

Endogenous bacterial strains utilization in the bioremediation of oil contaminated water

*Ismenia Araujo**, *Gustavo Romero*, *Carmen Cárdenas*, *Nancy Angulo*,
Gustavo Morillo, *Judith Navarro y María Méndez*

Centro de Investigación del Agua, Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia,
Apartado 526. Maracaibo, Edo. Zulia, Venezuela.

*E-mail: ceinvagua @ luz.ve; *ismenia_araujo@hotmail.com*

Abstract

The objective of this work was the bioremediation of contaminated water with lubricant oil by using endogenous bacterial strains. Samples of water were taken from the Lake of Maracaibo, sector Capitan Chico, Edo. Zulia. From the water samples, 16 bacterial strains were isolated, which were subjected to a essay of feasibility using gasoil as carbon source. The seven bacterial strains more efficient during the essay of feasibility were identified and utilized as a mixed culture in a biotratabilidad study. The essay were prepared in plastic tanks of 25 L with mixed culture (10%), oil lubricant (7000 mg/L), nitrogen and phosphorus (0,5; 0,75; 1 g/L), in a total volume of 20 L. In four of the treatments aeration was applied. Monthly the bacterial count, the oil content, the nitrogen and total phosphorus content were registered. In the inoculated, fertilized and aired tanks the highest removals were achieved, until 95% of the oil was present.

Key words: Bacterial strains, lubricant oil, bioremediation.

Utilización de cepas bacterianas endógenas en la biorremediación de agua contaminada con aceite lubricante

Resumen

El objetivo de este trabajo fue la utilización de cepas bacterianas autóctonas en la biorremediación de agua contaminada con aceite lubricante. Se tomaron muestras de agua del Lago de Maracaibo, sector Capitán Chico, Edo. Zulia. Se aislaron 16 cepas bacterianas, las cuales fueron sometidas a un ensayo de factibilidad, utilizando gasoil como única fuente de carbono. Se seleccionaron e identificaron las siete cepas más eficientes en la degradación de los hidrocarburos. Se preparó un cultivo mixto con dichas cepas, el cual se utilizó en un estudio de biotratabilidad. En tanques plásticos de 25 L se dispensaron: cultivo mixto (10%), aceite lubricante (7000 mg/L), nitrógeno y fósforo (0,5; 0,75; 1 g/L), en un volumen de 20 L. En cuatro de los tratamientos, se aplicó aireación. Mensualmente, se registró el contaje bacteriano, el contenido de aceite y el contenido de nitrógeno y fósforo totales. Se aplicó un análisis de varianza con tres repeticiones, utilizando un modelo lineal estadístico. El efecto de la aplicación de cultivo mixto, fertilización y aireación sobre la degradación de aceite resultó significativo ($P < 0,05$), en aquellos tratamientos que contenían estos parámetros con relación a aquellos que no los contenían. En los tanques inoculados, fertilizados y aireados se lograron las mayores remociones, hasta un 95% del aceite presente.

Palabras clave: Cepas bacterianas, aceite lubricante, biorremediación.

Introducción

La biorremediación o saneamiento biológico es una tecnología basada en procesos naturales que utiliza la capacidad de algunos microorganismos, tales como bacterias y hongos, para transformar compuestos químicos con la finalidad de disminuir o eliminar su condición de peligrosidad [1, 2, 3, 4]. La descarga de petróleo y sus productos derivados a las corrientes de agua naturales ha planteado un problema mundial de bastante gravedad. En Venezuela, importantes investigaciones han sido dirigidas al estudio de los microorganismos y sus actividades, con el propósito de ampliar su versatilidad metabólica para la degradación de contaminantes específicos principalmente los provenientes de las actividades petroleras. La degradación de los contaminantes es más eficiente si los microorganismos cuentan con las condiciones óptimas para su desarrollo, tales como nutrientes (nitrógeno y fósforo), oxígeno, pH y temperatura [5].

El objetivo fundamental de esta investigación fue determinar la eficiencia de cepas bacterianas provenientes de aguas contaminadas con hidrocarburos en la degradación de derivados de hidrocarburos como el gasoil y el aceite lubricante de motor, por ser este producto el que se vertía con mayor frecuencia en la zona afectada.

