

IDENTIFICACIÓN Y CAPACIDAD DEGRADORA DE BACTERIAS AISLADAS DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS DE DESECHOS, PANAMÁ.

IDENTIFICATION AND DEGRADING CAPACITY OF ISOLATED BACTERIA FROM SOILS CONTAMINATED WITH WASTE HYDROCARBONS, PANAMA

José Him Fábrega¹, Ilka Ábrego², Marleny Aldrete²

¹ Universidad de Panamá. Centro Regional Universitario de Veraguas, Universidad de Panamá.

² Profesor en el Ministerio de Educación, Panamá

e-mail: jose.him@up.ac.pa, ilkaabrego@hotmail.com, malyal-18@hotmail.com

RESUMEN

Se escogieron talleres de mecánica de autos de la región que tenían suelos contaminados con aceites usados. De las muestras de suelos se aislaron cepas bacterianas en medios de cultivo, las cuales fueron analizadas para determinar su sobrevivencia y actividad degradadora en aceites usados. Para el análisis se sembraron las bacterias aisladas en recipientes de vidrio estériles con caldo nutritivo, sobre lo cual se colocó una pequeña cantidad de aceite usado y este sistema se incubó a temperatura ambiente (25–32 °C) hasta observar degradación del aceite en la superficie. Se observaron cambios en varios de los recipientes que se dejaron hasta por dos meses en estas condiciones. Para tratar de identificar las cepas que dieron resultados positivos, se emplearon las pruebas de tinción de Gram, tinción de esporas y la prueba de catalasa. Los resultados mostraron bacilos Gram positivos, tinción de esporas resultó negativa, crecimiento aerobio y catalasa positiva. Según los resultados obtenidos, en los tres talleres se obtuvieron bacteria con características similares. Estas bacterias podrían ser útiles en procesos de biodegradación de ambientes contaminados con estos químicos.

PALABRAS CLAVE: Bacterias, suelos, aceites usados, biodegradación.

ABSTRACT

Three auto repair shops that had contaminated soil, because of the waste oil, were chosen in the region. Of soil samples were isolated bacterial strains in culture media, that were analyzed to determine their survival and degrading activity in oils. For the analysis, isolated bacteria with broth nutrient were planted in sterile glass containers and a small amount of waste oil was placed all over the samples. This system was incubated at room temperature (25-32 °C), until that the degradation of the oil in the surface was observed. In several of the vessels, which were left for up to two months at this condition, changes were observed. To try to identify strains that were positive, evidence of Gram staining, spores staining, and catalase test, were used. The results showed Gram-positive bacilli, spore staining was negative, aerobic growth and catalase positive. According to the results, in the three workshops, bacteria were obtained with similar characteristics. These bacteria may be useful in the biodegradation processes of contaminated environments with these chemicals.

KEY WORDS: Bacteria, soils, used oils, biodegradation.

Artículo recibido: 14 de abril de 2019

Artículo aceptado: 9 de septiembre de 2019

INTRODUCCIÓN

Uno de los mayores problemas ambientales de contaminación es la causada por hidrocarburos resultantes de la industria petroquímica. Uno de esos problemas es el vertido de aceites automotrices en suelos. Existen intentos por lograr la recuperación de esos suelos por biorremediación (Barrios Ziolo, Robayo Gómez, Prieto Cadavid, & Cardona Gallo, 2015; Dos Santos Alves, R.; Soares de Souza, A., 2014; Covarrubias et al., 2015; Lorenzetti et al., 2012; Maroto y Rogel, 2004; Volke, 2012).

Una revisión de las tecnologías utilizadas para el tratamiento de suelos contaminados, las clasifica en biológicas, fisicoquímicas y térmicas (Volke Sepúlveda y Velasco Trejo, 2002). Dentro de las biológicas, los sistemas de biorremediación consisten principalmente en el uso de los microorganismos naturales existentes en el medio para descomponer o degradar sustancias peligrosas en sustancias menos tóxicas o, mejor aún, inocuas para el ambiente y la salud de los seres vivos (Maroto y Rogel, 2004).

