

Artículo original

Biodegradación de petróleo y sus derivados por la comunidad bacteriana en un suelo de la Patagonia Argentina

Adrián Acuña*, Graciela Pucci, María José Morales, Oscar Pucci

Centro de Estudios e Investigación en Microbiología Aplicada (CEIMA). Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Argentina.

Recibido 7 de noviembre de 2009; aceptado 16 de junio de 2010

Resumen: El objetivo de este trabajo fue caracterizar una muestra de suelo proveniente de un sistema de biorremediación en actividad y determinar la capacidad de la comunidad bacteriana de biodegradar petróleo y sus destilados, e identificar los principales microorganismos involucrados en el proceso. Para esto se tomó una muestra de suelo por la técnica de *lanfarming* y se caracterizaron sus propiedades físicas, químicas y microbiológicas; así como el tipo de hidrocarburos que contenía por extracción con Soxhlet y cromatografía en columna de sílica gel. A partir de la muestra se extrajo la comunidad bacteriana, y se determinó su potencial para biodegradar petróleo, sus diferentes fracciones y los destilados comerciales que se obtienen a partir de él. Se utilizaron métodos indirectos de medición del crecimiento bacteriano por conteo de microorganismos y medición de densidad óptica. A partir de estos sistemas se aislaron 41 cepas y se identificaron por FAME. Los principales resultados indicaron que la comunidad bacteriana del suelo posee la capacidad de biodegradar los hidrocarburos existentes en el mismo, principalmente la fracción alifática, así como los destilados gasoil, kerosén y aceite lubricante, siendo la fracción aromática, la polar y el destilado nafta no degradados. Esta comunidad está constituida principalmente por *Rhodococcus erythropolis*, *Achromobacter xylosoxidans* y *Brevundimonas diminuta*, mostrando la mayor biodiversidad cuando los hidrocarburos utilizados como fuente de carbono pertenecen al grupo de los alifáticos. Las características físicas, químicas y microbiológicas del suelo indicaron que es factible que se realice una biorremediación eficiente de los hidrocarburos presentes.

Palabras clave: biorremediación, hidrocarburos, comunidad bacteriana

Biodegradation of petroleum and its derivatives by the bacterial community in the soil of the Argentinean Patagonia

Abstract: The purpose of this study was to characterize a soil sample obtained from an active bioremediation system and determine the capacity of the bacterial community for biodegrading petroleum and its distilled products, and identify the main microorganisms involved in the process. For this object a soil sample was taken with the *lanfarming* technique and its physical chemical and microbiological characteristics were characterized, as well as the type of hydrocarbons it contained by Soxhlet extraction and silica gel column chromatography. From this sample we also extracted the bacterial community and determined its potential for degrading petroleum, its different fractions and the commercial distilled products obtained from it. We used indirect measurement methods for determining bacterial growth by counting the microorganisms and measuring optical densities. Through these methods we isolated 42 strains and identified them by FAME. The principal results indicated that the soil bacterial community has the capacity for degrading the hydrocarbons in it, mainly the aliphatic fraction as well as the distilled products such as gasoil, kerosene and lubricant oil, while the aromatic and polar fractions and the naphtha distilled product are non degradable. This community is mainly constituted by *Rhodococcus erythropolis*, *Achromobacter xylosoxidans* and *Brevundimonas diminuta*, showing the greatest diversity when the hydrocarbons used as carbon source belong to the aliphatic group. The physical, chemical and microbiological characteristics of the soil indicated that it is possible that an efficient bioremediation of the hydrocarbons present occurs.

Keywords: bioremediation, hydrocarbons, bacterial community

* Correspondencia:
E-mail: ajcuna@unpata.edu.ar

Introducción

La Patagonia Argentina, posee grandes regiones

despobladas que han sido ocupadas por instalaciones de la industria petrolera. Esto ha generado grandes zonas con potencial riesgo de contaminación, que en muchos casos

no serían tratados debido a su extensión, dificultad de acceso, etc [1]. Existen diferentes tecnologías aplicables a la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos. Los métodos biológicos han demostrado ser eficientes y adecuados [2, 3] debido a que causan menor impacto en el sitio del problema. Para optimizar el proceso surgió un sistema denominado *landfarming*, sistema de biorremediación por aplicación repetida de contaminantes en suelos, debidamente acondicionados con nutrientes, y condiciones físicas óptimas para el crecimiento bacteriano. Por este motivo es importante caracterizar el suelo sobre el cual se trabaja [3].

La biodegradación depende de las características del hábitat, del contaminante y de los microorganismos; por tanto es de gran importancia tener en cuenta cada uno de estos factores a la hora de aplicar la metodología [4].

El petróleo está constituido por distintas fracciones de hidrocarburos. La fracción de hidrocarburos alifáticos (con 18 a 35 átomos de carbono llamados parafinas), hidrocarburos aromáticos (con uno o más anillos como benceno, naftaleno, y fenantreno), y los hidrocarburos polares, es decir asfaltenos altamente condensados y resinas. El petróleo también posee compuestos orgánicos con sulfuro, nitrógeno y oxígeno, y constituyentes metálicos en poca proporción. Debido a la complejidad de la composición del petróleo, la biodegradación por parte de las bacterias dependerá de las proporciones que tenga de cada una de sus fracciones [5].

