

# Uso de un consorcio bacteriano extremo-halotolerante para la biodegradación de crudo en ambientes salinos

## Extremely-halotolerant bacterial consortium for the biodegradation of crude oil in saline environments

María Piedad Díaz<sup>\*\*\*</sup>, Steve J. W. Grigson<sup>\*\*\*</sup>, J. Grant Burgess<sup>\*\*</sup>

### RESUMEN

Se describen resultados de la aplicación de un nuevo consorcio bacteriano extremo-halotolerante para la biodegradación de crudos en medios con salinidades desde cero hasta 220 g/L, en sistemas con células libres e inmovilizadas sobre diferentes soportes. Su efectividad se incrementó cuando el consorcio se inmovilizó sobre espuma de poliuretano, fibras de polipropileno, *scourers* y Celatom, y la salinidad del medio superó los 20 g/L. Cuatro de los microorganismos que conforman el consorcio bacteriano crecieron en medios con salinidades desde cero hasta 320 g/L y se encuentran entre los de mayor halotolerancia reportados hasta la fecha.

Palabras clave: Extremófilos, salinidad, biodegradación, hidrocarburos.

### ABSTRACT

Results of the application of a novel bacterial consortium extremely-halotolerant for the biodegradation of crude oil using free and immobilized cell systems, in media with salinities ranged from zero to 220 g/L, are described. Its effectiveness increased when the cells were immobilized on polyurethane foam, polypropylene fibers, scourers and Celatom and the salinity of the culture medium surpassed 20 g/L. Four of the microorganisms belonging to the consortium grew in media with salinities varying from zero to 320 g/L and are amongst the most halotolerant microorganisms described up to now.

Key words: extreme-philic microorganisms, salinity, biodegradation, hydrocarbons.

### INTRODUCCIÓN

Uno de los mayores problemas que tiene el mundo industrializado es la contaminación de suelos, sedimentos, aguas subterráneas, aguas superficiales y aire con hidrocarburos, los cuales debido a su toxicidad son peligrosos para los ecosistemas. Un importante número de ellos se caracteriza por tener una moderada, alta o extrema salinidad, dificultando su tratamiento usando métodos convencionales de biorremediación. Altas salinidades o grandes gradientes de salinidad pueden destruir la estructura terciaria de las proteínas, desnaturalizar enzimas y deshidratar células, lo cual es letal para muchos microorganismos usados para el tratamiento de aguas y suelos contaminados (Atlas

y Bartha, 1987; Kargi y Dincer, 2000; Pollard, Hruddy y Fedorak, 1994; Woolard e Irvine, 1994). Para tratar estos residuos utilizando métodos biológicos, sin recurrir a costosos métodos de dilución, se deben usar microorganismos halófilos o halotolerantes que puedan resistir ambientes salinos.

En la literatura existen pocos estudios relacionados con el efecto de la salinidad sobre la degradación de hidrocarburos, aunque su efecto nocivo sobre la actividad microbiana ha sido discutido. Díaz *et al.* (2000) reportaron la biodegradación efectiva de crudo en medios con salinidades entre 0 y 100 g/L. Aunque la

\* Ecopetrol-Instituto Colombiano del Petróleo. AA 4185 Bucaramanga, e-mail: mdiaz@ecopetrol.com.co; Fax: 57-7-6445444

\*\* Department of Biological Sciences. Heriot-Watt University.

\*\*\* Department of Civil and Offshore Engineering. Heriot-Watt University, Edinburgh, EH14 4AS, UK.

biodegradación decreció a salinidades mayores a dos veces la salinidad del agua de mar, fue aún significativa a salinidades de 100 g/L. En otro estudio, Mille *et al.* (1991) reportaron que la cantidad de crudo degradado inicialmente se aumentó con el incremento en la concentración de sal en el medio, hasta alcanzar un nivel de 23,3 g/L de NaCl, y posteriormente disminuyó con el incremento en la concentración de sal. Un consorcio bacteriano usado por Bertrand *et al.* (1990), fue incapaz de crecer en medios con hidrocarburos a salinidades menores de 100 g/L, y otro consorcio aislado por estos mismos autores, a partir de un sedimento (Bertrand *et al.*, 1993) fue inefectivo en ausencia de sal y a concentraciones de NaCl en el medio mayores de 116 g/L.