El caso de los suelos contaminados con aceites utilizados por la industria automotriz también ha tenido cierto interés. Los vertidos de estos desechos dañan tremendamente los suelos, evitando el desarrollo normal de la fauna, flora y microbiota normales (Das y Chandran, 2011, (Joaquín et al., 2006; Schroeder, Domínguez, & García, 1999; Volke et al., 2006). La biorremediación es la tecnología que promete mejores resultados para el tratamiento de sitios contaminados por estos compuestos. Muchos microorganismos indígenas en aguas y suelos son capaces de degradar contaminantes de hidrocarburos (Das y Chandran, 2011; Gibson, 1982) y se han aislado varias especies de bacterias capaces de degradar hidrocarburos en lugares en que se han aplicado técnicas de biorremediación (Altamirano y Pozzo 2000). Los resultados obtenidos con microorganismos degradadores de hidrocarburos en suelos son alentadores (Araujo et al., 2004; Ferrera-Cerrato, Rojas-Avelizapa, Poggi-Varaldo, Alarcón, & Cañizares-Villanueva, 2006; Ibarra, D. & Redondo, 2011; Schroeder et al., 1999; Viñas & Solanas, 2005).

Este trabajo se realizó con el propósito de detectar microorganismos en suelos que han sido afectados por el vertido de aceites automotrices en suelos de Veraguas y comprobar si estos microorganismos tenían alguna capacidad en la degradación de hidrocarburos, para que puedan ser utilizados como biorremediadores en ambientes similares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Este estudio se realizó con muestras obtenidas de tres talleres mecánicos ubicados en la región central del país en la provincia de Veraguas, distrito de Santiago. Los talleres escogidos fueron designados con los códigos TE, TP y TM (su ubicación se presenta en el Cuadro 1). Sus datos fueron obtenidos del programa de coordenadas geográficas en Google Earth.

Cuadro 1. Coordenadas geográficas de los talleres, con sus respectivas iniciales como identificador.

Talleres	Coordenadas Geográficas.	
TE	8° 05' 48.72" N.	80° 57' 21.72" O.
TP	8° 05' 43.90" N.	80° 58' 34.9" O.
TM	8° 06' 34.12" N.	80° 58' 07.24" O.

Se escogieron estos talleres porque presentaron las características buscadas como por ejemplo: suelos con vertidos de aceites de desecho, degradación del terreno circundante, todos tenían mucho tiempo de funcionar y haber vertido el aceite usado de los motores directamente al suelo.

Toma de muestras

Para la recolección de las muestras se utilizaron palas metálicas de jardinería esterilizadas. Se tomó una muestra de cada sitio en zonas donde era más notoria la contaminación; para esto se extrajeron porciones de suelo de áreas contaminadas y se colocaron en bolsas plásticas debidamente rotuladas. Luego las muestras fueron trasladadas al laboratorio de microbiología del Centro Regional Universitario de Veraguas (CRUV) para su procesamiento y análisis microbiológico.

Análisis de la muestra en laboratorio

Aislamiento de cepas.

En laboratorio se pesaron 50 g. de cada muestra de suelo en una bolsa de plástico estéril y se le agregaron 500 mL de agua peptonada estéril. La bolsa se agitó manualmente (25 veces) para que se disolvieran las partículas más gruesas del suelo. Luego de reposada, se tomó 1 mL por triplicado, los cuales fueron vertidos en sendos tubos de ensayo con caldo nutritivo. Luego se incubó por 48 h a 30 °C. Pasadas las 48 horas se observó el crecimiento mediante la coloración y turbiedad en cada uno de los tubos. Con el asa bacteriológica se tomó una muestra de estos tubos y se sembraron por estriado en platos Petri con agar para recuento de aerobios (APC), los que se incubaron por 48 hs a 30 °C. Todo este proceso fue ejecutado en una cámara de flujo laminar para garantizar la esterilidad de las muestras. Después de la incubación se observó el crecimiento de colonias, las cuales fueron descritas por sus características físicas. Cada colonia, con características definidas de coloración, forma y tamaño, fue picada con el asa microbiológica y sembrada en caldo nutritivo, incubándola por 24 h a 30 °C. Estas cepas aisladas fueron utilizadas para observar su capacidad degradadora en aceites usados.

