

APLICACIÓN DE FILOSILICATOS Y BACTERIAS EN AGUAS Y SUELOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBUROS

Bravo B.*

Email: edu80@uio.satnet.net

Sinche G.*

Email: gasylsa@hotmail.com

Universidad Central del Ecuador. Facultad de Ing. en Geología, Minas, Petróleos y Ambiental
Unidad de Investigación y Desarrollo Tecnológico (UIDT) Petroecuador.

Este estudio es parte del proyecto: “**Aplicación de filosilicatos y bacterias en aguas y suelos contaminados por hidrocarburos**” que, en un convenio de cooperación científica, lo realizan las Facultades de Ingeniería en Geología, Minas y Petróleos y la Empresa Estatal de Petróleos del Ecuador (PETROECUADOR) a través de la Unidad de Investigación y Desarrollo Tecnológico (UIDT) y de su filial Petroproducción.

RESUMEN

Se realizó el aislamiento de bacterias degradadoras a partir de 25 muestras de agua y 8 muestras de suelo de la Región amazónica de los sitios aledaños a los pozos; Charapa, Shuara, Shushuqui y Secoya. Utilizando métodos de enriquecimiento se aisló, purificó y congeló por duplicado 300 cepas de bacterias degradadoras de fracciones de hidrocarburos aromático, cíclico y alifático.

Se determinó la eficiencia de biodegradación selectiva de fracciones de hidrocarburo. Se probó la eficiencia de degradación de estas cepas contra benceno, tolueno, ciclohexano, quinolina, hexano y heptano se determinó 68 cepas que degradan fracciones de hidrocarburo aromático y 82 cepas, hidrocarburos alifáticos. Los resultados de este ensayo permitieron seleccionar 64 cepas de bacterias de eficiencia degradadora múltiple.

Se identificaron 50 biotipos biodegradadoras a nivel de género y algunas de especie.

Se estudió la versatilidad adaptativa y de tolerancia en medios sólidos y líquidos enriquecidos con 1% de petróleo como fuente energética, de las 64 cepas seleccionadas. Esta fase permitió seleccionar 5 cepas de bacterias autóctonas del género *Bacillus* y *Pseudomona* que presentaron mejores velocidades de crecimiento, adaptación y tolerancia al 1% de crudo, estas bacterias fueron probadas en sus rendimientos biomasa/sustrato.

Se diseñó el medio de cultivo utilizando el diseño factorial completo y con reactivos para análisis considerando requerimientos energéticos, nutritivos y relación carbono, nitrógeno y el mayor rendimiento biomasa/sustrato (Y_{xs}). Los resultados de los rendimientos son los siguientes: Bacteria Q16a1 con un $Y_{xs/s} = 0.32$ en 6 horas; Bacteria 9d con un $Y_{xs/s} = 0.31$ en 3 horas; Bacteria 10c con un $Y_{xs/s} = 0.40$ en 8 horas y Bacteria 10d con un $Y_{xs/s} = 0.22$ en 6 horas. La cepa Q16a1 fue la mejor cepa, en función de degradación, selección, adaptabilidad y de mejores rendimientos.

Se estudió la sustitución de algunos componentes del medio de cultivo empleados como reactivos químicos puros, a escala de laboratorio por variantes comerciales de bajo costo, aplicables a la producción en gran escala y se obtuvo el diseño y la formulación del medio de cultivo que permitió crecer a la mejor cepa bajo las condiciones de menor costo, menor tiempo y mas rendimiento de biomasa.

La escalada de la producción de biomasa se prueba en cultivo batch en pulmones bioreactores con capacidad e 20 litros. Se procede a descontaminar 50 metros cúbicos de suelo contaminado con hidrocarburo utilizando 960 litros de biomasa de bacterias del género *Bacillus* aplicando la metodología diseñada para el efecto en un tiempo record de 45 días.

Palabras claves: [Biodegradación], [Amazonía], [Biomasa], [Aguas], [Suelos]

*Institución de Trabajo: Universidad Central del Ecuador. Facultad de Ing. en Geología, Minas, Petróleos y Ambiental.

SUMMARY

It was carried out the isolation of bacteria degrader starting from 25 samples of water and 8 samples of soil of the Amazon Region from the places bordering to the wells; Charapa, Shuara, Shushuqui and Secoya. Using enrichment methods was isolated, it purified and I freeze for copy 300 stumps of degrader bacteria of aromatic, cyclic and aliphatic fractions of hydrocarbons.