El consorcio utilizado en este trabajo es más versátil que los reportados previamente, ya que puede degradar hidrocarburos eficientemente en ausencia de sal y a salinidades de 220 g/L o aún mayores (datos no presentados) (Díaz *et al.*, 2000).

En este estudio se presentan resultados de tolerancia del consorcio bacteriano extremo-halotolerante MPD-M al NaCl, así como el efecto de la salinidad sobre la biodegradación de crudo, en sistemas con células libres e inmovilizadas sobre diferentes sustratos.

## METODOLOGÍA

### Microorganismos

Los microorganismos que conforman el consorcio bacteriano MPD-M fueron aislados de una muestra de sedimento asociado a las raíces de manglares, los cuales están siendo usados como filtro biológico para el tratamiento de aguas de producción de petróleo en la estación "El Llanito", Santander, Colombia. Para la selección, adaptación y potencialización del consorcio se usó la técnica de salinidad incremental, la cual fue descrita previamente (Díaz, 2000; Díaz *et al.*, 2000).

El consorcio está compuesto por cinco microorganismos: cuatro gram (-) y uno gram (+). Los análisis de 16S RNA mostraron que las cinco cepas son filogenéticamente cercanas a especies del género *Marinobacter*, *Bacillus* y *Erwinia*. La secuencia de estas cepas (MR-1, MR-3, MR-4, MR-5 y MR-6) fue ingresada al GenBank y se asignaron los números de

acceso EMBL: AF264683, AF264684, AF264685, AF264686 y AF264687, respectivamente (Díaz *et al.*, 2000). El consorcio bacteriano fue rutinariamente cultivado en caldo marino 2216 (Difco, Detroit, USA) e incubado a 28°C en *shaker* rotatorio a 150 r.p.m.

### Tolerancia del consorcio al cloruro de sodio

Las cepas puras, cultivadas en caldo marino (150 r.p.m., 28°C) por 24 horas, fueron usadas como inóculo para el análisis del crecimiento microbiano en medios con amplios rangos de salinidad. El medio fue preparado con caldo Bushnell-Haas (BHB; Difco), 1 % de agar (bacteriological agar #1, Oxoid), 5 g/L de bacto peptona (Merck), 1 g/L de bacto yeast extract (Merck) y concentraciones de NaCl de 0, 20, 40, 60, 80, 100, 140, 180, 220, 260 y 320 g/L y fueron incubados a 28°C por 15 días. El crecimiento de las cepas fue medido utilizando la técnica estándar de recuento en gota (Miles y Misra, 1938).

### Crecimiento del consorcio bacteriano sobre diferentes crudos

Alícuotas del consorcio bacteriano cultivado en caldo marino, como se describió anteriormente, fueron usadas para evaluar la habilidad del consorcio para crecer sobre siete diferentes crudos del Mar del Norte (Total Alwyn, Piper, Birch, Dunbar, Cormorant y Hudson). Las cajas Petri fueron preparadas con caldo Bushnell-Haas (BHB; Difco), 1% de agar (bacteriological agar #1, Oxoid) y concentraciones de NaCl de 0, 20, 40, 60, 80, 100, 140, 180 y 220 g/L. Finalmente, 3 a 4 gotas de los crudos previamente esterilizados (aproximadamente 0.5% v/v), fueron aplicadas sobre la superficie de cada caja y usadas como única fuente de carbono y energía.