Metodología Experimental

Aislamiento

El agua contaminada con hidrocarburos utilizada en este estudio fue obtenida de la ribera del Lago de Maracaibo (con temperaturas superficiales promedio de 32°C), sector Capitán Chico, Maracaibo, Edo. Zulia, Venezuela. Los envases con el agua contaminada fueron trasladados al Laboratorio de Microbiología Industrial del Centro de Investigación del Agua, Universidad del Zulia, donde se realizó el aislamiento de las cepas bacterianas presentes, utilizándose la técnica de siembra en placa por estría [6, 7]. Una vez aisladas las colonias, se registraron sus características morfológicas y cada una de las cepas fue guardada por duplicado en refrigeración en tubos con agar inclinado cerebro corazón [8].

Estudio de Factibilidad

Las cepas aisladas preservadas, se activaron por transferencia a un medio nutritivo fresco, infusión cerebro-corazón y se incubaron a 37°C hasta alcanzar un crecimiento superior a 1×10^8 UFC/mL. A partir de estos cultivos se prepararon los inóculos para el ensayo [6, 9]. El ensayo de factibilidad en el laboratorio se preparó en fiolas de 250 mL para cada cepa, utilizando 5 mL inóculo, 1 mL de gasoil y 94 mL de medio mínimo mineral, según la modificación propuesta por Jobson en 1975 [10]. Todas las fiolas fueron incubadas a 37°C y 120 rpm de agitación en un *Incubator Shaker*, modelo 625, durante 60 días. Este ensayo permitió seleccionar las cepas más eficientes en la degradación del gasoil. Cada dos semanas, durante dos meses, se tomaron muestras de cada fiola para la determinación de contajes bacterianos siguiendo la técnica de contaje en placa vertida, 9215-B [9]. Al inicio y al final del ensayo, se realizó la determinación del gasoil en todas las fiolas según el método 5520-F [9]. Las cepas más eficientes en la degradación del gasoil fueron seleccionadas para el estudio de tratabilidad y se realizó tinción de Gram, crecimiento en anaerobiosis, ureasa, citrato, catalasa, oxidasa, motilidad y triple azúcar hierro [6,7], datos que permitieron determinar en cualquier momento del ensayo, el grado de pureza y la presencia de contaminantes en los cultivos de las cepas bacterianas utilizadas y preservadas.

Estudio de Tratabilidad

Se seleccionaron las siete cepas más eficientes en la degradación de gasoil para conformar el cultivo mixto en el estudio piloto. Cada cepa seleccionada fue activada y posteriormente, transferida a caldo cerebro-corazón, se incubaron a 37°C hasta obtener una concentración superior a 1×10^8 UFC/mL. Para preparar el cultivo mixto se dispensaron 285 mL de cada cepa para un volumen de inóculo de dos litros aproximadamente, el cual se adicionó a la unidad experimental alcanzando una concentración de 10% en el volumen total. La mezcla estudio se preparó agregando al agua (potable) la cantidad de aceite equivalente al 35% p/v por cada litro de agua en cada tanque (concentración aproximada del aceite en el área afectada).

Para este estudio, las unidades experimentales estaban representadas por tanques cilíndricos plásticos con una capacidad de 25 L cada uno (Figura 1). El diámetro fue de 0,3 m y la altura de 0,36 m. Con el fin de mejorar la eficiencia del proceso de biorremediación se adicionó un fertilizante compuesto (fosfato diamónico). Las concentraciones utilizadas fueron: 0,5; 0,75 y 1 g/L del fertilizante. El aire se suministró mediante un sistema de inyección en espiral de aire forzado, permitiendo crear zonas alternas de transferencia y mezclado, evitando así la formación de volúmenes muertos sin movimiento, formado por una tubería plástica acoplada a un compresor que tuvo como función bombear el aire a través de toda la tubería.

Se prepararon tanques con las condiciones objeto de estudio (cultivo, adición de aire, entre otras) y sus respectivos controles, Tabla 1.

El estudio piloto de tratabilidad tuvo una duración de cinco meses y cada mes se tomó una muestra de cada tanque para la realización de los análisis microbiológicos y fisicoquímicos. Para los parámetros microbiológicos se utilizó el conteo de heterótrofos mesófilos por la técnica de placa vertida (9215-B). Los parámetros fisicoquímicos fueron realizados utilizando los métodos: aceite total, 5520-F gravimétrico; nitrógeno total, 4500-NH₃; fósforo total, 4500-C ácido ascórbico [8, 9].