El gasoil, presenta una mezcla de hidrocarburos obtenidos por destilación en un rango de temperatura de 175 a 345°C entre los que se destacan los n-alcenos y una baja proporción de compuestos aromáticos. Las bacterias lo emplean con facilidad como fuente de carbono y energía. El kerosén presenta hidrocarburos obtenidos por destilación a temperaturas entre 205 y 260°C, recuperándose parafinas lineales, ramificadas y cíclicas, como así también compuestos aromáticos mononucleares y dinucleares. Los ciclos alcanos presentes lo hacen refractario a la biodegradación. En la nafta, los hidrocarburos se obtienen al destilar el petróleo entre 180 y 200°C, y presenta compuestos con 4 a 12 átomos de carbono que incluyen parafinas, olefinas y compuestos aromáticos. Los aromáticos resultan tóxicos para las membranas lipídicas de las bacterias dificultando su degradación [5-9]

Con el conocimiento de las características generales respecto a la composición de los distintos destilados del petróleo, es importante analizar el potencial de biodegradación de los microorganismos para cada uno en particular, ya que esto proporciona información sobre la eficacia de las comunidades bacterianas para metabolizarlos. Así mismo, resulta de gran interés llegar a la identificación de las cepas involucradas en la biodegradación, ya que sería de utilidad para optimizar tal proceso.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar una muestra de suelo proveniente de un sistema de biorremediación en actividad y determinar la capacidad de la comunidad bacteriana de biodegradar petróleo y sus destilados, así como también identificar los principales microorganismos

involucrados en el proceso.

Materiales y métodos

Muestra de suelo: Se estudió un suelo contaminado con residuos de la industria petrolera provenientes del noreste de la ciudad de Comodoro Rivadavia, Argentina, sometido a biorremediación mediante la técnica de *landfarming*. La muestra se obtuvo a partir de la toma de 25 submuestras de aproximadamente un kilogramo a partir de un área de 100 m² a una profundidad comprendida entre 10 y 30 cm [10]. Estas fueron mezcladas, pasadas por un tamiz de 2 mm de abertura para eliminar todas las piedras existentes, y por cuarteos sucesivos se tomó una porción de 2 kg sobre la cual se realizaron las determinaciones.

Estudio inicial del suelo:

Análisis físico y químico: Las determinaciones de humedad, materia orgánica, densidad real, densidad aparente, porosidad y de capacidad de retención de agua (CRA) se realizaron según lo propuesto por García Trejo en 1981 [11]. El pH, cationes y aniones se realizaron sobre un extracto de suelo 1:2,5 en agua destilada. La determinación de pH fue realizada mediante un potenciómetro con electrodo de vidrio y el contenido de carbonato y bicarbonato por titulación con ácido clorhídrico 0,1N, utilizando fenolftaleína y heleanina (naranja de metilo) como indicadores ácido-base. El calcio y magnesio se investigaron por complejometría con EDTA, a pH 12, para el primero de ellos, utilizando murexida como indicador y a pH 10 con negro de ericromo T como indicador, para el segundo. El cloruro fue determinado por el método de Mohr y el sulfato por su precipitación en medio ácido. El nitrito se determinó colorimétricamente con ácido sulfanílico y 1-naftilamina y el nitrato con brucina en presencia de ácido sulfúrico. El ión amonio se investigó mediante el uso de azul de indofenol y el fosfato con azul de molibdeno [1]. La textura del suelo se midió sobre 25 g de peso seco utilizando el método del tacto según lo propuesto por Yolcubal *et al.* en 2004 [12]. Este método se complementó determinando la composición granulométrica del mismo, sobre 100 g, utilizando diferentes tamices para determinar la cantidad de la fracción más gruesa (arena), y la fracción fina, constituida por limo y arcilla. Se utilizó un tamiz N° 40, con una abertura de 0,42 mm, para conocer la cantidad de arena de tamaño medio, otro N° 120, con abertura de 0,125 mm, para las partículas de arena fina y otro N° 170, con abertura de 0,088 mm, para las de arena muy fina. Las partículas que no fueron retenidas por el tamiz N° 170, se clasificaron como la sumatoria de limo y arcilla.

Análisis microbiológico: Los recuentos de bacterias heterótrofas y degradadoras de hidrocarburos se realizaron en placa, por la técnica de diseminación en superficie, a partir de una suspensión de 10 g de muestra en 90 mL de solución fisiológica estéril que se agitó durante 30 minutos a 80 r.p.m y la incubación se realizó durante 20 días a 28°C.

Los medios de cultivos utilizados fueron R2A [13] para bacterias heterótrofas (extracto de levadura 0,5 g; peptona

proteasa 0,5 g; casamino ácido 0,5 g; glucosa 0,5 g; almidón 0,5 g; piruvato de sodio 0,3 g; K_2HPO_4 0,3 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05 g; agar 15 g; agua destilada 1000 mL) y medio mineral [1] [$NaCl$ 5 g; K_2PO_4H 0,5 g; $NH_4PO_4H_2$ 0,5 g; $(NH_4)_2SO_4$ 1 g; $MgSO_4$ 0,2 g; KNO_3 3 g; $FeSO_4$ 0,05 g; SL 10 B (HCl (25 %) 7,7 mL; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,5 g; $ZnCl_2$ 0,07 g; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,1 g; H_3BO_3 0,3 g; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,19 g; $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,002 g; $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,024 g; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0,036 g; agar 15 g; agua destilada 1000 mL] adicionado con 30 μ L de una mezcla de petróleo de la cuenca del Golfo San Jorge y gasoil 1:1 al que se denominó MM-PGO [1] para bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDH).