### Inmovilización de microorganismos

El consorcio microbiano fue inmovilizado por el método de absorción de acuerdo con el procedimiento descrito por Díaz (Díaz, 2000; Díaz *et al.*, 2002). Se evaluaron diez soportes: *scourers* (mezcla de fibras de poliéster y nylon), fibras de polipropileno (GAF-ASM P1P, ASM P2P), espuma de poliuretano, anillos de polipropileno (Jaeger Products, Inc., nominal size: 5/8 in, surface área: 108 ft<sup>2</sup>/ft<sup>3</sup>), Siporax (vidrio sinterizado, área específica 1 m<sup>2</sup>/g), Celatom FW-60 (Sigma-Aldrich-243337), Celite (Sigma-

Aldrich- 221791), Fuller's earth (Sigma-Aldrich-260738), carbon activado (filtrisorb 400- Calgon Corp) and Ecozorb (Eco Point U.K, mineral de aluminio- silicato).

### Análisis de hidrocarburos

Los hidrocarburos residuales fueron extraídos de acuerdo con la metodología descrita por Díaz (2000). La concentración de hidrocarburos totales y de algunos hidrocarburos aromáticos y alifáticos fue determinada por GC-MS, utilizando squalane y bromotetradecane como estándares.

### Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Muestras del consorcio inmovilizado y de la estructura del soporte (fibras de polipropileno) fueron tomadas en un microscopio electrónico (SEM) Cambridge Instrument Steroscan 240; la técnica utilizada para la preparación de las muestras fue descrita previamente (Díaz, 2000).

### Ensayos de biodegradación en sistemas libres e inmovilizados

Los experimentos se llevaron a cabo siguiendo la metodología descrita por Díaz *et al.* (2002). El consorcio inmovilizado sobre los diferentes soportes fue evaluado y comparado con el consorcio en un sistema de células libres, en las mismas condiciones experimentales. Los experimentos se llevaron a cabo usando agua de mar artificial, MASW (1,47g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,026g/L  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 0,68g/L KCl; 10 g/L  $\text{MgCl}_2$ ; 0,196 g/L  $\text{NaHCO}_3$ ; 4 g/L  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ; 0,5 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), 40 g/L de NaCl y 1% de crudo Total Alwyn. El pH del medio se ajustó a 7,8 con NaOH.

Experimentos para evaluar el efecto de la salinidad sobre la biodegradación de crudo se llevaron a cabo utilizando el mismo medio con concentraciones de NaCl de 0, 20, 40, 60, 80, 100, 140 y 180 g/L. El consorcio también fue evaluado para la biodegradación de los hidrocarburos contenidos en aguas de producción de petróleo de cuatro campos colombia-

nos con salinidades entre 3 y 100 g/L. Debido a la dificultad para obtener aguas de producción de petróleo con altas salinidades, una de las aguas de producción fue dosificada con 86 g/L de NaCl para obtener una salinidad final de 100 g/L. Para lograr condiciones experimentales similares, la concentración total inicial de hidrocarburos se ajustó a 1500 mg/L en todos los experimentos. Los frascos fueron incubados a 28°C, en *shaker* rotatorio a 150 r.p.m. por 20 días. Todos los experimentos se realizaron por duplicado y al menos en dos ocasiones diferentes.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Tolerancia del consorcio al cloruro de sodio

Resultados del crecimiento de las cepas puras que conforman el consorcio MPD-M, sobre medios con concentraciones de NaCl entre cero y 320 g/L, se presentan en la figura 1. Todas las bacterias exhibieron una extremada halotolerancia, siendo capaces de crecer en todo el rango de salinidad evaluado, con excepción de la cepa MR-1, la cual fue capaz de crecer a una salinidad máxima de 260 g/L. La *Halomona elongata* es la especie más halotolerante reportada a la fecha, creciendo bien en salinidades desde 3 hasta 320 g/L; sin embargo, cuatro de los microorganismos que conforman este consorcio son capaces de crecer en todo el rango de salinidad, constituyéndose en los de mayor halotolerancia reportados hasta hoy (Antón *et al.*, 2000; Glimour, 1990).