Análisis de degradación de aceites

Las cepas aisladas fueron transferidas a tubos de ensayo con caldo nutritivo. Transcurrido el tiempo de crecimiento de los cultivos en los tubos de ensayo del proceso anterior, se tomó 1mL de cada tubo y se repartieron en frascos de vidrio con tapa de rosca que contenía caldo nutritivo; y luego, a cada frasco se le vertió aceite usado que había sido obtenido de los talleres en estudio. La

cantidad vertida era lo suficiente para hacer una película uniforme sobre el caldo de cultivo en estudio. Este sistema se incubó a temperatura ambiente (entre 25 a 32 °C) en una incubadora, para hacer las observaciones. Durante las primeras semanas se observó diariamente el cambio que presentó cada frasco y se anotaron los resultados que involucraron cambios en la película de aceite (esto fue por un lapso de dos meses, aproximadamente). Los resultados anotados fueron: cambio en la apariencia del aceite, formación a aberturas en el aceite. Esto se realizó hasta notar que en algunas de las pruebas se disipara o disminuyera la capa de aceite, lo que fue atribuido al desarrollo de los microorganismos presentes

El mismo procedimiento se repitió, pero reemplazando el caldo nutritivo por agua peptonada. Esto con el propósito de observar si había alguna diferencia en el comportamiento de las cepas en un medio con menos nutrientes.

Identificación

Las cepas que presentaron mejor desempeño (capacidad de formar espacios en el aceite) en la prueba de degradación de aceites fueron sometidas a un proceso de identificación básico. Para esto, se rayó cada cepa en agar nutritivo y se incubó por 48 h a 30°C. Las colonias de estos platos fueron analizadas por crecimiento aerobio en agar nutritivo, morfología de colonias, tinción de Gram, tinción de esporas y la prueba de catalasa.

RESULTADOS

Aislamiento de cepas

Las cepas aisladas de los diferentes talleres se presentan en el Cuadro 2, con sus características principales. Algunas de estas colonias presentaron formas muy similares en su borde y elevación; sin embargo, otras mostraron distinta coloración y tamaño. La colonia más llamativa, por su coloración cremosa y roja muy brillante fue la del TE2.

Cuadro 2. Características de crecimiento de las colonias en agar nutritivo.

Talleres	Colonia	Borde	Longitud	Coloración	Elevación
TE	TE 1	liso	2 milímetros	Cremosa	No
	TE 2	liso	3 milímetros	Roja muy brillante	Si
TP	TP 1	liso	1 milímetro	Cremosa, muy brillante	Si
	TP 2	liso	0.5 milímetro	cremosa	No
TM	TM 1	liso	1 milímetro	Cremosa, muy opaca.	No
	TM 2	liso	0.5 milímetro	Con brillo, poco cremosa	No

En la Figura 1, se muestra el crecimiento de las colonias en el agar nutritivo aislada de cada taller. Las muestras de los tres talleres presentaron un gran crecimiento en los medios de cultivo,