The efficiency of selective biodegradation of hydrocarbon fractions was determined. The efficiency of degradation of these stumps was proven against benzene, toluene, cyclohexane, quinoline, hexane and heptane were determined 68 stumps that degrade fractions of aromatic hydrocarbon and 82 stumps, aliphatic hydrocarbons. The results of this rehearsal allowed selecting 64 stumps of bacteria of multiple degrader efficiency.

It was identified 50 biotypes of biodegrader at gender level and some of species.

The adaptation capacity and of tolerance was studied in solid and liquids media enriched with 1% of petroleum like energy source, of the 64 selected stumps. This phase allowed to select 5 stumps of autochthonous bacteria of the gender *Bacillus* and *Pseudomona* that presented better speeds of growth, adaptation and tolerance to 1% of petroleum, these bacteria they were proven in its yields biomasa/sustrato.

The culture media was designed using the factorial experiments and with reagents for analysis considering energy, nutritious requirements and relationship carbon, nitrogen and the biggest yield biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$). The results of the yields are the following ones: Bacteria Q16a1 with a $Y_{x/s} = 0.32$ in 6 hours; Bacteria B9d with a $Y_{x/s} = 0.31$ in 3 hours; Bacteria T10c with a $Y_{x/s} = 0.40$ in 8 hours and Bacteria B10d with a $Y_{x/s} = 0.22$ in 6 hours. The stump Q16a1 was the best stump, in degradation function, selection, adaptability and of better yields.

The substitution of some components of the means of cultivation employees was studied as pure chemical reagents, to laboratory scale for commercial variants of low cost, applicable to the production in great scale and it was obtained the design and the formulation of the means of cultivation that it allowed to grow to the best stump under the conditions of smaller cost, smaller time and but yield of biomass.

The escalate of the production of biomass is proven in cultivation batch in lungs bioreactors with capacity and 20 liters. You proceeds to treat 50 cubic meters of polluted floor with hydrocarbon using 960 liters of culture media for biomass production of bacteria of the gender *Bacillus* applying the methodology designed at one time for the effect record of 45 days.

Key words: [Biodegradation], [Amazon Region], [Biomass], [water], [soil]

INTRODUCCION

La industria hidrocarburifera genera, en sus diferentes etapas, una serie de impactos ambientales que pueden afectar de distinto modo al entorno social y natural. En el caso del Ecuador, los problemas ambientales derivados de esta actividad son múltiples y complejos; entre ellos destacan los producidos por derrames de crudo en aguas superficiales y en suelos y por la presencia de "piscinas" en las que se han depositado indiscriminadamente crudo, aguas de formación y fluidos de perforación.

La Empresa estatal PETROECUADOR, que en la actualidad explota la mayor parte de los campos productivos, ha adoptado una serie de políticas destinadas a prevenir tales problemas y a mitigar sus efectos. Para el caso de limpieza de crudo en ríos, esteros, piscinas y suelos se han utilizado una variedad de técnicas y procedimientos, con resultados más o menos óptimos.

Actualmente se privilegia el tratamiento con microorganismos degradadores de petróleo pues se considera que la biodegradación microbiana es el mecanismo más adecuado para la eliminación de hidrocarburos del petróleo y que las bacterias, al igual que los hongos, son las principales protagonistas de este proceso natural que se desarrolla en suelos y aguas.

Varias empresas de servicios ambientales comercializan en el país productos con formulación bioactiva para la degradación de hidrocarburos. Sin embargo, el desconocimiento del origen y el tipo

de microorganismos utilizados conlleva el peligro potencial de desequilibrios poblacionales por la invasión de la comunidad microbiana autóctona por poblaciones alóctonas extrañas. Por tal razón se considera conveniente el uso de microorganismos de la comunidad propia de la región para los procesos de biodegradación, ya que las interacciones dinámicas entre la población microbiana y su ambiente abiótico contribuyen al mantenimiento de ecosistemas integrados por diferentes hábitat, fomentan su productividad y mantienen la calidad ambiental.

En este contexto con el objeto de generar procesos tecnológicos limpios se estructuró el proyecto: “Aplicación de filosilicatos y bacterias en aguas y suelos contaminados por hidrocarburos” que, en un convenio de cooperación científica, lo realizan las Facultades de Ingeniería en Geología, Minas y Petróleos y la Empresa Estatal de Petróleos del Ecuador (PETROECUADOR) a través de la Unidad de Investigación y Desarrollo Tecnológico (UIDT) y de su filial Petroproducción.