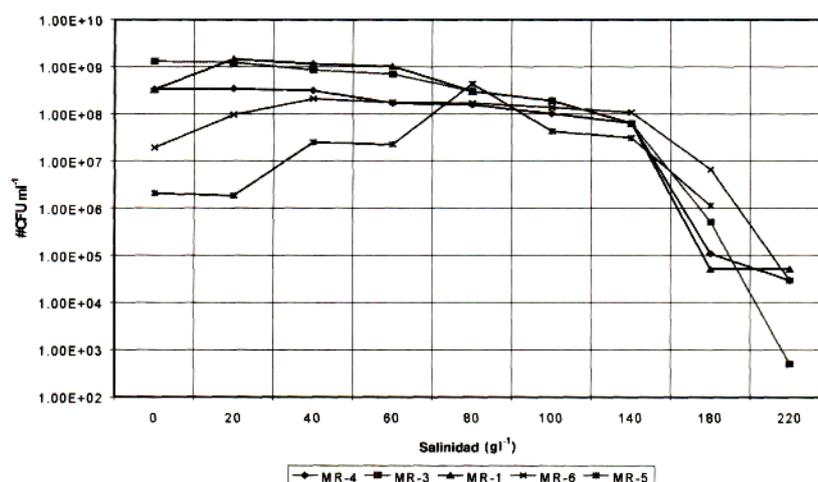


Figura 1. Tolerancia de las cepas puras que conforman el consorcio bacteriano MPD-M al NaCl.

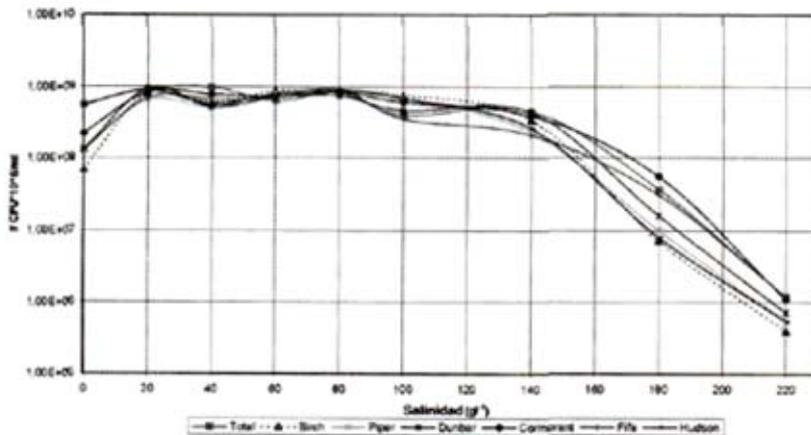


Figura 2. Efecto de la salinidad sobre el crecimiento del consorcio MPD-M sobre diferentes crudos.

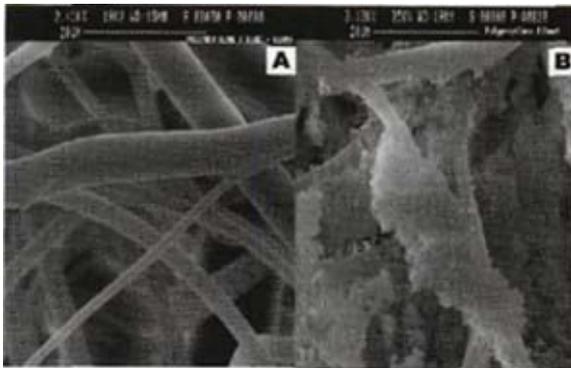


Figura 3. Microfotografías SEM. (A) Estructura de las fibras de polipropileno. (B) Consorcio MPD-M inmovilizado.

### Crecimiento del consorcio sobre crudo a diferentes salinidades

La figura 2 presenta resultados del crecimiento del consorcio MPD-M sobre siete crudos del Mar del Norte, en medios con salinidades entre cero y 220 g/L. El consorcio fue capaz de utilizar todos los crudos evaluados, como única fuente de carbono y energía, en todo el rango de salinidad estudiado. El crecimiento del consorcio en medios con salinidades hasta de 140 g/L fue excelente ( $10^8$ - $10^9$  UFC/ml). A salinidades mayores se observó una disminución gradual en el crecimiento, alcanzándose reducciones

hasta de cuatro órdenes de magnitud a la máxima salinidad evaluada ( $10^5$ - $10^6$  UFC/ml). Un aumento en la salinidad del medio incrementó el tiempo de duplicación de los microorganismos (datos no mostrados) y produjo colonias más pequeñas.