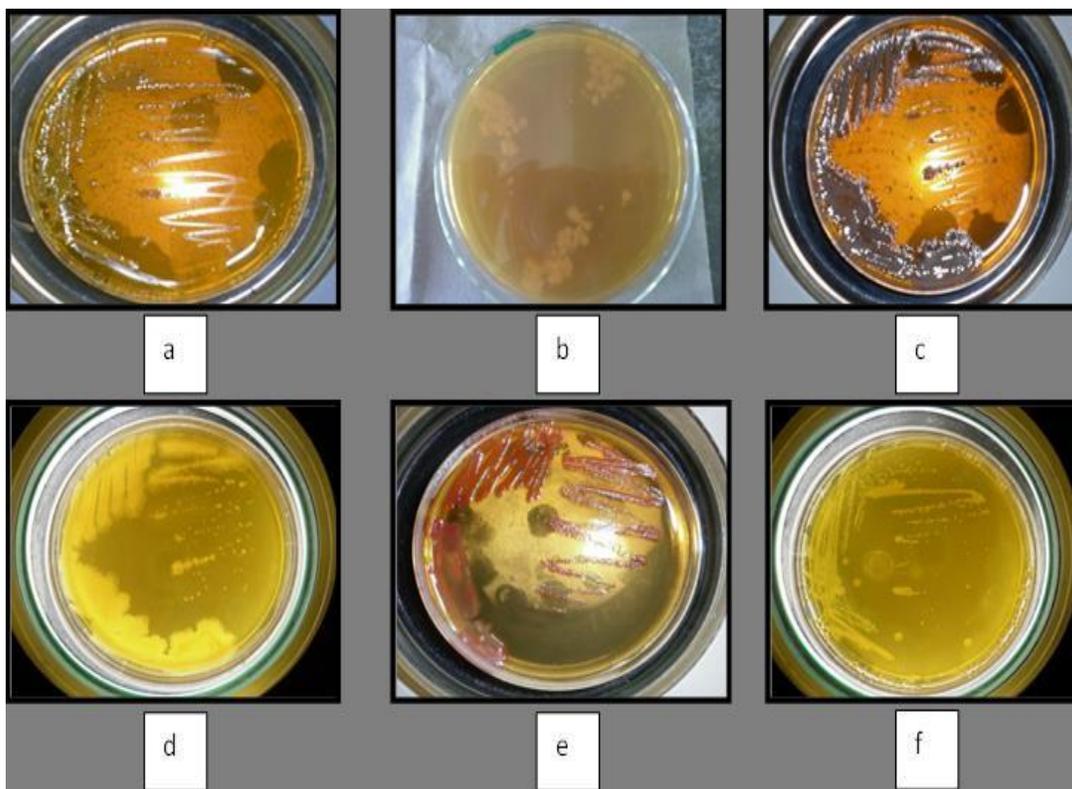


Figura 1. Crecimiento de colonias aisladas de los diferentes talleres en agar nutritivo, (a) TE1, (b) TE2, (c) TP1, (d) TP2, (e) TM1, (f) TM2.

en especial el TE, pues su incremento en el agar nutritivo fue más notorio, presentando una coloración roja propia del mismo. Esta coloración prevaleció en el crecimiento de las colonias