Los objetivos de la presente investigación se centran en aislar, seleccionar, adaptar bacterias autóctonas degradadoras de petróleo y propagarlas en plan piloto en laboratorio y en el campo para descontaminar suelos con hidrocarburo.

Los resultados obtenidos son promisorios se cuenta con una colección de 300 bacterias degradadoras, con la selección de cepas específicas para el biotratamiento y el medio de cultivo y el procedimiento optimizado para la producción de biomasa y para la biodegradación en unidades de experimentación. Se recomienda la investigación correspondiente a la etapa de producción industrial de biomasa.

MARCO METODOLOGICO:

ASLAMIENTO

Se usaron métodos de enriquecimiento con medios de cultivo mineral líquido con fuentes de carbono: benceno, tolueno, ciclohexano, xileno y quinolina. Las fracciones de hidrocarburos alifáticos se añadieron en concentraciones de 5000 ppm; aromáticos 100 ppm; el tolueno se añadió en concentración de 50 ppm. La incubación fue a 30 ° C de 6 a 9 días. El método de aislamiento se realizó por estría en placa (por triplicado), La identificación fue por caracterización morfológica y bioquímica usando pruebas primarias, secundarias: Gram, catalasa; oxidasa; OF; fermentación de glucosa, crecimiento en aerobiosis y movilidad. La clasificación taxonómica se determinó utilizando el Manual de Determinación Bacteriológica de Bergey.

SELECCIÓN

Se fundamentó en la eficiencia biodegradadora de varias fracciones de hidrocarburos alifáticos, aromáticos y cíclicos que presentaron las bacterias aisladas.

ADAPTACION

Se realizó a través de pruebas sucesivas de crecimiento poblacional en cultivos ricos en petróleo. Se estudió la versatilidad adaptativa y tolerancia de las cepas eficientes en base a la asimilación del 1% de petróleo como fuente energética en medios minerales líquidos y sólidos.

Siembra en medio sólido

Las bacterias seleccionadas se sembraron por triplicado, por el método de siembra por estría en placa, en medio mineral sólido. El petróleo crudo se impregnó en un cuadro de papel filtro No. 42 y se adhirió en el interior de la tapa de la caja Petri. Los cultivos se incubaron durante seis días a 30 °C en incubadora.

Siembra en medio líquido

Se sembraron (por triplicado) las bacterias que crecieron en medio sólido, en concentración de 10^{-1} , en medio de cultivo mineral líquido con 1% de petróleo como fuente de carbono. Los cultivos se incubaron a 30 °C durante 15 días.

La cuantificación de las poblaciones bacterianas se realizó por turbidimetría, se tomó de referencia la escala de turbidez de McFarland con 1% de petróleo. Las observaciones se realizaron a 0, 8 y 15 días.

Cinética de crecimiento

Las bacterias que crecieron en medios sólidos y líquidos con petróleo crudo fueron sometidas al estudio de la cinética microbiana por el método de cultivo enriquecido con tiempos de incubación a 28 °C por 12 días (288 h, tiempo de adaptación de las bacterias al crecimiento en sustrato enriquecido con petróleo). Las evaluaciones del crecimiento se realizaron a 0, 3, 6, 9 y 12 días y se utilizó el método de conteo de células viables por siembra por vertido (siembra por triplicado), se adhirió el papel filtro impregnado con petróleo en la pared interior de la tapa de la caja Petri. Las cajas se invirtieron y se incubaron a 30 °C.

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Los factores y los niveles se agruparon en los diseños factoriales siguientes: a) para las bacterias en la primera selección se utilizó un 68 cepas degradadoras de aromáticos x 2 con dos repeticiones (68 aislados y dos niveles de petróleo: 0 y 1%) y 57 cepas degradadoras de alifáticos X 2 con dos repeticiones; en la segunda selección 64 cepas x 2 con dos repeticiones (64 aislados y dos niveles de petróleo: 0 y 1%), en la tercera selección 48 cepas seleccionadas x 2 con dos repeticiones (48 aislados y dos niveles de petróleo: 0 y 1%).

DISEÑO, FORMULACION Y OPTIMIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO

El diseño del medio de cultivo para la propagación de los géneros: *Bacillus*, se basó en su composición celular y la estequiometría del proceso fermentativo (biomasa), debió satisfacer las demandas metabólicas, y nutritivas. Se consideró el costo y disponibilidad de los ingredientes y se probó ingredientes grado reactivo y luego grado comercial. El medio de cultivo formulado incluye una base minimal (Stanier, 1985), y fuentes de carbono: glucosa en concentraciones del 0.17% al 0.68%; extracto de levadura del 0.1% y la fuente de amonio entre el 0.05 y el 0.15 %.