### Ensayos de biodegradación en sistemas libres e inmovilizados

La figura 3 muestra microfotografías de la estructura de uno de los soportes evaluados (fibras de polipropileno) y de la colonización del consorcio microbiano sobre este soporte.

Resultados de la biodegradación de crudo en un medio con una salinidad de 40g/L utilizando sistemas con células libres e inmovilizadas sobre diferentes soportes se presentan en la figura 4. Bajas velocidades de biodegradación de crudo se observaron cuando el consorcio MPD-M fue inmovilizado sobre anillos Jaeger, Siporax y carbón activado. Las más altas velocidades de biodegradación se obtuvieron en los sistemas que utilizaron espuma de poliuretano, fibras de polipropileno, *scoures* y

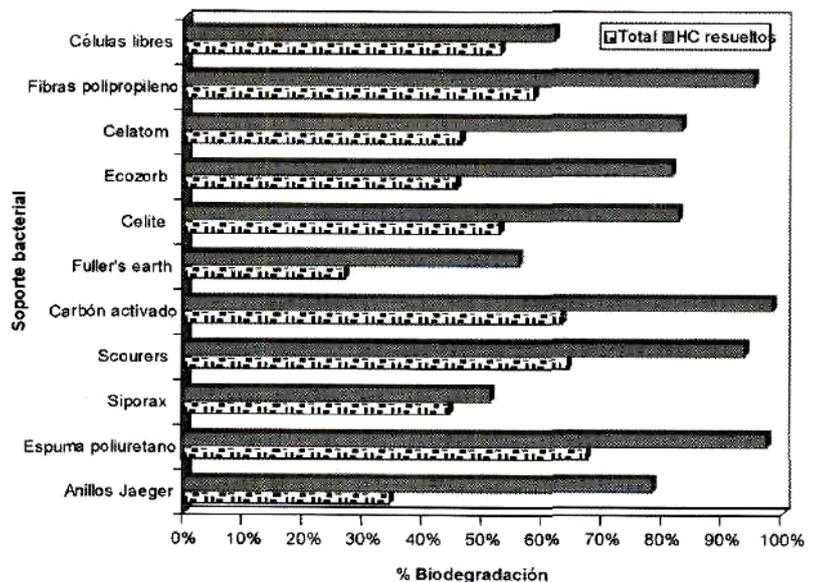


Figura 4. Biodegradación de crudo por el consorcio MPD-M inmovilizado sobre diferentes soportes.

Celatom. Incrementos en la biodegradación total del crudo de 28, 20, 22 y 11%, respectivamente, comparados con el experimento con células libres, fueron reportados. La biodegradación de los hidrocarburos resueltos analizados por GC-MS, principalmente compuestos por alcanos normales y ramificados, se incrementó en más del 50% cuando estos soportes fueron utilizados.

En la tabla 1 se muestran resultados del efecto de la salinidad sobre la biodegradación del crudo Total Alwyn en un sistema con células libres y uno con células inmovilizadas sobre fibras de polipropileno.

Los resultados indican que el consorcio inmovilizado incrementó la biodegradación total de hidrocarburos cuando la salinidad en el medio superó los 20 g/L y que este sistema fue más eficiente que el que utilizó las células en suspensión. La biodegradación total de los hidrocarburos en el sistema con células libres estuvo entre 4 y 49%. Las mayores velocidades de degradación se obtuvieron a las salinidades más bajas, 0-60 g/L, con un máximo a 20 y 40 g/L. Cuando la salinidad del medio superó los 140 g/L, se produjo una dramática reducción en la velocidad de biodegradación del crudo, alcanzando su mínimo valor a 180 g/L (4%). En los sistemas con células inmovilizadas, la biodegradación total del crudo estuvo entre 27 y 65%, y fue máxima cuando la salinidad en el medio alcanzó los 40 g/L. El consorcio bacteriano inmovilizado fue muy estable, logrando velocidades similares de biodegradación de crudo en medios con salinidades entre 0 y 140 g/L. Aun a la más alta salinidad evaluada (180 g/L), la biodegradación de hidrocarburos fue significativa (27%).