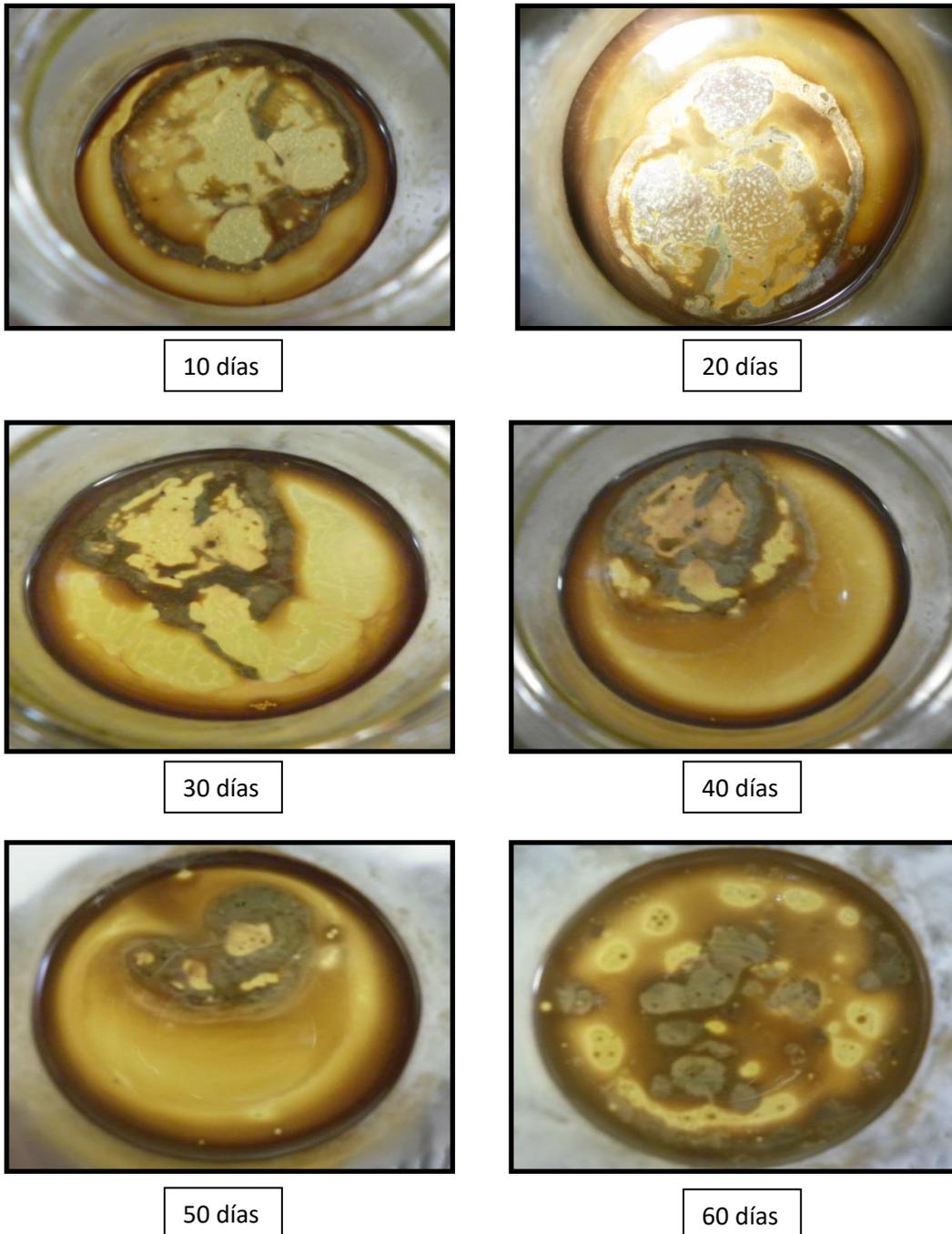


Figura 2. Observaciones en intervalos de 10 días de la superficie del sistema para detectar degradación de aceite con la cepa TP2. Las imágenes corresponden a la observación de la superficie.

Análisis de degradación de aceite

El objetivo de realizar esta prueba era observar si las cepas aisladas eran capaces de degradar el aceite de motor usado a través del tiempo, y las observaciones demostraron un cambio muy lento durante las primeras semanas (primer mes), después del cual se notaron cambios notorios en algunas muestras. La secuencia en tiempo de la colonia TP2 desde la primera etapa se observa en la **Figura 2**. Ésta mostró cambios obvios en la coloración, caldo nutritivo y el compuesto de aceite. Fue esta colonia la que produjo un proceso degradador más visible; sin embargo, al final de la etapa otras cepas manifestaron cambios, como fue el caso de TE2 y TM1 (Figura 3).

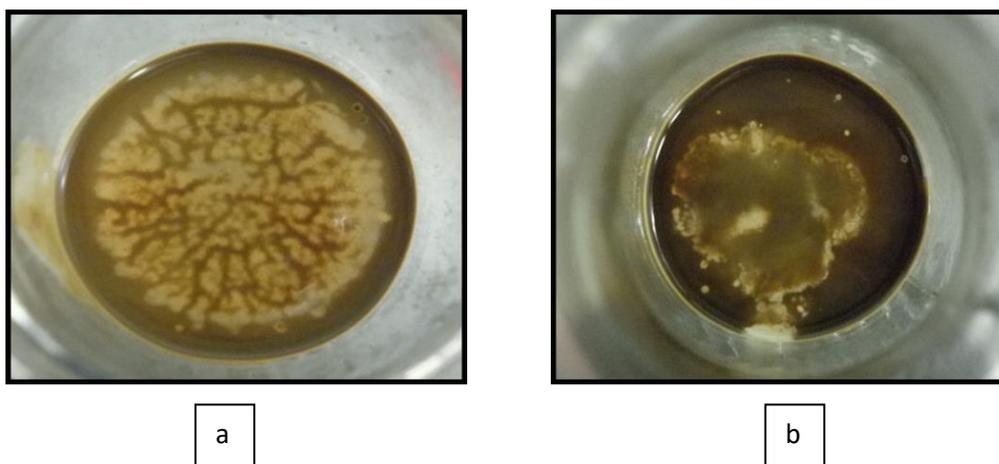


Figura 3. Resultados de pruebas de degradación de aceite. Las cepas TE2 (a) y TM 1 (b) también mostraron capacidad degradadora.