Resultados y Discusión

Aislamiento

El aislamiento microbiológico permitió la obtención de 16 tipos de colonias a partir de las muestras de agua contaminada con hidrocarburos. Se encontraron bacilos, cocos y cocobacilos y las características de las cepas fueron registradas en la Tabla 2 siguiendo el formato propuesto por Thomas J. Kerr [6]. Las cepas nominadas MI 1 y MI 14 presentaron características similares a MI 9 y MI 15, respectivamente.

Estudio de Factibilidad

Los valores de crecimiento de las cepas bacterianas al inicio del ensayo estuvieron entre 7×10^4 y 85×10^7 UFC/mL y al final entre 1×10^3 y 45×10^8 UFC/mL (Tabla 3).

El crecimiento de las cepas bacterianas aisladas mostró diferentes patrones de comporta-

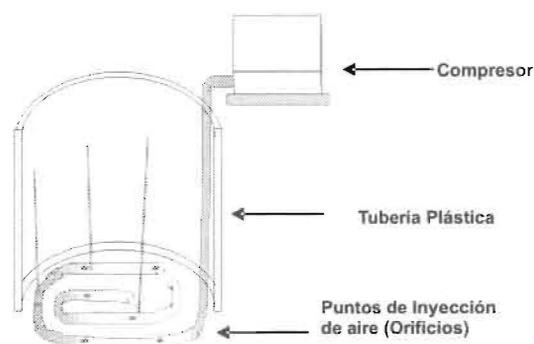


Figura 1. Corte transversal de una unidad experimental con sistema de aireación.

miento a lo largo del tiempo. Los resultados obtenidos en la determinación de los hidrocarburos totales mostraron que, en el ensayo de factibilidad, todas las cepas fueron capaces de degradar el gasoil (Tabla 4). Las cepas MI 9 y MI 15 fueron las más eficientes en la remoción del gasoil, con 71% y 66% respectivamente, a los 60 días de tratamiento. Las cepas seleccionadas para integrar el cultivo mixto en el ensayo a escala piloto fueron: MI 5, MI 7, MI 8, MI 9, MI 10, MI 11 Y MI 15, ya que los cultivos utilizados en procesos de biorremediación deben ser capaces de degradar el sustrato con una eficiencia mínima de 30-40% durante 4 a 6 semanas [3].

Estudio de Tratabilidad

En el estudio de tratabilidad, a escala piloto, los microorganismos alcanzaron diferentes densidades poblacionales durante los cinco meses del ensayo (Figura 2). Las densidades poblacionales iniciales presentaron títulos $>1 \times 10^6$ UFC/mL, mientras que en los controles (agua/aceite con y sin aireación) fueron inferiores a 5×10^3 UFC/mL. En los primeros 30 días de estudio, los microorganismos aumentaron sus densidades en todos los tratamientos (cultivo mixto, nutrientes y aireación) al igual que los controles. A los 150 días de tratamiento, todos los títulos de crecimiento fueron $>1 \times 10^8$ UFC/mL. Wrenn [12], utilizó un cultivo mixto conformado por cepas degradadoras de hidrocarburos y probaron su eficiencia en la degradación de crudo liviano (5 g/L) en medio acuático, logrando valores de crecimiento hasta de 10^8 UFC/mL.

Tabla 1
Unidades Experimentales

Tanque	Aceite	Cultivo Mixto	Nutrientes (g/l)			Aireación
			0,5	0,75	1	
Control 1	x					
Control 2	x					x
3	x	x				
4	x	x				x
5	x	x			x	
6	x	x		x		
7	x	x	x			
8	x	x			x	x
9	x	x		x		x
10	x	x	x			x

