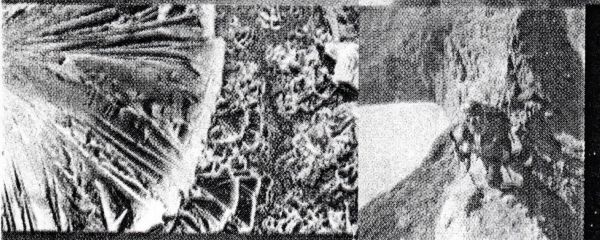




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

# ACTAS INAGEQ

Volúmen 11. No.1 Septiembre de 2005



Número especial dedicado al

## **XV** CONGRESO NACIONAL DE GEOQUIMICA

Septiembre 19 al 23, San Luis Potosí S.L.P.

**Editores:**

**Rodolfo Rodríguez-Ríos,  
Rubén López-Doncel,  
Javier Castro-Larragoitia**

ISSN EN TRÁMITE

**ACTAS INAGEQ**  
Volumen 11, No.1, Septiembre del 2005

# XV CONGRESO NACIONAL DE GEOQUÍMICA

## INSTITUTO NACIONAL DE GEOQUÍMICA, A. C.

### MESA DIRECTIVA 2044-2006

PRESIDENTE:  
SECRETARIO:  
TESORERA:

Dr. L. Walter Daesslé Heuser (UABC)  
Dr. Francisco A. Paz Moreno (UNISON)  
Dra. Ma. Amabel Ortega Rivera (ERNO)

### DELEGADOS REGIONALES

Juriquilla  
D.F.  
Morelos

Dr. Eduardo González Partida  
Quím. Rufino Lozano Santacruz  
Dr. Peter Birkle

### DELEGADOS INSTITUCIONALES

CICESE  
IIE  
IMTA  
IMP  
CICIMAR  
ESIA-IPN  
UABC  
UANL  
UASLP  
UAGro  
UAGto  
UniSon

Dr. Bodo Weber  
Dr. Peter Birkle  
Dra. Ana Hansen  
Vacante  
Dr. Evgueni Choumiline  
Vacante  
Dr. Walter Daesslé Heuser  
Dr. Fernando Velasco  
Dr. Rodolfo Rodríguez Ríos  
Dr. Oscar Talavera  
Vacante  
Dra. Lourdes Vega Granillo

### DELEGADOS POR ESPECIALIDAD

Geoquímica Ambiental  
Geocronología  
Geoquímica Analítica  
Biogeoquímica  
Geoquímica Marina  
Hidroggeoquímica  
Mineralogía  
Tectónica  
Petrología  
Geoquímica de Isótopos  
Geoquímica del Petróleo  
Interacción Fluido-Roca  
Vulcanología

Dra. Ma. Aurora Armienta Hernández  
Dra. Ma. Amabel Ortega Rivera  
Dr. Edgar Santoyo Gutiérrez  
Dr. Evgueni Choumiline  
Dr. L. Walter Daesslé  
Dra. Eva Lourdes Vega Carrillo  
Vacante  
Dr. Jaime Dante Morán Centeno  
Dr. Oscar Talavera  
Dr. Fernando Velasco tapia  
Vacante  
Dr. Thomas Kretzschmar  
Dr. Francisco Paz Moreno

### SECRETARIOS

Eventos:  
Difusión:  
Relaciones:

Dra. Ma. Catalina Alfaro

# AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS TOLERANTES A PETRÓLEO

RODRÍGUEZ LUNA, W<sup>1</sup>.; TOVAR-OVIEDO, J.<sup>2</sup>; MOCTEZUMA-ZARATE, M.G.<sup>1</sup> y ACOSTA-RODRÍGUEZ, I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. de Micología Experimental

<sup>2</sup>Lab. de Microbiología. CIEP. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. *iacosta@uaslp.mx*.

## INTRODUCCIÓN

El petróleo es una importante fuente de contaminación del suelo y agua, lo que origina que se desarrolle tolerancia a la presencia de este compuesto, induciendo la selectividad y la disminución de la diversidad microbiana en los diferentes nichos ecológicos contaminados. Los microorganismos tolerantes a petróleo, desarrollan y utilizan diferentes respuestas especializadas (enzimáticas y fisiológicas) para crecer en presencia de este contaminante (Atlas y cols., 1991). Estas condiciones propician las variaciones poblacionales de los microorganismos autóctonos, y de manera natural realizan la degradación química del petróleo presente en aguas y suelos.

El petróleo crudo contiene cientos de compuestos individuales, pero presenta cuatro formas estructurales en función de la solubilidad en solventes orgánicos: compuestos saturados (alcanos y cicloparafinas), aromáticos (mono, di y polinucleo aromáticos), resinas (agregados con una gran cantidad de estructuras como: piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos y aminas) y asfaltenos (agregados de poliaromáticos, ácidos nafténicos, fenoles, ácidos grasos y metaloporfirinas) (Leahy y Colwell, 1990).

