



## BIODEGRADACION DE HIDROCARBUROS POR CULTIVOS MIXTOS DEFINIDOS.

Ildelfonso J. Díaz-Ramírez, Ernesto Favela-Torres, Hugo Ramírez-Saad\* y Mariano Gutiérrez-Rojas.

Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

Avenida San Rafael Atlixco 186. Col. Vicentina, México, D.F., Fax 58 04 64 07

\*Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco

e-mail: ijdr@xanum.uam.mx

**Palabras clave:** Cultivo mixto definido, hidrocarburos, biodegradación, DGGE.

**Introducción.** La remediación de suelos contaminados con hidrocarburos aplicando microorganismos degradadores es una estrategia cuyo éxito depende de la capacidad de los microorganismos usados. Muchos consorcios presentan una efectividad menor a la esperada cuando son aplicados en los sitios de interés (1). Una alternativa es el diseño de cultivos mixtos definidos (CMD) especializados en la biodegradación de hidrocarburos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo y sus fracciones por dos cultivos mixtos definidos.

**Metodología. Inóculos utilizados.** Los CMD se diseñaron en base a la predominancia de las poblaciones durante la biodegradación, analizada por electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE). Las cepas bacterianas se aislaron previamente y corresponden a: *Bacillus cereus* (Bc1A), *Pseudomonas* sp. (Ps2AP), *Gordonia rubripertincta* (Gr3A), *Bacillus subtilis* (Bs7A), *Bacillus subtilis* (Bs9A) y U10AP (No identificada). Se utilizó una mezcla estandarizada para preparar los CMD (2). Se probaron: a) CMD B (seis cepas) y b) CMD C (tres cepas).

**Ensayos de biodegradación.** Se realizaron en botellas (250 mL) con 45 mL de medio mineral e hidrocarburos totales (HT) como fuente de C (10 000 mg L<sup>-1</sup>). Se determinó el consumo de O<sub>2</sub> y la producción de CO<sub>2</sub>. Al final de los ensayos se extrajeron los hidrocarburos residuales y se fraccionaron por cromatografía en columna.

**Análisis de la dinámica de poblaciones por DGGE.** Se aisló el DNA al final de los ensayos de biodegradación (3). Posteriormente, se amplificó por PCR el fragmento correspondiente a las regiones variables V6 a V8 del gen 16S rDNA. La obtención de los perfiles genómicos se realizó por DGGE (gradiente de 44%/54%, 16h a 85V (3)).

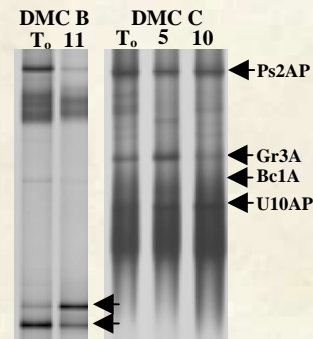
**Resultados y Discusión.** Después de 11 días de cultivo con el CMD B se alcanzó un nivel de biodegradación de HT de alrededor del 40% (Tabla 1). Este valor es superior al reportado con cultivos mixtos (11%) en (4). De acuerdo a los resultados (Tabla 1), la fracción alifática fue la más consumida, seguida de la aromática y polar. Estos valores fueron superiores a los obtenidos anteriormente con un cultivo similar compuesto por 10 cepas bacterianas (2). Esto representa un mejoramiento en la eficiencia debido posiblemente al establecimiento de interacciones positivas entre las cepas del CMD B. De acuerdo a los perfiles genómicos (Figura 1) las cepas Ps2AP, Gr3A y U10AP predominaron al final del cultivo por lo que se seleccionaron para constituir el CMD C.

Con el CMD C se registró una biodegradación (Tabla 1) menor al 30% después de 10 días de cultivo. El consumo de alifáticos fue del 41%, mientras para aromáticos y polares fue menor al 6%. Tanto la biodegradación como la tasa de consumo de HT fueron menores que las obtenidas con el CMD B. El consumo de la fracción polar fue de alrededor del 20%, mientras que con el CMD C fue menor al 3%. Las fracciones aromática y polar del petróleo se han señalado como difíciles de degradar, en este caso, su remoción posiblemente se debió a co-oxidación en presencia de alifáticos de fácil consumo.

**Tabla 1.** Biodegradación (B) y tasas de biodegradación (TB) de hidrocarburos totales y las fracciones al final de los ensayos con el CMD B y CMD A. Promedios y desviaciones estándar de tres repeticiones.

Hidrocarburos	DMC B		DMC C	
	B (%)	TB (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	B (%)	TB (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
HT	40.5 ± 1.5	366.7 ± 15.4	27.7 ± 0.4	280.8 ± 4.1
Alifáticos	46.4 ± 2.0	282.2 ± 10.8	41.2 ± 0.6	271.1 ± 4.3
Aromáticos	31.0 ± 4.7	66.6 ± 7.5	5.6 ± 0.3	13.3 ± 0.7
Polares	19.6 ± 2.2	14.6 ± 1.5	2.0 ± 0.2	2.5 ± 0.3

Los perfiles genómicos (Figura 1) mostraron que las cepas Ps2AP, Gr3A y U10AP predominaron durante el cultivo con HT. Los resultados indican que la reducción de seis cepas (CMD B) a tres (CMD C) no mejoró significativamente la capacidad de biodegradación de HT por el CMD C. Sin embargo, este inóculo fue capaz de degradar la fracción aromática y polar.



**Figura 1.** Perfiles genómicos de DGGE (región V6-V8 del 16S rDNA), para el CMD B y el CMD C en los ensayos con HT.

**Conclusiones.** Con los cultivos mixtos definidos probados se alcanzaron tasas de biodegradación entre 280 y 366 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Los mayores niveles de biodegradación se alcanzaron con el CMD B constituido por seis cepas. El análisis de los perfiles genómicos obtenidos durante el proceso de biodegradación permitió la selección de cepas predominantes para la preparación de cultivos mixtos definidos con potencial aplicación en sitios contaminados con hidrocarburos

**Agradecimientos.** CONACyT (Beca No 121935) y PEMEX-Refinación.

### Bibliografía.

- Ko, S. H. y Lebeault, J. M. 1999. Effect of a mixed culture on co-oxidation during the degradation of saturated hydrocarbon mixture. *J. Appl. Microbiol.* 87: 72-79.
- Díaz-Ramírez, I. J., Gutiérrez-Rojas, M., Ramírez-Saad, H., y Favela-Torres, E., 2003. Biodegradation of Maya crude oil fractions by bacterial strains and a defined mixed culture isolated from *Cyperus laxus* rhizosphere soil in a contaminated site. *Can. J. Microbiol.* 49: 755-761.
- Muyzer G., Hottenträger S., Teske A., y Wawer C. 1996. DGGE of PCR-amplified 16S rDNA- A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. *Molecular Microbial Ecology Manual* 3.4.4.: 1-23.
- Oudot, J. 2000. Biodégradabilité du fuel de l'Erika. *C. R. Acad. Sci. Paris. Sciences de la vie.* 323: 945-950.