Para optimizar la formulación se determinó la biomasa por el método de peso seco (Sragg, 1997), en función de rendimientos sustratos/producto utilizando un experimento factorial 3 x 4 combinando 3 niveles o concentraciones de la fuente de Carbono (glucosa) con 4 de la fuente de Nitrógeno (sal de amonio) dando un total de 12 formulaciones. Las concentraciones mínimas y máximas fueron determinadas en base a publicaciones científicas (Stanier, 1985; Seok, *et al.* 2001; Atkinson, B. y Mavituna, F., 1991.)

Los experimentos factoriales (Vallejo, F., *et al.* 1999; Anderson, R. y Jayaraman, K., 2003) y se dispusieron en un diseño de bloques completamente al azar y luego se determinó si los tratamientos eran diferentes estadísticamente para analizarlos mediante la Prueba de significación de rangos múltiples de Duncan al 1%. La variable dependiente fue el rendimiento calculado $Y_{x/s}$, y las variables independientes, las concentraciones de las fuentes de carbono y nitrógeno.

El experimento utilizó el medio inoculado en erlenmeyers colocados en zaranda orbital (New Brunswick C-25), a 300 rpm a 30° C o a 25° C, y por un espacio de tiempo de hasta 7 o 9 horas. Se siguió la metodología de Bernard Atkinson y Ferda Mavituna (1991). Para el cultivo discontinuo en el biotanco manual (de capacidad máxima de 20 litros), el método fue similar. La concentración de oxígeno fue de 20 litros /minuto, determinada en pruebas variando las concentraciones de oxígeno y determinando el peso seco de biomasa.

BIODEGRADACION EN LAS UNIDADES EXPERIMENTALES

En las cuatro unidades experimentales se determinó una línea base del número de bacterias degradadoras por gramo de suelo, el número de bacterias heterótrofas /g de suelo y el número de bacilos /g de suelo.

En forma periódica se controló estas poblaciones bacterianas posterior a la bioaumentación y siguiendo la metodología de la medida de poblaciones bacterianas por conteo viable por vertido.

A las 6 horas de incubación, la suspensión bacteriana es depositada en cada una de las unidades de experimentación en un volumen de 120 litros / cada unidad.

RESULTADOS Y DISCUSION:

ETAPA 1. AISLAMIENTO, SELECCIÓN Y ADAPTACION

AISLAMIENTO

Se aislaron 300 cepas de bacterias degradadoras de fracciones de hidrocarburos aromático, cíclico y alifático.

SELECCIÓN EN BASE A LA EFICIENCIA BIODEGRADADORA

Se seleccionaron las bacterias por su eficiencia biodegradadora de fracciones de hidrocarburos y se obtuvieron 68 cepas que degradan fracciones de hidrocarburo aromático y 82 cepas que degradan hidrocarburos alifáticos.

IDENTIFICACION:

Se identificaron 50 biotipos biodegradados seleccionados, eficientes y adaptados a nivel de género y algunas de especie.

ADAPTACION:

Siembra en medio sólido

Se seleccionaron 64 cepas bacterianas que crecieron sobre el medio de cultivo sólido.

Siembra en medio líquido

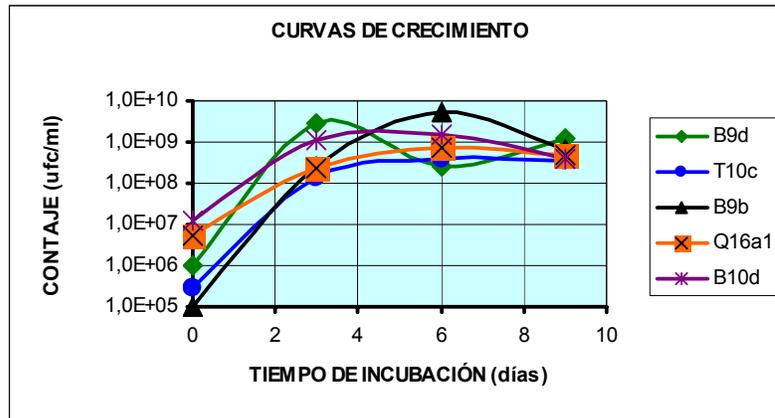
Se seleccionaron 49 cepas bacterianas que presentaron el mejor crecimiento en caldo mineral con 1% de crudo.