Análisis de hidrocarburos: El contenido de hidrocarburos totales (HT) se determinó sobre 50 g de suelo mediante extracción con Soxhlet durante 24 h con tricloroetano como solvente de extracción. Los hidrocarburos extraídos fueron cuantificados gravimétricamente [14]. Las fracciones alifática, aromática y polar de los HT obtenidos fueron separadas por cromatografía en columna de silicagel (Kieselgel 60, 35-70 mesh, Merck) a partir de 0,3 g de residuo. Como solventes de elución se utilizaron 250 mL de hexano, 150 mL de benceno y 150 mL de cloroformo-metanol 1:1, para los hidrocarburos alifáticos, aromáticos y polares, respectivamente [5]. Las fracciones obtenidas se cuantificaron gravimétricamente [14].

Estudio del potencial de biodegradación de la comunidad bacteriana del suelo:

Obtención de la comunidad bacteriana: Se realizó un enriquecimiento de la comunidad bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de 10 g de suelo en 90 mL de caldo mineral y 100 μ L de petróleo estéril de la cuenca del Golfo San Jorge no sometido a biodegradación, que es el mismo que contaminó la muestra estudiada; éste se incorporó para tener todas las fracciones del petróleo disponibles y enriquecer el mayor número de microorganismos. Se incubó durante 10 días a 28°C con agitación orbital a 150 r.p.m. Luego se tomó un mililitro de la suspensión bacteriana obtenida y se colocó en 90 mL de caldo mineral nuevo con 100 μ L de petróleo estéril y se incubó en las mismas condiciones. Esta operación se repitió dos veces más y luego del último repique, se mantuvo el cultivo en las condiciones de incubación hasta que el mismo logró una densidad óptica de 0,5 a 690 nm.

Potencial de biodegradación de la comunidad bacteriana: Se prepararon sistemas líquidos por triplicado utilizando como sustrato cada una de las fracciones de hidrocarburos obtenidas desde el propio suelo (alifáticos, aromáticos, y polares), y con petróleo de la cuenca del Golfo San Jorge y sus destilados (gasoil, kerosén, nafta y aceite lubricante), todos ellos estériles. Cada sistema se constituyó con 15 mL de caldo mineral, 20 μ L del hidrocarburo ensayado y 200 μ L del extracto bacteriano obtenido a partir del suelo. La incubación se realizó 24 días a 28°C con agitación orbital a 150 r.p.m en oscuridad, y el seguimiento se realizó por medición de absorbancia a 690 nm frente a un blanco conformado por el caldo mineral más el hidrocarburo

correspondiente, con el fin de observar la cinética de crecimiento y potencial de degradación de hidrocarburos.

Luego de los 24 días de incubación, se realizó para cada tubo un recuento de UFC en placa, por la técnica de diseminación en superficie, por triplicado, de BDH en medio MM-PGO. La incubación de las placas se realizó durante 20 días a 28°C.

Identificación de BDH: De las distintas placas de recuento en MM-PGO de los sistemas de cinética de crecimiento, se seleccionaron colonias siguiendo como criterio la visualización de la morfología de las mismas, llegando a seleccionar un total de 41 cepas. La identificación se realizó por metil ésteres de ácidos grasos (FAME) mediante tratamiento de 40 mg de masa celular crecida en la tercera estría de un cultivo en medio TSBA [15] (tripteína 15 g; peptona de soya 5 g; $NaCl$ 5 g; glucosa 5 g; agar 15 g; agua destilada 1000 mL, pH 7,2) de 24 horas efectuando una saponificación con alcohol metílico-hidróxido de sodio-agua (150 mL:45 g:150 mL) seguida de una metilación con ácido clorhídrico 6N y alcohol metílico (325 mL:275 mL) y a continuación una extracción con n-hexano-metil térbutil éter (1:1) y lavado con hidróxido de sodio-agua (10,8 g-900 mL) [16]. Las muestras fueron procesadas por triplicado y se almacenaron a -20°C hasta realizar la cromatografía correspondiente. Los ácidos grasos obtenidos se determinaron como metil ésteres (FAME) por cromatografía gaseosa, utilizando una columna capilar Ultra2 de 25m de longitud y 0,2mm de diámetro. El análisis se llevó a cabo con un cromatógrafo HP 6890 serie II GC (inyección splitless; presión inicial 10 psi; programa de temperatura: 170-250°C a 5°C.min⁻¹, 260-310°C a 40°C.min⁻¹, 1,5 min. de permanencia a 310°C, detector por ionización de llama) controlado por Chemstation 10,0x (Hewlett Packard). La integración se realizó según el sistema MIDI Sherlock versión 6.0 [16].

Como criterios de identificación fueron tomados los especificados por el manual del sistema utilizado que indica, que para una buena identificación, el microorganismo debe tener un índice de similitud (IS) mayor a 0,5 con una diferencia mayor de 0,1 con respecto a la segunda opción de identificación que nos brinda el sistema.

Con las identificaciones realizadas a partir de los sistemas líquidos con diferentes fuentes de carbono, se realizó un análisis de componentes principales utilizando el programa PASS.

Resultados

Estudio inicial del suelo: Los datos físicos y químicos obtenidos indican que el suelo no posee limitantes de este tipo para el correcto desarrollo de microorganismos (Tabla 1), a excepción del contenido de nutrientes biodisponibles (nitrato, nitrito, amonio y fosfato), que se observaron en concentraciones deficientes en el suelo, lo que puede representar un problema en la biorremediación de los hidrocarburos presentes. El número de microorganismos heterótrofos totales fue de $4,1 \times 10^6$ UFC/g y el de BDH

de $1,2 \times 10^6$ UFC/g. El alto contenido de hidrocarburos encontrado en el suelo fue concordante con su procedencia (Tabla 1). Estos se encontraron constituidos por un 45,8% de hidrocarburos alifáticos, un 26,1% de hidrocarburos aromáticos y un 28,1% de hidrocarburos polares.