Tabla 2
Características de las cepas bacterianas aisladas

Cepa	Características
MI 2	Borde ondulado, brillante, grisácea, forma irregular, rugosa, contorneada radiada y vesiculada.
MI 3	Borde entero y poco brillante, blanca, forma circular, convexa y lisa.
MI 4	Borde entero, brillante, blanca, forma circular, plana, y lisa.
MI 5	Borde entero, brillante, amarillenta en el centro, circular, umbonante y lisa.
MI 6	Borde entero, brillante, grisácea, forma circular, umbonante, contorneada y lisa.
MI 7	Colonias pequeñas, transparente, grisácea, circular, lisa y traslúcida.
MI 8	Colonias pequeñas, grisácea, traslúcida, circular, convexa, lisa y vesiculada.
MI 9	Margen entero, brillante, circular, convexa, lisa, blanca y el centro opaco.
MI 10	Borde entero, no brilla, ni destella, circular, lisa y plana.
MI 11	Borde entero, no brilla, ni destella, blanca, forma circular, convexa y superficie lisa.
MI 12	Circular, traslúcida, destello en el centro y borde opaco, blanca y plana.
MI 13	Margen entero, blanca, umbonante, circular y vesiculada.
MI 15	Destello, difuminada, "swarming", blanca, irregular, plana, erosionada y halo opaco.
MI 16	Borde entero, ni brilla, ni destella, blanca, circular, convexa, lisa y colonias pequeñas.
MI 17	Borde entero, blanco, con opalescencia aguda, circular, convexa y colonias pequeñas.
MI 18	Borde entero, transparente brillante, circular, lisa y colonias pequeñas.

Tabla 3
Crecimiento bacteriano en medio mínimo mineral con gasoil.

Cepa/ Días	x 106 UFC/mL				
	0	15	30	45	60
MI2	0,15	0,07	0,36	0,0002	0,001
MI3	13	4	0,5	0,52	0,49
MI4	31	23	15	4,3	4,2
MI5	37	130	280	400	680
MI6	95	20	19	1,2	4
MI7	14	40	71	90	3,1
MI8	62	18	4	60	2
MI9	300	220	3200	4000	4500
MI10	850	77	620	700	800
MI11	180	83	110	350	400
MI12	180	45	99	6,9	4,7
MI13	16	1,2	5,6	0,06	0,2
MI15	0,069	5	19	50	150
MI16	290	4,4	4	0,3	1,5
MI17	33	3,2	1,7	1,2	1,4
MI18	3,6	0,9	0,2	0,089	0,02

Se aplicó un análisis de varianza con tres repeticiones, utilizando un modelo lineal estadístico. Al evaluarse el efecto de la aplicación de cultivo mixto, fertilización y aireación sobre el número de heterótrofos mesófilos se observó un efecto altamente significativo ($P < 0,01$) en los tratamientos que contenían cultivo mixto en relación con los que no lo contenían; en los tratamientos aireados se observó un efecto significativo ($P > 0,05$); estos resultados indican que existen diferencias entre las medias del número de heterótrofos mesófilos en los tratamientos. Mientras, que el efecto de la fertilización, resultó no significativo ($P > 0,05$), lo cual indica que no hay diferencias significativas entre las medias del número de heterótrofos mesófilos en los tratamientos.

En los tratamientos control, no inoculados, la densidad poblacional del control aireado fue 49×10^2 UFC/mL, ligeramente superior que en el control no aireado e cual alcanzó una densidad de 12×10^2 UFC/mL, y esa diferencia se mantuvo durante todo el estudio (Figura 2). El crecimiento de microorganismos aerobios y el desarrollo de

sus actividades metabólicas específicas dependen principalmente de la disponibilidad de oxígeno molecular [4], lo que explica el comportamiento obtenido en estos tratamientos, el oxígeno estimuló las reacciones metabólicas de los organismos presentes.

En la Figura 3, se puede distinguir que el proceso presentó dos fases durante la degradación; en la primera fase, con una duración de sesenta días se observó una degradación cercana al 60% del aceite presente en todos los tratamientos inoculados; y en la segunda fase, en los noventa días restantes del ensayo, se observó una degradación aproximada del aceite de aproximadamente el 64%.

Los valores de aceite encontrados en los tanques no inoculados con y sin aireación se mantuvieron en el rango de 6300 a 7000 mg/L, mientras que en el resto de los tratamientos con cultivo mixto los valores de aceite disminuyeron progresivamente desde 7000 mg/L a 500 mg/L durante el estudio. Estos resultados evidencian que los trata-

Tabla 4
Contenido de gasoil al inicio y al final del ensayo de factibilidad.