**Tabla 1. Efecto de la salinidad sobre la biodegradación de crudo por el consorcio MPD-M.**

Salinidad	Biodegradación total		Biodegradación HC resueltos	
	Inmovilizado	Libre	Inmovilizado	Libre
0	37,2%	44,3%	80,3%	61,9%
20	50,6%	49,0%	79,9%	66,4%
40	65,4%	48,9%	78,9%	65,0%
60	60,3%	40,8%	82,3%	60,4%
80	50,7%	35,8%	85,1%	55,4%
100	58,1%	31,0%	79,7%	50,2%
140	49,9%	17,9%	76,9%	23,1%
180	26,8%	4,0%	53,2%	10,0%
Agua de mar	60,3%	42,8%	80,0%	57,1%

De igual forma, la biodegradación de los hidrocarburos resueltos cuantificados por GC-MS (compuesta principalmente por alcanos normales y ramificados) fue mayor en los sistemas que usaron células inmovilizadas. La biodegradación de esta fracción del crudo en el sistema inmovilizado mostró una alta estabilidad con los cambios en la salinidad del medio, desde cero hasta 140 g/L de NaCl, alcanzando una degradación entre 75-85%. Cuando la salinidad alcanzó los 180 g/L, 53% de esta fracción fue degradada. En contraste, la velocidad de biodegradación en el sistema con células libres fue mayor a salinidades entre cero y 60 g/L, y disminuyó progresivamente con el incremento en la salinidad, alcanzando el menor valor a 180 g/L (10%). La biodegradación de crudo en agua de mar natural fue similar a la obtenida en el experimento que usó agua de mar sintética a la misma salinidad. Aparentemente, el incremento en la estabilidad de la actividad intracelular puede atribuirse al efecto protector del soporte o del biofilm contra el *stress* fisicoquímico causado por la exposición a compuestos tóxicos, como altas o variables concentraciones de sal en el medio, entre otros. Estos resultados concuerdan con los reportados por O'Reilly *et al.* (1989) para la biodegradación de pentaclorofenol (PCP) en sistemas con células libres e inmovilizadas en espuma de poliuretano. Estos autores no encontraron diferencias en la biodegradación de este compuesto a concentraciones menores de 100 mg/L; sin embargo, a concentraciones de 200 mg/L, las células inmovilizadas degradaron efectivamente el PCP, mientras que las células en suspensión se inhibieron por completo.

**Biorremediación de aguas salinas de producción de petróleo**

Para evaluar la efectividad del consorcio microbiano en la degradación de hidrocarburos en ambientes reales, se seleccionaron aguas de producción de cuatro campos colombianos con salinidades entre

**Tabla 2. Biodegradación de hidrocarburos en aguas de producción de petróleo en sistemas con células libres e inmovilizadas.**

Sistema	Salinidad del agua de producción (g/L)			
	3	26	43	100
Células libres	63,1%	21,1	17,6%	30,6
Fibras de polipropileno	61,7%	58,2%	41,6%	48,7%

3 y 100 g/L. La tabla 2 presenta resultados de biodegradación en sistemas con células libres y con el consorcio inmovilizado en fibras de polipropileno.

El uso del consorcio MPD-M inmovilizado incrementó la eficiencia de biodegradación de hidrocarburos en las aguas de producción con salinidades iguales o superiores a 26 g/L. Los mayores niveles de biodegradación se alcanzaron en aguas con salinidades bajas (3 g/L), en donde además no se observaron diferencias significativas en la degradación cuando se usaron sistemas con células libres o inmovilizadas.

