

OBTENCION DE CEPAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS POR CULTIVO DE ENRIQUECIMIENTO EN MEDIO LÍQUIDO Y SÓLIDO.

Ildelfonso Díaz Ramírez, Hugo Ramírez Saad*, Mariano Gutiérrez y Ernesto Favela.

Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

Avenida Michoacán y la Purísima s/n Col. Vicentina, México, D.F., Fax 58-04-47-12

*Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco

e-mail: ijdr@xanum.uam.mx

Palabras clave: rizósfera, hidrocarburos, degradación, enriquecimiento.

Introducción. Uno de los factores limitantes para la mineralización de mezclas de hidrocarburos es la incapacidad de los microorganismos presentes para metabolizar fracciones con estructuras químicas complejas como aromáticos y polares (1). Muchos cultivos mixtos pueden degradar petróleo crudo pero rara vez consumen más del 50% (2). Las dos estrategias principales para el aislamiento de microorganismos son el aislamiento en placa y en cultivos sucesivos o de enriquecimiento, en ambos casos se proveen condiciones (fuente de C, concentración de sales o pH), que favorezcan el crecimiento de los microorganismos de interés (3).

El objetivo de este trabajo fue aislar cepas microbianas capaces de biodegradar fracciones específicas de hidrocarburos, a partir de la rizósfera de *Cyperus Laxus* Lam. (planta nativa de un sitio contaminado con hidrocarburos).

Metodología. El cultivo de enriquecimiento se llevó a cabo en botellas de 500 mL en medio líquido (ML) y sólido (MS). El inóculo se tomó de una suspensión de suelo rizosférico (200g) de *Cyperus Laxus* Lam. Como únicas fuentes de carbono se adicionaron hidrocarburos alifáticos (6000 ppm) y una mezcla de aromáticos/polares (4000 ppm, 2:1). Estos se obtuvieron por fraccionamiento en columna a partir de crudo Maya pretratado térmicamente. Para los cultivos en MS se empleó agrolita como soporte (6.4g/botella, y humedad de 80%), añadiéndose los hidrocarburos solubilizados en Hexano, se evaporó el solvente y el material se esterilizó. Para el cultivo en ML se adicionaron 45 mL de medio mineral/botella. En los dos tipos de cultivo el inóculo fue de 1.0×10^5 (bacterias) y 1.9×10^4 (hongos) UFC/mL de medio de cultivo. El enriquecimiento se realizó transfiriendo un inóculo del 10%: 5 mL para ML y 3.4 g (materia húmeda) para MS. El consumo de O_2 se realizó de forma continua en un equipo de respirometría. Como criterio de transferencia durante el enriquecimiento se consideró el punto en el que se alcanzó la velocidad máxima de consumo de O_2 . Al final de cada etapa de cultivo se determinó la cuenta viable para bacterias (medio AST) y hongos (medio PDA).

Resultados y Discusión. En la Figura 1 se muestra la cinética de consumo de oxígeno durante el enriquecimiento en ML y

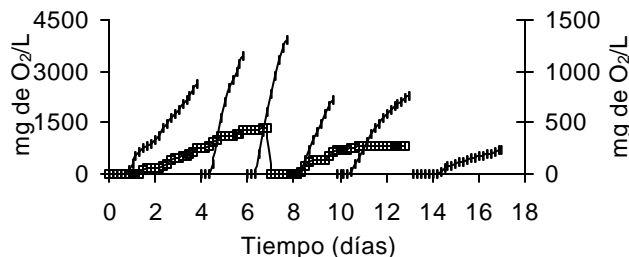


Figura 1. Consumo de O_2 durante el enriquecimiento en medio líquido (") (eje izquierdo) y sólido (►) (eje derecho), con alifáticos como fuente de carbono. Cada curva representa una etapa consecutiva de cultivo.

MS con alifáticos como fuente de carbono. En la primera etapa de enriquecimiento tanto en ML y MS se presentó una fase de adaptación de 20 y 36 h respectivamente, esta fase se redujo en las etapas posteriores. En medio líquido la velocidad máxima de

consumo de O_2 (segunda etapa de enriquecimiento) fue de 152.6 mg de $O_2/L \cdot h$ y 5.26 mg de $O_2/L \cdot h$ en ML y MS, respectivamente. El comportamiento observado en MS posiblemente se debe a una baja biodisponibilidad de los hidrocarburos.

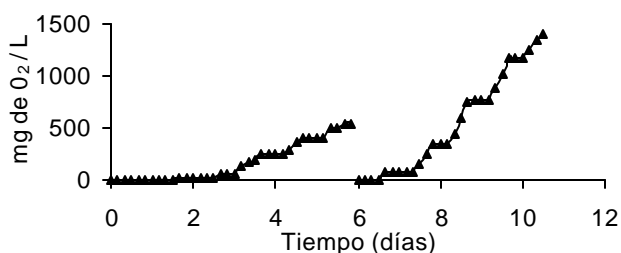


Figura 2. Consumo de O_2 durante el enriquecimiento en medio líquido (") con aromáticos/polares como fuente de carbono.

En la Figura 2 se presenta el consumo de O_2 en ML con la mezcla de aromáticos y polares, se observa que la fase de adaptación fue más larga (1.6 veces) que la obtenida con alifáticos, además el consumo máximo de oxígeno fue 3 veces menor que con alifáticos, la velocidad máxima de consumo fue de 32 mg de $O_2/L \cdot h$. En MS con la misma fuente de C se presentó un consumo inferior a los 100 mg de O_2/L (datos no mostrados). La diferencia en el consumo de oxígeno entre alifáticos y aromáticos/polares puede deberse a la toxicidad y/o recalcitrancia de esta última fracción (2). Las cuentas viables de bacterias en ML, con alifáticos y aromáticos/polares se mantuvieron en valores alrededor de 1×10^8 y 6×10^6 UFC/mL respectivamente. Se aislaron 12 cepas bacterianas y 2 hongos filamentosos a partir de los cultivos en ML y MS.

Conclusiones. El análisis de la velocidad máxima de consumo de O_2 resultó un criterio adecuado para la transferencia del cultivo (enriquecimiento). Con este método fue posible aislar microorganismos capaces de utilizar como fuente de C alifáticos o aromáticos/polares tanto en ML como MS. Con las cepas aisladas será posible diseñar cultivos mixtos definidos, así como analizar la composición de las comunidades enriquecidas por medio de la detección de huellas digitales genómicas.

Agradecimientos. Este trabajo fue financiado por CONACyT y PEMEX refinación.

Bibliografía.

1. Van der Mer, J., De Vos, W., Harayama, S., y Zehnder, A. 1992. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds, *Microb. Rev.*, 56:4: 677-694.
2. Venkateswaran, K. y Harayama, S. 1995. Sequential enrichment of microbial populations exhibiting enhanced biodegradation of crude oil, *Can. J. Microbiol.*, 41: 767-775.
3. Atlas, R. y Bartha, R. 1998. *Quantitative Ecology*. En: *Microbial Ecology. Fundamentals and Applications*, Fourth edition, Ed. Addison Wesley Longman, Inc. New York, p.p. 218-227.