Cepa Bacteriana	Gasoil (mg/mL)	
	Inicio	Final
ML2	8,3	4,24
ML3	8,3	5,06
ML4	8,3	4,22
ML5	8,3	4,1
ML6	8,3	4,18
ML7	8,3	4,04
ML8	8,3	3,73
ML9	8,3	2,39
ML10	8,3	3,66
ML11	8,3	3,87
ML12	8,3	4,28
ML13	8,3	4,43
ML15	8,3	2,84
ML16	8,3	4,3
ML17	8,3	4,5
ML18	8,3	4,5

mientos aplicados aumentaron la degradación del aceite en el ensayo. En los tratamientos con cultivo mixto con y sin aireación (4 y 3), la aireación determinó un incremento en la eficiencia de los organismos para degradar el aceite.

En relación a los tratamientos con fertilización (5 al 10) se observa que la concentración de 0,5% fue la más favorable para la degradación del sustrato presente (aceite). La utilización de la aireación y fertilizantes también aumentó la degradación, siendo el tratamiento con aireación y 0,5% de nutrientes el más eficiente en la degradación del aceite (Figura 3 y 4). Los tanques 8, 9 y 10 que fueron inoculados, fertilizados y aireados mostraron los porcentajes más altos de remoción de 95; 93 y 87% respectivamente. La fertilización fue más favorable para la degradación que la aireación. En el análisis de varianza, el efecto de la aplicación de cultivo mixto, fertilización y airea-

ción sobre la degradación de aceite resultó significativo ($P < 0,05$), en aquellos tratamientos que contenían estos parámetros con relación a aquellos que no los contenían.

Los altos porcentajes de remoción de aceite logrados en este estudio concuerdan con lo reportado por LaDausse *et al* [13], quienes demostraron la importante mejora que se producía en la biodegradación de crudo en recipientes fertilizados, en los cuales lograron remover el 60% de los hidrocarburos presentes. Adicionalmente, estos investigadores suministraron oxígeno a algunos recipientes y obtuvieron un incremento en la remoción superior al 70% en el medio fertilizado.

Baker [11], reportó que la biotratabilidad de hidrocarburos debe contar con la adición de oxígeno, nitrógeno y fósforo. Durante todo el estudio se observó una disminución de la concentración de nitrógeno y fósforo en cada tanque (Figura 5 y 6).

Durante los primeros 60 días se lograron las mayores disminuciones en los tanques aireados, lo que concuerda con los resultados de Venosa [14], quien reportó que las mayores disminuciones de nitrógeno y de fósforo en medios acuáticos contaminados con hidrocarburos tenían lugar en las primeras semanas de estudio; disminuyendo de manera secuencial pero en menor grado hasta el final del ensayo. La concentración de nitrógeno va disminuyendo en mayor proporción que la del fósforo durante los tratamientos, debido a que los microorganismos, necesitan una proporción 10:1 de estos componentes para la asimilación y la síntesis del nuevo material celular [5].

En el análisis de varianza, se observó un efecto altamente significativo ($P < 0,01$) en el efecto de la aplicación de cultivo mixto y fertilización sobre la remoción de fósforo y nitrógeno en los tratamientos que contenían estos parámetros en relación con los que no lo contenían; mientras que en los tratamientos aireados el efecto fue significativo ($P > 0,05$).

Conclusiones

El proceso de degradación del aceite fue optimizado en los tratamientos con cultivo mixto donde se aplicó aireación y fertilización simultáneamente, tanques 8, 9 y 10, donde alcanzó porcentajes de remoción de 95, 93 y 87%, respectivamente.

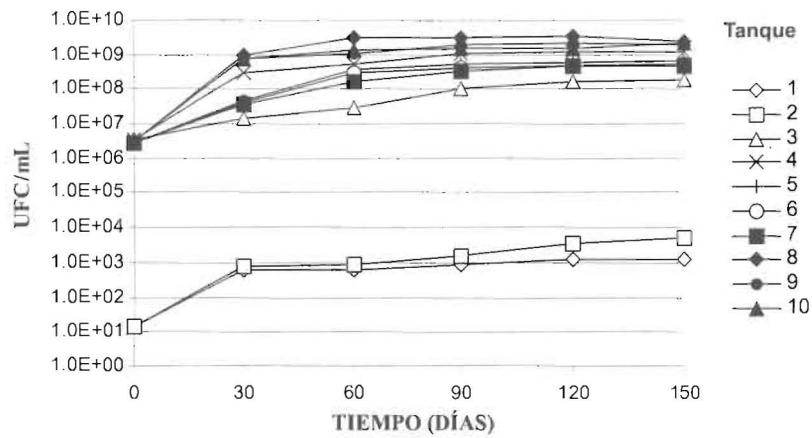


Figura 2. Curvas de crecimiento para tratamientos inoculados y controles no inoculados.