CINÉTICA DE CRECIMIENTO:

Tabla 2. Identificación de las 5 mejores bacterias biodegradadas

Código	Identificación
B9d	<i>Bacillus pumilus</i>
B10d	<i>Bacillus cereus var. mycoides</i>
Q16a1	<i>Bacillus cereus</i>
T10c	<i>Bacillus cereus</i>
B9b	<i>Pseudomona spp.</i>

Figura 1. Resultados de la cinética bacteriana de las 5 mejores bacterias biodegradadas



Los resultados de la cinética bacteriana de esta fase permitieron seleccionar 5 cepas de bacterias autóctonas aerobias del género *Bacillus* y *Pseudomona* (Tabla 2.) que presentaron mejores velocidades de crecimiento y adaptación, y tolerancia al 1% de crudo (Figura 1.), posteriormente estas bacterias fueron probadas en sus rendimientos biomasa/sustrato.

ETAPA 2. DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO Y CINETICA

En la optimización se consideró el rendimiento celular ($Y_{x/s}$), con los siguientes resultados:

Figura 2. Comparación de curvas de Factores de rendimientos vs. Tiempo de incubación para 3 mejores cepas biodegradadoras

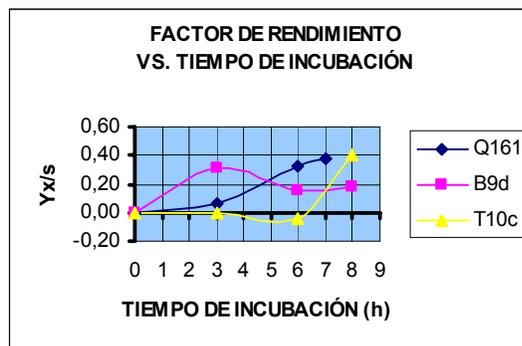


Figura 3. Comparación de curvas de Concentración de biomasa vs. Tiempo de incubación para 3 mejores cepas biodegradotas

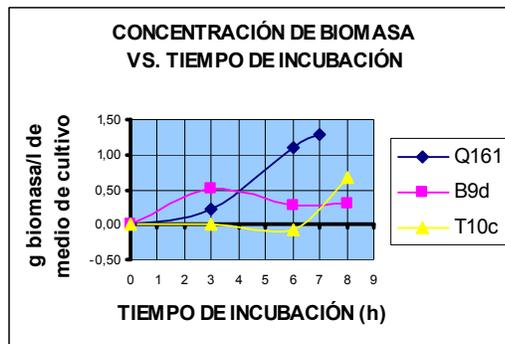


Tabla 3. Rendimientos de biomasa observados para las 4 cepas bacterianas biodegradadoras

▪ Q16a el mejor medio de cultivo fue el 6 con un $Y_{x/s} = 0.32$ en 6 horas
▪ B9d el mejor medio de cultivo fue el 1 con un $Y_{x/s} = 0.31$ en 3 horas
▪ T10c el mejor medio de cultivo fue el 2 con un $Y_{x/s} = 0.40$ en 8 horas

De todas las cepas seleccionadas la Q16a que corresponde al género *Bacillus*, fue la que mayor producción de biomasa y rendimiento proporcionó (0.32) y en el menor tiempo como se observa en las Figuras 2 y 3; por esta razón, se decidió utilizarla en la producción bacteriana. Los tiempos de mayor producción de biomasa óptimos fueron de 6 horas en condiciones óptimas de fermentación.