Estudio del potencial de biodegradación de la comunidad

bacteriana del suelo: De las fracciones de hidrocarburos alifáticos, aromáticos y polares provenientes del suelo, sólo los hidrocarburos alifáticos produjeron un aumento en la biomasa en medio líquido (Figura 1). Con respecto a los destilados del petróleo, la nafta produjo inhibición de la comunidad bacteriana recuperada, mientras que los demás fueron capaces de promover su desarrollo. Con

Tabla 1. Análisis inicial realizado sobre la muestra de suelo de la Patagonia, Argentina.

Análisis físico		Análisis químico (mg.kg ⁻¹)	
pH	8,0	Cloruro	180
Humedad (%)	1,9	Sulfato	385
Materia orgánica (%)		Carbonato	nd
Densidad aparente (g.cm ³⁻¹)	1,1	Bicarbonato	87
Densidad real (g.cm ³⁻¹)	2,2	Calcio	20
Porosidad (%)	47	Magnesio	49
Capacidad retención de agua (%)	31	Nitrito	0,7
		Nitrato	21,5
		Amonio	0,2
		Fosfato	7,2
Análisis de textura (%)		Análisis de hidrocarburos (mg.kg ⁻¹)	
Tacto	Areno Limoso	Totales	67800
Arena media	4	Alifáticos	31052
Arena fina	61	Aromáticos	17628
Arena muy fina	28	Polares	19119
Limo y arcilla	7		

nd: no detectable.

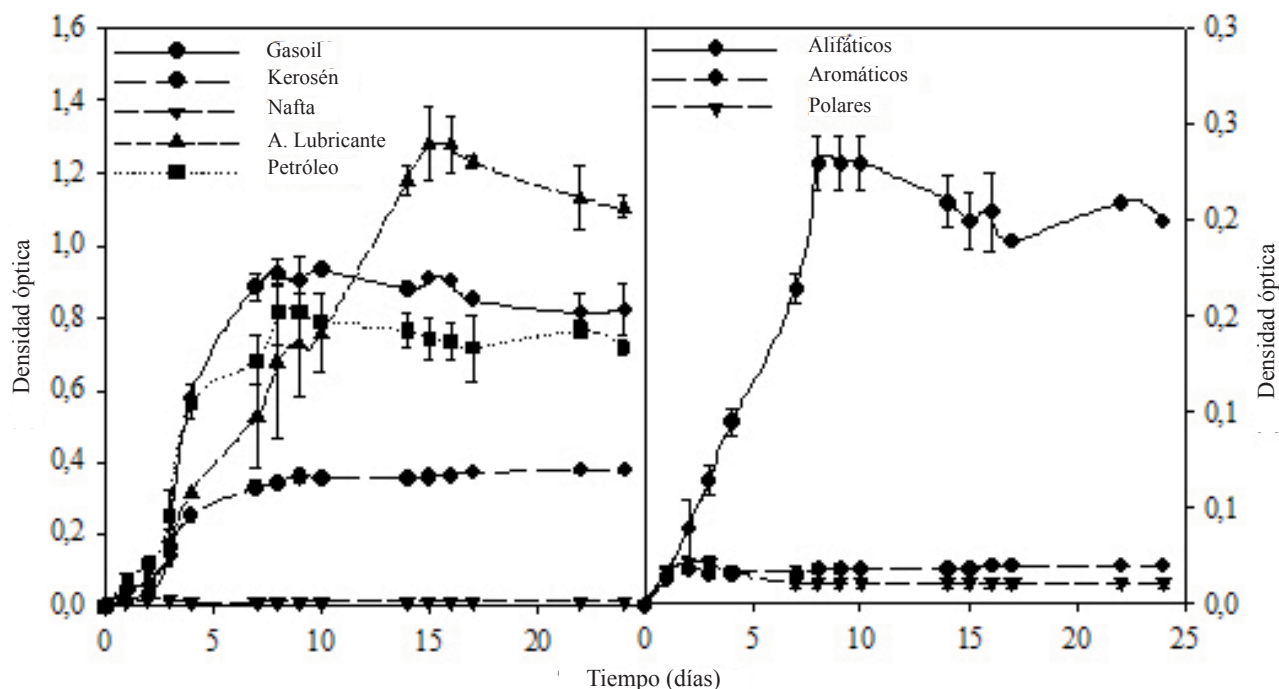


Figura 1. Curvas de crecimiento de la comunidad bacteriana extraída de suelo con diferentes hidrocarburos como única fuente de carbono y energía. Patagonia, Argentina.

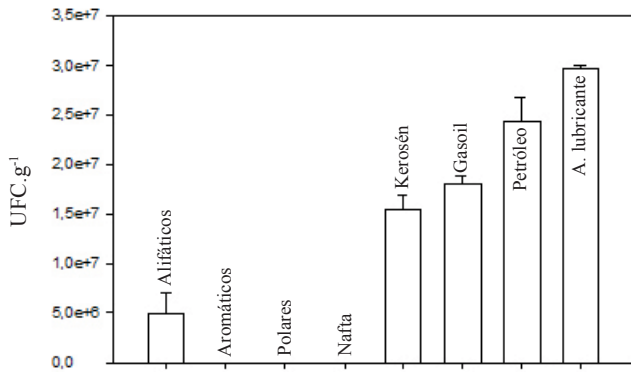


Figura 2. Recuentos de microorganismos degradadores de hidrocarburos en los sistemas líquidos, luego de finalizada la experiencia de biodegradación de hidrocarburos. Patagonia, Argentina.