Las muestras que estaban en agua peptonada no dieron los mismos resultados. Su degradación fue muy poca; ninguno de los frascos tuvo el cambio que ocurrió con el caldo nutritivo. Los nutrientes estimulan el crecimiento microbiano y si no hay ciertos nutrientes, las bacterias no se pueden desarrollar. El caldo nutritivo es un medio que contiene todos los nutrientes adecuados para un mejor crecimiento; sin embargo, el agua peptonada se prepara con peptona que es una proteína con partículas pequeñas y resulta en un medio que no tiene otro elemento ni minerales. Esta preparación se utiliza con el propósito de ajustar el pH del agua donde se colocan los cultivos, y al no contener otros nutrientes, hacen que no sea un medio nutritivo completo para las bacterias. Las cepas TM2 y TP1 no presentaron cambios en ninguna de las etapas correspondientes (Figura 4).

Prueba de identificación

En la tinción de Gram, todas las bacterias presentaban las mismas características de color moradas y en forma de bacilos, aunque en diferentes tamaños. La tinción de esporas en todos los casos resultó negativa.

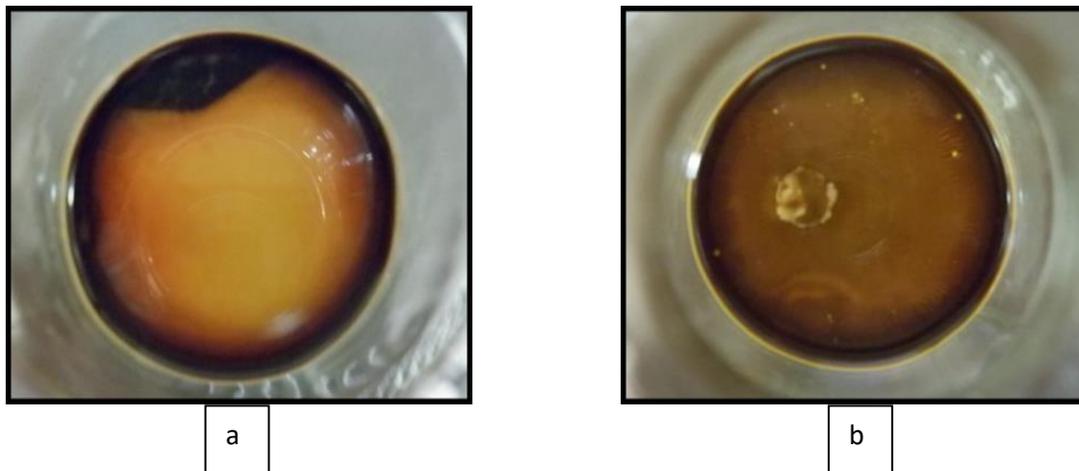


Figura 4. Resultados negativos con las pruebas de degradación de aceites. Las cepas TM2 (a) y TP1 (b) no mostraron cambios significativos en la película de aceite.

La prueba de catalasa resultó positiva en todos los casos. Las cepas que presentaron resultados positivos en la degradación de aceites fueron bacilos Gram positivos, aerobios y catalasa positivas. En la tinción de esporas no se obtuvieron resultados positivos.

Los resultados resumidos en el Cuadro 3. muestran que todas las cepas son bacilos grampositivos aeróbicos, sin presencia de esporas, catalasa positiva.

Cuadro 3. Resultados de pruebas de identificación aplicadas a las cepas.

CEPAS	TE 1	TE 2	TP 1	TP 2	TM 1	TM 2
PRUEBAS						
Crecimiento Aeróbico	+	+	+	+	+	+
Tinción de Gram	+	+	+	+	+	+
Tinción de Esporas	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+

DISCUSIÓN

Las muestras de los tres talleres escogidos dieron resultados favorables pues se pudo observar perfectamente el crecimiento de bacterias y realizar el aislamiento de estas cepas.

Las cepas que presentaron rasgos positivos en la degradación de aceite pueden ser de gran ayuda, ya que se ha visto que las mejores cepas en los procesos de biorremediación son aquellas

que son autóctonas del ambiente a tratar (Menezes Bento, De Oliveira Camargo, Okeke, & Frankenberger, 2003).

