de los hidrocarburos por *Acinetobacter* sp. y *Pseudomonas putida* para su aplicación en la biorremediación de suelos contaminados. Tesis de grado. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Escuela de Biología.
- [20] Wongsu, P., Tanaka, A., Hasanuzzaman, M., Yumoto, I. y 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. *Curr. Microbiol.*, 49: 415-422.
- [21] Young, C., Chen, T. y Song, M., (2005). Identification and Kinetic Characteristics of an Indigenous Diesel-degrading *Gordonia alkanivorans* Strain *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Volume 21, Number 8-9.

Authorization and Disclaimer

Authors authorize ESTEC to publish the paper in the conference proceedings. Neither ESTEC nor the editors are responsible either for the content or for the implications of what is expressed in the paper.