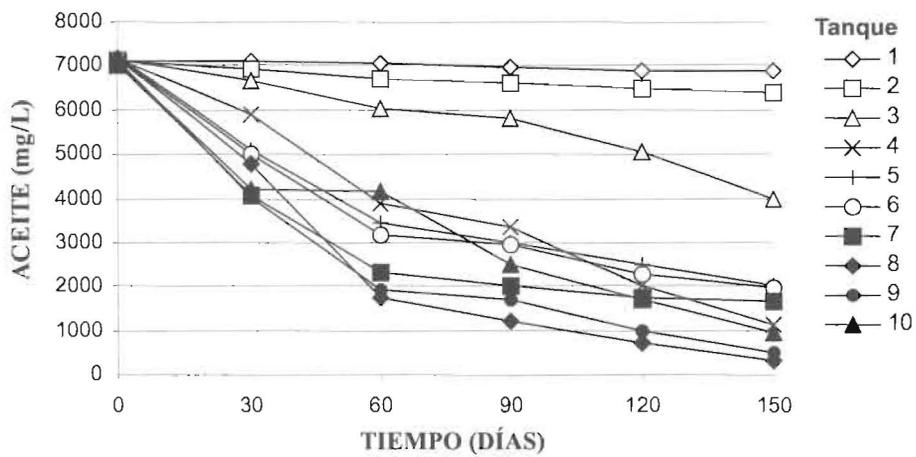


Figura 3. Concentración del aceite durante el estudio para cada tanque.

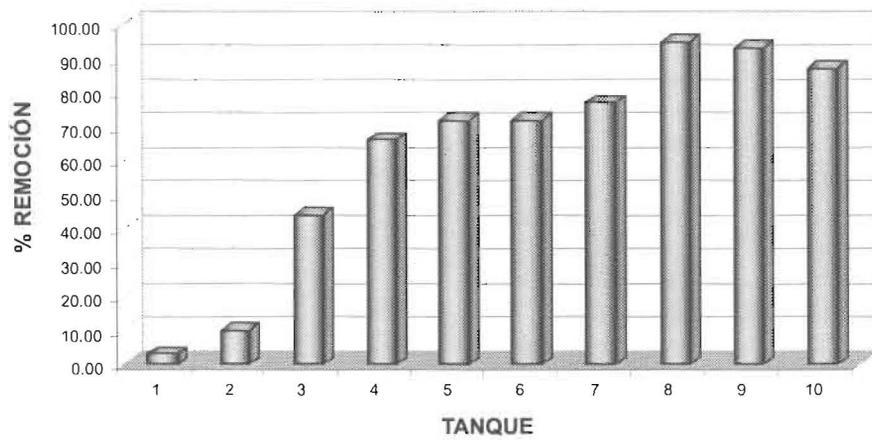


Figura 4. Porcentajes de remoción del aceite.

La adición de nutrientes influyó en la degradación del aceite en mayor proporción que la aplicación de la aireación, haciendo aun más eficiente el proceso de remoción cuando se aplicaban ambos.

El mayor consumo de nitrógeno y fósforo ocurrió los primeros sesenta días de tratamiento denotando la estimulación de la actividad metabólica de las cepas bacterianas.

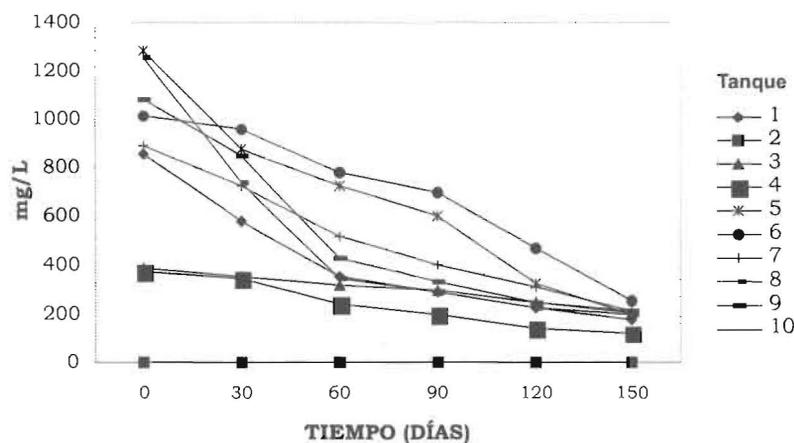


Figura 5. Concentración de nitrógeno remanente en cada tanque durante el estudio.