Se ha demostrado que el crecimiento de los microorganismos requiere de fuentes de carbono derivadas de los hidrocarburos del petróleo. Los compuestos saturados y los aromáticos con uno a cinco anillos bencénicos son utilizados como fuentes energéticas; sin embargo, los aromáticos con más de cinco anillos, resinas y asfaltenos son difíciles de degradar por su recalcitrancia (Sugiera y cols., 1997).

La selección de microorganismos a través de pruebas sucesivas de crecimiento poblacional en cultivos puros ricos en petróleo, es una estrategia eficiente para evaluar la adaptación y sobrevivencia de cepas tolerantes a altas concentraciones de petróleo. Los resultados de las pruebas en laboratorio confirman la selección de las cepas más tolerantes y adaptadas. El éxito en las siguientes etapas, tanto en invernadero como en suelos y aguas contaminadas, depende de la calidad de la selección y de las condiciones ambientales. (Rivera Cruz y cols., 2002). Es muy importante la evaluación sucesiva de los microorganismos que utilizan hidrocarburos derivados del petróleo como fuente de energía, para demostrar la eficiencia de las tecnologías de biorremediación en suelos y aguas expuestos a concentraciones tóxicas de petróleo (Martín Moreno y cols., 2004).

## OBJETIVO

Aislamiento e identificación de colonias de bacterias tolerantes a petróleo crudo a partir de algunos ríos de la Huasteca Potosina.

## METODOLOGÍA

### Muestras de agua

Se tomaron en recipientes de plástico previamente lavados con ácido sulfúrico al 10% y esterilizados por calor húmedo, muestras de agua (500 mL), de algunos ríos de la Huasteca Potosina: Coy, Amajac, Tamazunchale, Valles, Tamuín, Bancote, La galera y Santa Rosa. Se guardaron en hielera, y se trasladaron al laboratorio y se conservaron en refrigeración hasta su uso.

Aislamiento e identificación de las colonias de bacterias.

De las muestras obtenidas, se sembró por duplicado 1 mL en los siguientes medios selectivos: Klieger, SIM y OF con y sin aceite para pseudomonas, Agar Biggy y tubo germinal para levaduras, además de toda la batería de pruebas bioquímicas para la identificación de Enterobacterias.

### Tolerancia a Petróleo

Se sembraron  $1 \times 10^6$  bacterias/mL en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de medio basal para biodegradadores de petróleo con extracto de levadura al 0.4% y diferentes volú-

menes de petróleo crudo, incubando a 28°C a 100 rpm durante 3 días para las bacterias y 7 días para las levaduras. Posteriormente, se cosechó el líquido en un tubo graduado previamente pesado y se centrifugó a 3 000rpm/10 min, se desechó el sobrenadante y el paquete celular se seca a 80°C, durante 4 h, y se pesó el tubo, determinando por diferencia el peso seco de la muestra, y se comparó el crecimiento con un control crecido en las mismas condiciones sin la adición de petróleo crudo. Todos los experimentos se realizaron mínimo 2 veces por duplicado.

## RESULTADOS

A partir de las diferentes muestras analizadas, se aislaron e identificaron 15 colonias de bacterias y una levadura (Tabla No. 1), siendo la más frecuente *Pseudomonas aeruginosa* (50.0%), seguida de *Escherichia coli* (31.25%) y *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis* y *Candida sp* (6.25%) (Tabla No. 2).

Tabla No. 1.-Colonias de bacterias identificadas en las muestras analizadas.

Fuente (Río)	Colonia Identificada	Total
Amajac-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
Amajac-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Enterobacter aerogenes</i>	2
Bancote-1	<i>Candida sp*</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Proteus mirabilis</i>	3
Bancote-2	<i>Escherichia coli</i>	1
Valles, Planta tratadora-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
Valles, Planta tratadora-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
Valles, Calera-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
Coy, Planta tratadora	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
Amajac/Moctezuma-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i>	2
Amajac/Moctezuma-2	<i>Escherichia coli</i>	1
Santa Rosa-1	<i>Escherichia coli</i>	1
Santa Rosa-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1

\* Levadura

Tabla No. 2.- Frecuencia de microorganismos encontrados

Microorganismo	Número	Porcentaje
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	50.0
<i>Escherichia coli</i>	5	31.25
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	6.25
<i>Proteus mirabilis</i>	1	6.25
<i>Candida sp</i>	1	6.25

Posteriormente, se incubaron en presencia de petróleo crudo las bacterias *P. aeruginosa* (3 días) y la levadura *Candida sp* (7 días), y se les determinó el crecimiento por peso seco, encontrando que todas las bacterias crecen mejor en presencia de petróleo crudo, presentando mayor crecimiento la *P. aeruginosa* aislada del Río Coy, y la de menor crecimiento la del Río Valles (Calera) con un crecimiento de 4.5 (139 mg de peso seco) y 1.0 veces (34 mg de peso seco) respectivamente, con 1 mL de petróleo crudo adicionado al medio de cultivo (Tabla No. 3), mientras que la levadura también crece mejor cuando se adicionan al medio de cultivo diferentes concentraciones (200-1000 µl) diferentes concentraciones de petróleo crudo, con un rango de crecimiento promedio de 1.3 veces y entre 39 y 42.5 mg de peso seco, con respecto al control (Tabla No. 4.)