Tabla 2. Identificación y veces de aislamientos de las cepas obtenidas de los hidrocarburos empleados en los ensayos de biodegradación en un suelo de la Patagonia, Argentina.

<i>Acinetobacter lwoffii</i> (3)	<i>Nocardia corynebacterioides</i> (1)
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> (6)	<i>Pantoea agglomerans</i> (1)
<i>Brevundimonas diminuta</i> (5)	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (2)
<i>Burkholderia cenocepacia</i> (1)	<i>Rhodococcus erythropolis</i> (7)
<i>Enterobacter hormaechei</i> (1)	<i>Sphingobacterium faecium</i> (1)
<i>Enterobacter intermedius</i> (3)	Cepa no identificada (10)

Los números entre paréntesis indican la cantidad de veces que se identificó el microorganismo mencionado.

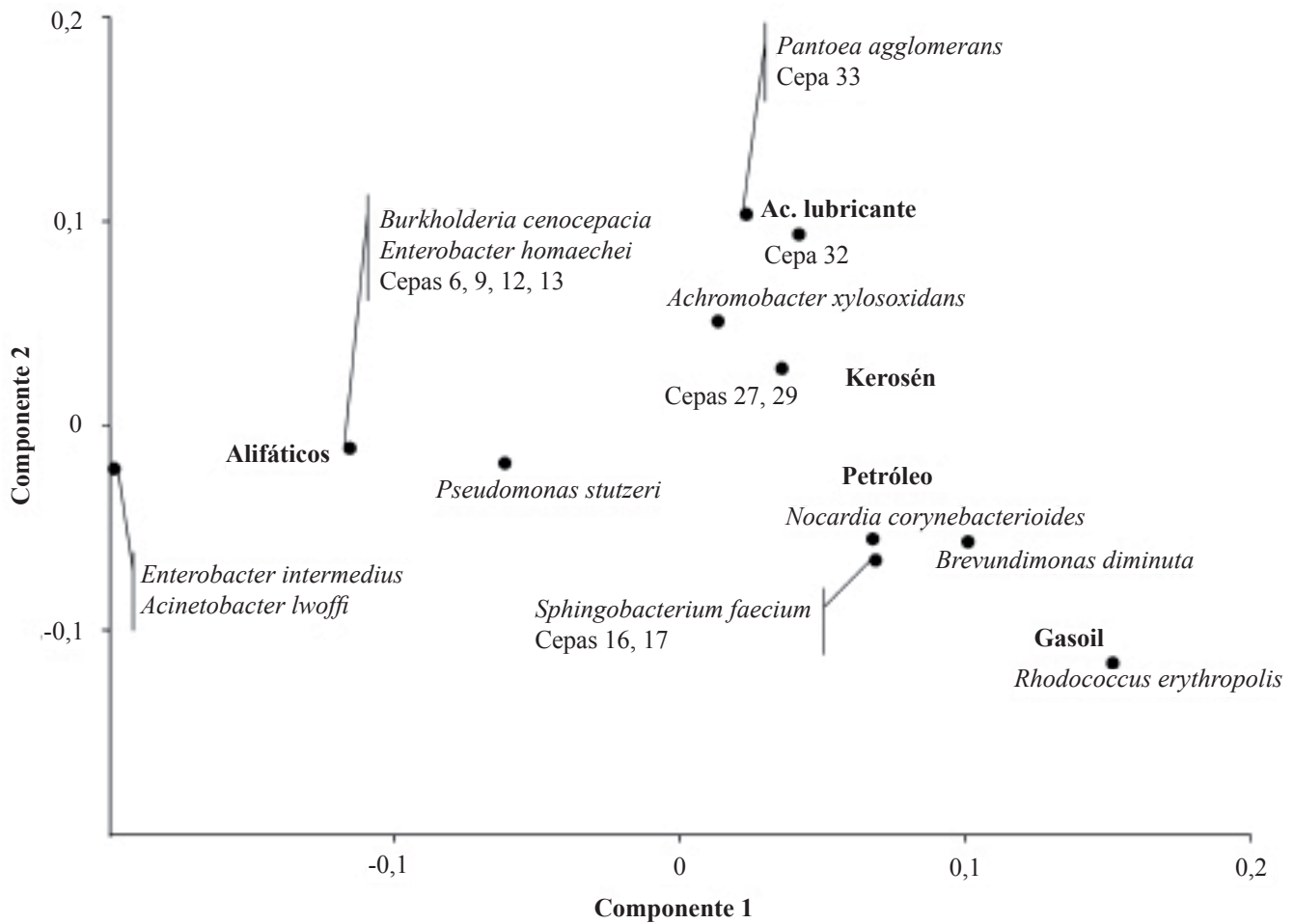


Figura 3. Análisis de componentes principales de los microorganismos identificados y las diferentes fuentes de carbono de donde fueron aislados. Patagonia, Argentina.

aceite lubricante, la comunidad bacteriana logró el mayor desarrollo, disminuyendo con gasoil, petróleo y kerosén, respectivamente. Los recuentos de BDH finales de los sistemas líquidos de crecimiento, fueron concordantes con el seguimiento por densidad óptica (Figura 2). Con las fracciones de hidrocarburos obtenidas desde el suelo, sólo se encontraron microorganismos en el sistema con hidrocarburos alifáticos. Con los destilados del petróleo utilizados, el número de BDH fue diferente según la

fFuente de carbono utilizada, resultando mayor para aceite lubricante, y descendiendo con petróleo, gasoil, kerosén, siendo igual a cero para el sistema con nafta.