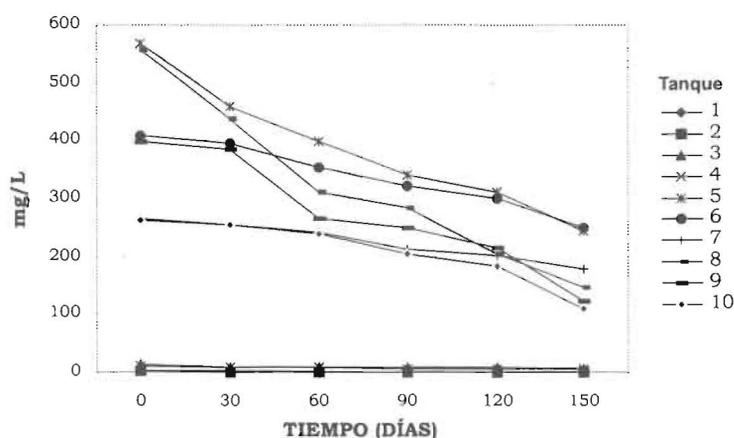


Figura 6. Concentración de fósforo remanente en cada tanque durante el estudio.

Referencias Bibliográficas

1. Cook, J.; Westlake, B.W.S. Microbial Utilization of Crude Oil. *Appl. Microbiol.* Vol. 23, N° 6 (1972) 1082-1089.
2. Scherer, E. Biodegradación de crudos y lodos petrolizados por *Pseudomonas aeruginosa* USB-CSI y cepas autóctonas. Facultad de Ingeniería. Universidad Simón Bolívar, 1996.
3. Eweis, J.; Ergas, S.; Chang, D.; Schroeder, E. **Principios de Biorrecuperación.** McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A. España, 1999.
4. Levin, M.; Gealt, M. Biotratamiento de Residuos Tóxicos y Peligrosos. Selección, estimación, modificación de microorganismos y aplicaciones. McGraw-Hill. USA, 1997
5. Metcalf; Hedi. Ingeniería de las Aguas Residuales. Tratamiento, Vertido y reutilización. Tomo I. McGraw-Hill. México, 1996.
6. Kerr, T.: Applications in General Microbiology. A Laboratory Manual. Hunter Publishing Company. Georgia, 1970.
7. Seeley, H.; Vandemark, P. **Manual de Laboratorio para Microbiología. Microbios en acción.** Editorial Blume. Barcelona, 1973.
8. Finegold, S.; Martín, W. **Diagnóstico Microbiológico.** Médica Panamericana Buenos Aires, 1983.
9. American Public Health Association, American Water Works Association & Water environment Federation.: **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.** 20ª ed. American Public Health Assoc. Washington, D.C. 2000.
10. Jobson, A.; Cook, F.; Westlake, D. Microbial Utilization of Crude Oil. *Appl. Microbiol.*, Vol. 23 (1972) 1082-1089.
11. Baker. Natural Attenuation of Aromatic Hydrocarbons in a Shallow Sand Aquifer.

- Groundwater Monit. Rev.** Vol 7 (1987) 64-71.
12. Wrenn, B. Effects of nitrogen source on crude oil biodegradation. **Journal of Industrial Microbiology.** Vol 13 (1993) 279-286.
13. LaDausse, A.; Tramier, B. Progres in enhanced oil degradation. **Paper present: Proceedings of the 1987 oil spill conference. Abstract.** Washington. D.C., 1987.
14. Venosa, A. Bioremediation treatability trials using nutrient application to enhance cleanup of oil contaminated shoreline. **In proceedings 83rd. Air and waste management Association Annual Meeting in Pittsburg.:** (1990) 90-92.

Recibido el 02 de Septiembre de 2004
En forma revisada el 13 de Septiembre de 2004