La tinción de esporas negativas aplicada a las cepas puede deberse a que estas bacterias estaban en franco crecimiento al momento de teñirlas y por esto no presentaban esporulación. La ausencia de esporas en la tinción podría deberse a que los cultivos utilizados para las tinciones eran frescos y las bacterias no se encontraban en esporulación. De poderse demostrar la presencia de esporas, sería seguro que se trata de bacterias pertenecientes al género *Bacillus* (Calvo & Zúñiga, 2010). Resultados similares se encontraron en Long Beach (California) donde descubrieron consorcios bacterianos degradadores de hidrocarburos identificados por secuenciación de genes 16S-ARN, demostrando la presencia de *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus pumilis*, *Acinetobacter junii*, y *Pseudomonas sp* (Menezes Bento et al., 2003). Sin embargo estudios realizados demuestran que *Flavobacterium* y *Pseudomonas* son los microorganismos más aislados en la fase de degradación de los TPH (Hidrocarburos Totales); generalmente, la mayoría de bacterias aisladas de estos ambientes pertenecen a bacterias bacilares Gram positivos (Rivera-Cruz et al., 2004).

Existe una gran variedad de microorganismos relacionados con la degradación de fracciones específicas de hidrocarburos del petróleo y aunque no han sido caracterizados en su totalidad, muchos poseen peroxidasas y oxigenasas, que permiten la oxidación más o menos específica de algunas fracciones del petróleo (Joaquín et al., 2006). Proceso muy importante para la biorremediación de los suelos contaminados.

Es importante señalar que el desempeño de los microorganismos degradadores de hidrocarburos es óptimo cuando en el medio se presentan las condiciones ambientales nutricionales adecuadas, las cuales generan en los microorganismos una capacidad de respuesta rápida a eventos de contaminación. En los suelos normales, los organismos capaces de utilizar contaminantes suelen constituir menos del 0,1% de la comunidad microbiana, mientras que los degradadores pueden llegar a constituir el 100% de la riqueza microbiológica de un suelo contaminado. Cuando se produce un estrés ambiental o un cambio en la fuente de carbono orgánico, la composición de la comunidad microbiana se modifica, para favorecer a las especies que pueden tolerar ese estrés o utilizar el nuevo sustrato (Joaquín et al., 2006). Ese es el caso de las bacterias que han podido desarrollarse en estos suelos muy alterados por la gran concentración de aceites vertidos en ellos.

CONCLUSIÓN

En todos los talleres muestreados aparecieron cepas bacterianas que se pudieron aislar satisfactoriamente, siendo un resultado que demuestra que se pueden encontrar microorganismos en estos ambientes poco amigables.

Algunas de las cepas obtenidas presentaron capacidad degradador de aceites usados en las pruebas de laboratorio. El mejoramiento de estas cepas podría servir para tratar suelos contaminados con hidrocarburos. Al desarrollar la prueba de análisis de metabolismo de aceite con

un medio de caldo nutritivo, algunas cepas mostraron cambios desde las primeras semanas, entre ellas: TE 1, TM 1 y TP 2. Una prueba similar, pero con agua peptonada, mostró resultados negativos en todos los casos; lo que puede deberse a la falta de algunos requerimientos nutricionales necesarios para estas bacterias. Estas cepas tienen potencial para usarse como biorremediadores de ambientes alterados por aceites usados.

Las bacterias aisladas presentaron forma bacilar, crecimiento aerobio, Gram positivas, sin esporas y son catalasa positivas.

AGRADECIMIENTO

Nuestro agradecimiento a la Profesora María Isabel González por su colaboración en las correcciones del resumen en idioma inglés de este artículo.