Un total de 41 cepas bacterianas fueron aisladas a partir de los sistemas líquidos. Las cepas recuperadas fueron 14 a partir de hidrocarburos alifáticos como fuente de carbono, 11 a partir de gasoil, 7 a partir de kerosén y 3 de aceite lubricante y 6 de petróleo. Aproximadamente el 76% de los microorganismos fueron identificados por el sistema utilizado

(Tabla 2), observándose que los de mayor frecuencia fueron *Rhodococcus erythropolis*, *Achromobacter xylosoxidans* y *Brevundimonas diminuta*. En el análisis de componentes principales realizado, en función a los microorganismos aislados y los hidrocarburos utilizados como fuente de carbono, se observó que, con los hidrocarburos alifáticos, hubo mayor biodiversidad de microorganismos (Figura 3). Por otro lado, *Rhodococcus erythropolis* fue característico del sistema con gasoil y *Pantoea agglomerans* del sistema con aceite lubricante. Tanto el sistema con kerosén como con petróleo, se asociaron más a los géneros bacterianos *Nocardia*, *Brevundimonas* y *Sphingobacterium*.

Discusión

Para que un proceso de biodegradación de hidrocarburos sea eficiente en un suelo, es necesario conocer como son las características del hábitat microbiano. Estas están definidas por las características físicas y químicas del suelo [7]. Así, los valores de capacidad de retención de agua, porosidad y textura observados en la muestra estudiada, favorecieron el crecimiento microbiano [17]. El suelo estudiado posee una textura areno limosa al tacto con un 7% de partículas finas (limo y arcilla), y un 93% de arena, conformada principalmente por arena fina y muy fina. En esta textura se encuentran poros grandes, conformados por las partículas de arena, que permiten la buena aireación del suelo, favoreciendo el desarrollo bacteriano [18]. Asimismo, al estar la arena del suelo conformada por partículas de tamaño fino y muy fino, el tamaño de los poros es tal que favorecería la retención del agua incorporada en el suelo [12]. Por otro lado, la fracción de limo y arcilla que forma parte de este suelo, le proporciona una fracción que es capaz de retener por largos períodos el agua incorporada [19], lo que brinda a los microorganismos una humedad adecuada para el desarrollo de su metabolismo por períodos de tiempo mas prolongados. Esto también favorece el recorrido del agua dentro de la matriz del suelo con los nutrientes biodisponibles disueltos en ella, haciéndolos accesibles para los microorganismos. La baja concentración de nutrientes biodisponibles (nitrato, nitrito, amonio y fosfato) es una situación desfavorable para el proceso de biorremediación que, de acuerdo a lo expresado por Van Hamme *et al.* en 2003 [7], podría ser solucionado con un adecuado sistema de bioestimulación.

La fracción de hidrocarburos alifáticos fue degradada más fácilmente que las fracciones de hidrocarburos aromáticos y polares extraídas desde suelo. Esto es lógico debido a que, la fracción alifática, está formada principalmente por n-alcenos, hidrocarburos que son fácilmente metabolizados por los microorganismos [4]. La utilización como fuente de carbono de compuestos orgánicos se dificulta a medida que ramificaciones y anillos aromáticos se incorporan en su estructura [9]. Así, seguido a los n-alcenos, se hace más compleja la degradación de alcanos ramificados, compuestos aromáticos de bajo peso molecular y alcanos cíclicos. La fracción de hidrocarburos aromáticos del petróleo presenta

compuestos con estructuras en anillos (uno o más), o ramificaciones, haciendo aún más difícil su metabolización [9]. La fracción polar, constituida principalmente por asfaltenos, representa la fracción más recalcitrante a la biorremediación debido a la complejidad de sus moléculas, las que presentan compuestos poliaromáticos con más de tres anillos [8]. Esta composición de la fracción de hidrocarburos polares sería responsable de la falta de desarrollo de microorganismos en los tubos diseñados para estudiar su cinética de biodegradación. Si bien en la bibliografía se encuentran estudios en suelos en donde estas fracciones del petróleo son degradadas por los microorganismos [14], es posible que esta sea una propiedad de las comunidades bacterianas cuando en el ambiente en el que desarrollan se encuentran todas las fracciones del petróleo juntas [20].

Por otra parte, el perfil de biodegradación observado para los destilados del petróleo evidenció que la mayor degradación fue con aceite lubricante, seguido en orden decreciente con gasoil, petróleo, kerosén y nafta, hecho influenciado por el tipo de compuestos que constituyen a cada uno. Los aceites lubricantes y el gasoil, están constituidos principalmente por parafinas y compuestos aromáticos [5] que resultan sustratos biodisponibles y aprovechables como fuente de carbono y energía por los microorganismos. El kerosén y la nafta están constituidos por compuestos de menor peso molecular, entre ellos el hexano, benceno, tolueno, xileno y etilbenceno [8], que resultan tóxicos para la membrana bacteriana inhibiendo el crecimiento de los microorganismos [9]. Estos compuestos, los del kerosén y la nafta, serían responsables de ejercer un efecto tóxico sobre la comunidad bacteriana del suelo, inhibiendo completamente a los microorganismos en el sistema con nafta, y mostrando la cinética de crecimiento menos eficiente para el kerosén de todos los destilados del petróleo utilizados como fuente de carbono en este trabajo.