## CONCLUSIONES

El uso de consorcios extremo-halotolerantes inmovilizados en soportes económicos, inertes y estables, hace posible la aplicación de procesos biotecnológicos en el tratamiento de residuos aceitosos en ambientes con amplios gradientes de salinidad: estuarios, playas, lagos salados, océanos y residuos aceitosos industriales, tales como aguas de producción de petróleo, rios de perforación y aguas residuales industriales, los cuales de otra forma serían difíciles de tratar por técnicas convencionales de biorremediación.

Este estudio reveló que el consorcio microbiano MPD-M fue efectivo para tratar hidrocarburos en ambientes con salinidades entre cero y 6 veces la salinidad del agua de mar, y que su efectividad se incrementó cuando las células fueron inmovilizadas y la salinidad del medio sobrepasó los 20 g/L. Los microorganismos que conforman el consorcio se encuentran entre los de mayor halotolerancia reportados hasta la fecha.

## AGRADECIMIENTOS

A la Empresa Colombiana de Petróleos, Ecopetrol por el apoyo financiero de esta investigación. A los profesionales del grupo de biotecnología del Instituto Colombiano del Petróleo y del grupo de Biotecnología Marina de la Universidad de Heriot-Watt por su valiosa colaboración.

## BIBLIOGRAFÍA

- Antón, J., Rosselló-Mora, R., Várela, F. R. & Amann, R. 2000. Extremely halophilic Bacteria in crystallizer ponds from solar salterns. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3052-3057.
- Atlas, L. M. & Bartha, R. 1987. *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*. CA: Benjamin/Cummings Publ. Co. Inc., Menlo Park, pp. 412-416.
- Bertrand, J. C., Almallah, M., Acqaviva, M. & Mille, G. 1990. Biodegradation of hydrocarbons by an extremely halophilic archaeobacterium. *Letters in Applied Microbiology* 11, 260-263.
- Bertrand, J. C., Bianchi, M., Mallah, M. A., Acquaviva, M. & Mille, G. 1993. Hydrocarbon biodegradation and hydrocarbonoclastic bacterial communities composition grown in seawater as a function of sodium chloride concentration. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 168, 125-138.
- Díaz, M. P. 2000. Extremely-halotolerant bacterial consortia for the biodegradation of hydrocarbons in contaminated saline environments using free and immobilised cell systems. PhD thesis, Heriot-Watt University.
- Díaz, M. R., Boyd, K. G., Grigson, S. J. W. & Burgess, J. G. 2002. Biodegradation of crude oil across a wide range of salinities by an extremely-halotolerant consortium MPD, immobilised onto polypropylene fibres. *Biotechnology and Bioengineering* 79, 145-153.
- Díaz, M. R., Grigson, S. J. W., Peppiatt, C. & Grant, B. 2000. Isolation and characterisation of novel hydrocarbon degrading euryhaline consortia from crude oil and mangrove sediments. *Marine Biotechnology* 2, 522-532.
- Glimour, D. 1990. Halotolerant and halophilic microorganisms. In *Microbiology of Extreme Environments*. *Environmental Biotechnology* (ed. C. Edwards), McGraw-Hill, Great Britain, p. 218.
- Kargi, F. & Dincer, A. R. 2000. Use of halophilic bacteria in biological treatment of saline wastewater by fed-batch operation. *Water Environment Research* 72, 170-174.

- Miles, A. A. & Misra, S. S. 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *Journal of Hygiene* 38, 732-749.
- Mille, G., Almallah, M., Bianchi, M., Van Wambeke, F. & Bertrand, J. C. 1991. Effect of salinity on petroleum biodegradation. *Fresenius J. Ana. Chem.* 339, 788-791.
- O'Reilly, K. T. & Crawford, R. L. 1989. Degradation of pentachlorophenol by polyurethane-immobilized *Flavobacterium* cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 55, 2113-2118.
- Pollard, S. J. T., Hrudey, S. E. & Fedorak, P. M. 1994. Bioremediation of petroleum and creosote-contaminated soils: A review of constraints. *Waste Management & Research* 12, 173-194.
- Woolard, C. R. & Irvine, R. L. 1994. Biológica! treatment of hypersaline wastewater by a biofilm of halophilic bacteria. *Water Environment Research*. 66, 230-235.