Tabla No. 3.- Crecimiento en peso seco de *P. aeruginosa* en el medio de cultivo adicionado de 1 mL de petróleo crudo.

P. Aeruginosa	Peso seco (miligramos)	Crecimiento (veces)
Control	31	1.0
1	57	1.9
2	89	2.87
3	59	1.9
4	99	3.2
5	34	1.1
6	139	4.5
7	111	3.6
8	80	2.6

\* 1 x 10<sup>6</sup> bacterias/mL, 3 días de incubación a 28OC, con agitación constante (100 rpm).

Tabla No. 4.- Crecimiento en peso seco de Candida sp en el medio de cultivo adicionado de diferentes volúmenes de petróleo crudo.

Petróleo crudo ( $\mu$ l)	Peso seco (miligramos)	Crecimiento (veces)
0	29.5	1.0
200	39.0	1.32
400	39.5	1.34
600	39	1.32
800	42.5	1.44
1000	40.5	1.37

\*1 x 10<sup>6</sup> levaduras/mL, 7 días de incubación a 28OC, con agitación constante (100 rpm).

#### DISCUSIÓN

Se ha encontrado que el 96% de bacterias aisladas de medios líquidos (lagos, ríos, y lagunas) presentan capacidad de crecer y emulsificar hidrocarburos derivados del petróleo (Leahy y Colwell, 1990), y los resultados obtenidos en este trabajo, demuestran que todas las colonias de P. aeruginosa y la Candida sp, obtenidas crecen eficientemente en el medio líquido adicionado con 1 mL de petróleo crudo, además de emulsificar el medio de cultivo, y los resultados son similares a los obtenidos por Rosenberb y cols., (1992) con cepas Gram negativas puras. La sobrevivencia de las bacterias y la levadura en estas condiciones, sugiere que podrían tener la capacidad de utilizar hidrocarburos alifáticos y aromáticos como fuentes de carbono y/o donadores de electrones (Madigan y cols., (1998), por lo que la siguiente etapa del trabajo es la determinación de alcohol oxidasa en las muestras analizadas.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Atlas, M.R., Horowitz, A., Krichevky, M. and Bej, K.A. 1991. Response of microbial population to environmental disturbance. Microbiol. Ecol. 22: 249-256.
- Bezabel, L., Hadar, Y., and Cerniglia, C.E. 1996. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus Pleorotus ostreatus. Apl. Environ. Microbiol. 62: pp 292-295.
- Bravo Torres, J.C. 1998. Purificación y caracterización parcial de la alcohol oxidasa del hongo YR-1. Tesis Maestría. IIBE. Facultad de Química Universidad de Guanajuato.
- Hino, S.K., Watanabe, K. And Takahassi, H. 1997. Isolation and characterization of slime-producing bacterial capable of utilizing petroleum hydrocarbons as a sole carbon source. J. Ferment. Bioeng. 84: pp 528-531.
- Leahy, J.G. and Colwell, R.R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiol. Rev. 54: 305-315.

- Madigan, M.T., Martinko, J.M. y Parker, J. 1998. Brock. Biología de los Microorganismos. 8ª. Ed. Prentice Hall, Iberia. Madrid, España.
- Martín Moreno, C., González Becerra, A. y Blanco Santos, M.J. 2004. Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos: Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. Rev. Iberoam. Micol. 21: 103-120.
- Pineda-Flores, G. y Mesta-Howard, A.M. 2001. Petroleum, asphaltene generated problematic and possible biodegradation mechanisms. 43, No. 3: pp 143-150.
- Rivera Cruz, M.C., Ferrera-Cerrato, R., Volke Haller, V., Rodríguez Vázquez, R. y Fernández Linares, L. 2002. Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivo enriquecidos con petróleo crudo. Terra: pp 423-434.
- Rosenberg, E., Legmann, R., Kushmaeo, A., Taube, R., Adler, E. and Ron, E.Z. 1992. Petroleum bioremediation a multiphase problem. Biodegradation. 3: 337-350.
- Sugiera, K., Ishihara, M., Shimauchi, T. and Haramaya, S. 1997. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. Environ. Sci. Technol. 31: 45-51.
- Valderrama Blanco, B. 2003. Microbiología del petróleo y sus derivados. Libro Microbios. Cap 2. UNAM. pp 1-10.