La comunidad bacteriana del suelo presentó una gran diversidad, siendo los microorganismos que se recuperaron en mayor proporción *Rhodococcus erythropolis*, *Achromobacter xylosoxidans* y *Brevundimonas diminuta*. Estos géneros bacterianos se encuentran frecuentemente en suelos [10]. Los tres géneros bacterianos han sido estudiados por sus capacidades de biodegradar hidrocarburos. El género *Rhodococcus* posee un gran potencial de biodegradación de contaminantes en el ambiente [21], siendo la especie *erythropolis*, recuperada a partir del sistema con gasoil, estudiada por su capacidad de biodegradar gasoil [22], así como también hidrocarburos n-alcenos [23] y poliaromáticos [24]. Sette *et al.* en 2006 [25] observaron que *Achromobacter xylosoxidans* posee la capacidad de utilizar los hidrocarburos como única fuente de carbono y energía, encontrándose estudios que lo involucran en la degradación de hidrocarburos poliaromáticos, como el fenantreno [8]. En este estudio, *Achromobacter xylosoxidans* fue aislado de los sistemas con hidrocarburos alifáticos, kerosén, aceite lubricante y petróleo, demostrando el gran potencial de biodegradación de hidrocarburos que posee. El tercer microorganismo más frecuentemente aislado fue *Brevundimonas diminuta*; éste

fue descrito por Tunamikina *et al.* en 2008 como degradador de hidrocarburos [26]. Antiguamente este microorganismo era denominado *Pseudomonas diminuta* y en 1994 fue asignado al género *Brevundimonas* manteniendo su nombre de especie [27] y compartiendo la gran capacidad de metabolizar diferentes sustratos con *Pseudomonas*. Esta relación metabólica estrecha entre estos géneros bacterianos, supone que *Brevundimonas diminuta* posee una gran diversidad metabólica con buena capacidad de crecimiento en presencia de hidrocarburos. Esto se observó en este trabajo con la especie *Pseudomonas stutzeri* y la actualmente denominada *Brevundimonas diminuta*, ya que fueron aisladas en los sistemas con hidrocarburos alifáticos, gasoil, kerosén y petróleo como única fuente de carbono y energía.

La mayor biodiversidad bacteriana involucrada con la degradación de hidrocarburos se observó con la fracción alifática del petróleo, siendo los microorganismos que se recuperaron en mayor proporción *Enterobacter intermedius* y *Acinetobacter lwoffii*. Ambos géneros se encuentran citados en la bibliografía como degradadores de hidrocarburos [28, 29] con capacidad de metabolizar hidrocarburos n-alcános [30] y poliaromáticos [31].

Los microorganismos identificados en este trabajo, que forman parte de la comunidad bacteriana del suelo, muestran que son capaces de biodegradar los hidrocarburos presentes en el mismo. El hecho de que aproximadamente el 50% de los hidrocarburos contaminantes de la muestra estudiada sean pertenecientes a la fracción alifática, es decir hidrocarburos biodegradables por los microorganismos del suelo, indica que una gran parte del contaminante podría ser eliminado solo aplicando al sistema una correcta bioestimulación [32]. Por otro lado, en los sistemas destinados a biorremediar hidrocarburos, es común la incorporación de estos contaminantes para ser eliminados por los microorganismos que lo constituyen [3]. Así, pueden ser incorporados diferentes destilados del petróleo, o petróleo crudo. En esta situación, la comunidad bacteriana del suelo podría eliminar eficientemente los destilados gasoil, kerosén y aceite lubricante, viéndose imposibilitada de biodegradar nafta. Sin embargo, la nafta es el destilado del petróleo, que por su composición rica en compuestos aromáticos de bajo peso molecular, es eliminada de los sistemas de remediación por simple evaporación.

Conclusiones

En el presente estudio se observó que es posible la realización de un proceso de biodegradación de hidrocarburos en la muestra de suelo estudiada. Esto se ve apoyado por las características físicas y químicas estudiadas en la muestra de suelo, así como también, por la composición de la comunidad bacteriana, que demostró capacidad de producir biomasa en presencia de petróleo, gasoil, kerosén y aceite lubricante.