REFERENCIAS

- Altamirano, G., & Pozzo, G. (2000). Aislamiento e identificación de bacterias hidrocarburohíticas provenientes de un suelo sometido a biorremediación. *XXVII Congreso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental*, (1), 1–6. Retrieved from <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/resisoli/iii-131.pdf>
- Araujo, I., Angulo, N., Cardenas, C., Méndez, M., Morante, M., & Machado, M. (2004). Biorremediación de suelos con consorcio bacteriano, compostaje y fertilización. *Centro de Investigación Del Agua*, 38(3), 14.
- Barrios Ziolo, L. F., Robayo Gómez, J., Prieto Cadavid, S., & Cardona Gallo, S. A. (2015). Biorremediación de suelos contaminados con aceites usados de motor. *Cintex*, 20(1), 69–96.
- Calvo, P., & Zúñiga, D. (2010). CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE CEPAS de *Bacillus* spp. AISLADAS DE LA RIZÓSFERA DE PAPA (*Solanum tuberosum*) PHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF *Bacillus* spp. STRAINS FROM POTATO (*Solanum tuberosum*) RHIZOSPHERE. *Ecología Aplicada*.
- Covarrubias, S. A., García Berumen, J. A., & Peña Cabriales, J. J. (2015). El papel de los microorganismos en la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados. *Acta Universitaria*, 25, 40–45. <https://doi.org/10.15174/au.2015.907>
- Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International*, 2011, 1–13. <https://doi.org/10.4061/2011/941810>
- Dos Santos Alves, R.; Soares de Souza, A., et al. (2014). Evaluación de la capacidad degradadora y acción de biorremediación de bacterias presentes en suelos con residuos de pesticidas de florícola pencaflor. *Igarss 2014*, (1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>

- Ferrera-Cerrato, R., Rojas-Avelizapa, N. G., Poggi-Varaldo, H. M., Alarcón, A., & Cañizares-Villanueva, R. O. (2006). Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. In *Revista Latinoamericana de Microbiología* (Vol. 48, pp. 179–187). <https://doi.org/10.1007/s12010-010-9014-0>
- Gibson, D. T. (1982). Microbial Degradation of Hydrocarbons. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 5(3–4), 237–250. <https://doi.org/10.1080/02772248209356982>
- Ibarra, D. & Redondo, J. (2011). Modelo para Biorremediación de Suelos Contaminados. Una Aproximación con Dinámica de Sistemas. *Revista Del Colegio Mayor De Nuestra Señora Del Rosario*, 1, 0–5.
- Joaquín, B. L. de M., Quintero, G., Guevara Vizcaíno, A. L., Jaimes Cáceres, D. C., Gutiérrez Riaño, S. M., & Miranda García, J. (2006). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova*, 4(5), 82. <https://doi.org/10.22490/24629448.351>
- Lorenzetti, Y., Grillo-Puertas, M., Scaravaglio, O., Cerioni, L., Volentini, S., & Rodríguez, L. (2012). Biorremediación de suelos y aguas conaminadas con cobre. Cepas mutantes de *Escherichia coli* presentan diferente capacidad depuradora del metal. *VII Congreso de Medio Ambiente /AUGM*, 30. Retrieved from <http://www.congresos.unlp.edu.ar/index.php/CCMA/7CCMA/paper/view/1088>
- Maroto, M. E., & Rogel, J. M. (2004). Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos. *Protección Ambiental de Suelos*, 297–305.
- Menezes Bento, F., De Oliveira Camargo, F. A., Okeke, B., & Frankenberger, W. T. (2003). Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. *Brazilian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822003000500022>
- Rivera-Cruz, M. D. C., Ferrera-Cerrato, R., Sánchez-García, P., Volke-Haller, V., Fernández-Linares, L., & Rodríguez-Vázquez, R. (2004). Descontaminación de suelos con petróleo crudo mediante microorganismos autóctonos y pasto alemán [*Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchc.]. *Agrociencia*, 38(1), 1–12.
- Schroeder, R. H. A., Domínguez, V. I., & García, L. (1999). Potencial de la biorremediación de suelo y agua impactados por petróleo en el trópico mexicano. *TERRA*, 17(2), 16. <https://doi.org/citeulike-article-id:10010431>
- Viñas, M., & Solanas, A. (2005). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos : caracterización microbiológica , química y ecotoxicológica hidrocarburos : caracterización microbiológica , química y ecotoxicológica. *Universitat de Barcelona*, 352. Retrieved from <http://www.tdx.cesca.es/TDX-0920105-085623/>
- Volke Sepúlveda, T., & Velasco Trejo, J. A. (2002). *Tecnologías de remediación para suelos contaminados. Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT)*. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Volke, T. L. (2012). Biorremediación de suelos contaminados. *Bio Tecnología*. Retrieved from

http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2002_1/biorremediacion.pdf

Volke, T. L., Mulas, R., Ercoli, E., Fallis, A. ., Vargas, P., Cuéllar, R., ... Paola, D. (2006). Biorremediación de suelos: desde el concepto a su aplicación. aplicación. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 23(3), 45.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>