CONCLUSIONES

- Las 300 bacterias biodegradadoras aisladas y seleccionadas constituyen una colección de cepas de interés en biotecnología ambiental.
- El proceso de selección y adaptación de cepas autóctonas garantizó la bioaumentación como tecnología de limpieza ambiental en tierras contaminadas con petróleo.
- La cepa de *Bacillus cereus* es la que mejor rendimiento de biomasa produce en las mejores condiciones de cultivo.
- La formulación del medio de cultivo se fundamentó en la capacidad del *Bacillus spp.* y para producir biomasa por la vía la metabólica de respiración.
- Respecto a las formulaciones del medio de cultivo, el análisis de varianza muestra una diferencia significativa al 1% entre tratamientos (formulaciones) y entre concentraciones del monosacárido y de la sal de amonio, incluso se observa una interacción de las dos fuentes en estudio. No hay diferencia significativa entre las repeticiones. La prueba de Duncan al 1% establece seis categorías de formulaciones de las cuales el medio 1,0M-0,4N-0,3E presenta el mejor rango (categoría A), por tanto, ésta fue la formulación preliminar de mayor eficacia.
- Las mejores formulaciones muestran en los gráficos correspondientes la mayor producción de biomasa, en menor tiempo y con los mejores rendimientos.
- Para optimizar el medio de cultivo se hicieron necesarias 73 formulaciones, el MEDIO OPTIMIZADO FINAL, para la cepa de *Bacillus* correspondió a la formulación: 1,0 glucosa, 0,4 sal de amonio 0,9 extracto de levadura con un $Y_{x/s}$ práctico de 0,47, cuyo rendimiento de biomasa a pequeña escala fue de 94% del valor teórico y en el bioreactor (manual) fue de 60%. Es un medio de bajo costo.
- Las mejores formulaciones del medio de cultivo presentan las relaciones prácticas de las fuentes de carbono – nitrógeno similares a la relación teórica de las fuentes Carbono / nitrógeno.
- La cinética microbiana permitió definir la mejor curva de crecimiento considerando La fase de adaptación más corta y el factor de rendimiento más alto en el menor tiempo posible.

- Las bacterias biodegradadoras, autóctonas, aisladas, seleccionadas, adaptadas y propagadas permitieron un proceso de direccionamiento de la flora biótica del suelo en el proceso de bioaumentación para degradación de suelos contaminados con Hidrocarburo.
- La producción de 980 litros de medio de cultivo conteniendo biomasa microbiana del género *Bacillus*, biodegradó 50 metros cúbicos de tierras contaminadas con hidrocarburo en un tiempo record de 45 días.

BIBLIOGRAFIA

Anderson, R. y Jayaraman, K. (2003). Artículo: Influence of Carbon and Nitrogen Sources on the Growth and Sporulation of *Bacillus thuringiensis* var. *Galleriae* for biopesticide production. Centre for Biotechnology. Anna University. India.

Atkinson, B. y Mavituna, F. (1991). Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook. 2nd edition. Stockton Press-Macmillan Publishers Ltd.. México.

Bu'lock, J. Y Kristiansen, B. (1991). Biotecnología básica. Versión traducida del inglés. Ed. Acribia. Zaragoza – España.

Crueger, W. y Crueger, A. (1993). Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España. p.p. 90, 384-385, 753.

Doran, Pauline (1998). Principios de ingeniería de los bioprocesos, Versión traducida del inglés. Ed. Acribia. Zaragoza. España. p.p. 468, 53-83.

Ercoli, E., *et al.* (2000). Experiencia piloto para el tratamiento biológico de suelos y lodos empetroados en Yacimiento Río Grande. Repsol YPF Bolivia. Universidad Nacional de Cuyo. Argentina.

Ercoli, E. *et al.* (1995). Tratamiento intensivo de suelos biorremediados en reactor Airlift. Universidad Nacional de Cuyo. Argentina. UFZ - Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GMBH. Alemania.

Ertola, Rodolfo, *et al.* (1994). Microbiología Industrial. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico de la Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. p.p. 13-25, 31-37, 43-53.

Lopolito M., *et al.* (1992). Biodegradación de hidrocarburos de petróleo y compuestos relacionados. Instituto Nacional de Ciencia y Técnica Hídricas. Universidad Tecnológica Nacional. Buenos Aires-Argentina.

Scragg, Alan (1997). Biotecnología para Ingenieros. Versión autorizada en español de la obra publicada en inglés. Primera reimpression. Editorial Limusa. México. p.p. 45-73, 191-211, 263-272.

Seok, Jeok, *et al.* (2001). Artículo: Importance of specific growth rate for subtilisin expression in fed-batch cultivation of *Bacillus subtilis spoIIIG* mutant, Seoul National University, Korea.

Rivera, M., *et al.* (2002). Adaptación y Selección de microorganismo autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo. Campus Tabasco-Colegio de Postgraduados. Instituto de Recursos Naturales. Instituto Politécnico Nacional. Instituto Mexicano del Petróleo. México D.F.

Trevan, M. D. y Goulding, K (1990). Biotecnología: Principios biológicos. Versión traducida. Editorial Acribia. España. p.p. 69-105

Vallejo, F., *et al.* (1999). Artículo: Production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* by batch and fed-batch cultura. Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Medellin- Colombia.

Wang, J. Y Wang, H. (2001). Artículo: Fermentation Products and Carbon Balance of spoilage *Bacillus cereus*. Journal of food and Drug Analysis. Vol. 10. N°1.