Referencias

1. Acuña A, Pucci O, Pucci G. Caracterización de un proceso de biorremediación de hidrocarburos en deficiencia de nitrógeno en un suelo de la Patagonia Argentina. *Ecosistemas*. 2008; 17:85-93.
2. Johnsen A, Wick L, Harms H. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ Pollut*. 2005; 133:71-84.
3. Maila M, Cloete T. Bioremediation of petroleum hydrocarbons through landfarming: are simplicity and cost-effectiveness the only advantages? *Rev Environ Sci Biotechnol*. 2004; 3:349-60.
4. Atlas R. Bioremediation of petroleum pollutants. *Int Biodeterior Biodegradation*. 1995; 35:317-27.
5. Speight J. Composition. En: *The chemistry and technology of petroleum*. Second Edition. Marcel Dekker (Ed.). USA. 1991. pp. 209-53.
6. Bento F, Camargo F, Okeke B, Frankenberger W. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresour Technol*. 2005; 96:1049-55.
7. Van Hamme J, Singh A, Ward O. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003; 67:503-49.
8. Wang Z, Fingas M, Yang C, Christensen J. Crude oil and refined product fingerprinting: Principles. En: *Environmental forensics*. Elsevier Science (Ed.). USA. 2006. pp. 339-57.
9. Sikkema J, De Bont J, Poolman B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev*. 1995; 59:201-22.
10. Atlas R, Bartha R. Los microorganismos en sus hábitats naturales: microbiología del aire, del agua y del suelo. En: *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Ed Pearson Educación S.A. 4ta Edición. Madrid. España. 2002. pp. 329-80.
11. Garcia Trejo A. Propiedades fisicoquímicas del suelo. En: *Experimentos en microbiología del suelo*, Compañía Editorial Continental S.A. México. 1981. pp. 14-39.
12. Yolcubal I, Brusseau M, Artiola J, Wierenga P, Wilson L. Environmental physical properties and processes. En: *Environmental monitoring and characterization*. Elsevier (Ed.). U.S.A. 2004. pp. 207-39.
13. Reasoner D, Geldreich E. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microbiol*. 1985; 49:1-7.
14. Pucci G, Pucci O. Biodegradabilidad de componentes de mezclas naturales de hidrocarburos previamente sometidas a landfarming. *Rev Argent Microbiol*. 2003; 35:62-8.
15. Loffhagen N, Härtig C, Babel W. Suitability of the trans/cis ratio of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* NCTC 10936 as an indicator of the acute toxicity of chemicals. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2001; 50:65-71.
16. Pucci G, Pucci O. Cambios en los ácidos grasos de membrana de *Microbacterium esteraromaticum* GNP-5 con diferentes temperaturas y osmolaridades. *Acta Biol Colomb*. 2006; 11:61-73.
17. Leahy J, Colwell R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol Rev*. 1990; 54:305-15.
18. Voroney R. The soil habitat. En: *Soil microbiology and biochemistry*. Elsevier (Ed.). 2007pp. 25-49.
19. Coleman D, Crossley D, Hendrix P. Historical overview of soils and the fitness of the soil environment. En: *Fundamentals*

- of soil ecology. Elsevier (Ed.). 2004. pp. 1-21.
20. Díaz-Ramírez I, Escalante-Espinosa E, Favela-Torres E, Gutiérrez-Rojas M, Ramírez-Saad H. Design of bacterial defined mixed cultures for biodegradation of specific crude oil fractions, using population dynamics analysis by DGGE. *Int Biodeterior Biodegradation*. 2008; 62:21-30.
 21. Martinková L, Uhnáková B, Pátek M, Nešvera J, Křen B. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environ Int*. 2009; 35:162-77.
 22. Huang L, Ma T, Li D, Liang F, Liu R, Li G. Optimization of nutrient component for diesel oil degradation by *Rhodococcus erythropolis*. *Mar Pollut Bull*. 2008; 56:1714-8.
 23. Carvalho C, Wick L, Heipieper H. Cell wall adaptations of planktonic and biofilm *Rhodococcus erythropolis* cells to growth on C5 to C16 n-alkane hydrocarbons. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009; 82:311-20.
 24. Pizzul L, Castillo M, Stenström J. Characterization of selected actinomycetes degrading polyaromatic hydrocarbons in liquid culture and spiked soil. *World J Microbiol Biotechnol*. 2006; 22:745-52.
 25. Sette L, Simioni K, Vasconcellos S, Dussan L, Neto E, Oliveira V. Analysis of the composition of bacterial communities in oil reservoirs from a southern offshore Brazilian basin. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2007; 91:253-66.
 26. Tunamikina Y, Turkovskaya O, Ignatov V. Degradation of hydrocarbons and their derivatives by a microbial association on the base of Canadian pondweed. *Appl Biochem Microbiol*. 2008; 45:382-8.
 27. Segers P, Vancanneyt I, Pot B, Torck U, Hoste B, Dewettinck D, *et al*. Classification of *Pseudomonas diminuta* Leifson and Hugh 1954 and *Pseudomonas vesicularis* Büsing, Döll, and Freytag 1953 in *Brevundimonas* gen. nov. as *Brevundimonas diminuta* comb. nov. and *Brevundimonas vesicularis* comb. nov., respectively. *Int J Syst Bacteriol*. 1994; 44:499-510.
 28. Torres L, Rojas N, Bautista G, Iturbe R. Effect of temperature, and surfactant's HLB and dose over the TPH-diesel biodegradation process in aged soils. *Process Biochem*. 2005; 40:3296-3302.
 29. Phrommanich S, Suanjit S, Upatham S, Grams S, Kruatrachue M, Pokethitiyook P, *et al*. Quantitative detection of the oil-degrading bacterium *Acinetobacter* sp. strain MUB1 by hybridization probe based real-time PCR. *Microbiol Res*. 2009; 164:486-92.
 30. Koma D, Hasumi F, Ymamoto E, Ohta T, Chung S, Kubo M. Biodegradation of long-chain n-paraffins from waste oil of car engine by *Acinetobacter* sp. *J Biosci Bioeng*. 2001; 91:94-6.
 31. Toledo F, Calvo C, Rodelas B, González-López J. Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities. *Syst Appl Microbiol*. 2006; 29:244-52.
 32. Acuña A, Pérez Krenck J, Pucci O, Pucci G. Biodegradación de hidrocarburos. Influencia de la fertilización en el proceso de biorremediación. *Ingen San Amb*. 2007; 94:82-6.