



Design and *in vitro* application of hydrocarbon degrading microbial consortia

Diseño y aplicación *in vitro* de consorcios microbianos degradadores de hidrocarburos

María de los Ángeles Romero-Bañuelos¹, Adán Topiltzin Morales-Vargas², Varinia López-Ramírez^{1*}

¹Coordinación de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato Carretera Irapuato-Silao Km 12.5 Irapuato, Guanajuato, México 36821.

²Departamento de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato, Mutualismo 303 Celaya, Guanajuato, México.

*Corresponding author

E-mail address: valopez@itesi.edu.mx (V. López-Ramírez)

Article history:

Received: 23 April 2018 / Received in revised form: 10 July 2018 / Accepted: 27 July 2018 / Published online: 1 October 2018.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2018.3.4.33>

ABSTRACT

The petrochemical industry has negatively affected the environment due to the polluting compounds that it emits, among them the hydrocarbons are considered the most toxic. However, bioremediation presents viable techniques for decontamination of the places affected by these compounds, such as bioaugmentation using microorganisms with degrading ability to reduce the concentration of contaminating compounds. In this study, we designed six different microbial consortia that presented an optimal and variable preference for hydrocarbon degradation. For instance, one consortium for the degradation of naphthalene and other for diesel, through confrontation tests between isolates that were previously collected from the Lerma River in Salamanca (Guanajuato, Mexico), and a clandestine take of gasoline in Pueblo Nuevo, Guanajuato. These consortia are proposed so that they can be applied in the future for soil bioremediation *in situ*.

Keywords: Bioaugmentation, hydrocarbon degradation, microbial consortia, microbial antagonism and mutualism.

RESUMEN

La industria petroquímica ha afectado de forma negativa al medio ambiente por los compuestos contaminantes que emite, entre ellos se encuentran los hidrocarburos, los cuales se consideran tóxicos. Sin embargo, la biorremediación es una alternativa viable para la descontaminación de sitios afectados por estos compuestos, la bioaumentación, por ejemplo, emplea microorganismos con capacidad degradadora y logra disminuir la concentración de los compuestos contaminantes. En este estudio se diseñaron seis consorcios microbianos a través de ensayos de confrontación entre cepas aisladas del Río Lerma de Salamanca (Guanajuato, México) y de una toma clandestina de gasolina en Pueblo Nuevo, Guanajuato. Los consorcios evaluados presentaron capacidad de degradar hidrocarburos, dos consorcios particularmente fueron seleccionados por su capacidad para degradar naftaleno y diésel. Los consorcios microbianos diseñados en este trabajo, se proponen para que en un futuro puedan ser aplicados en biorremediación de suelos *in situ*.

Palabras clave: Bioaumentación, consorcios microbianos, degradación de hidrocarburos, antagonismo y mutualismo microbiano.

1. INTRODUCCIÓN

Hasta ahora, la industria petrolera es la principal proveedora de energía en México. Sin embargo, la frecuencia de incidentes como derrames de contaminantes en el océano por plataformas petroleras, en suelo, como lo son las tomas clandestinas y el mal manejo y uso de los combustibles derivados del petróleo, afectan al medio ambiente de forma negativa. El estado de Guanajuato cuenta con un corredor industrial, en el cual, se encuentra la refinería “Ing. Antonio M. Amor” en el municipio de Salamanca. Esto ha repercutido en el ecosistema, dado a que el río Lerma que corre cerca de dicha refinería, ha sido utilizado en diversas ocasiones como vertedero de residuos y se considera que presenta niveles altos de contaminación (Ortíz, 2017). Las tomas clandestinas de gasolina también son de importante relevancia ecológica, debido a que su explotación puede afectar los terrenos aledaños, por el constante flujo de combustible que se derrama, tal es el caso del municipio de Pueblo Nuevo, Guanajuato. Los hidrocarburos son considerados compuestos contaminantes, debido a su toxicidad, pues son capaces de interferir en distintos niveles de la cadena trófica en un ecosistema, provocando cambios en procesos fisiológicos y reproductivos de los organismos que en él habitan (Ameen *et al.*, 2016). La biorremediación ofrece técnicas capaces de remover de los ambientes sustancias que son contaminantes, como los hidrocarburos. Por su parte, la bioaumentación involucra la aplicación de microorganismos con capacidad degradadora de compuestos contaminantes, en los sitios afectados (Wu *et al.*, 2016). Este tipo de técnicas tienen la ventaja de afectar en menor medida el medio ambiente, ya que en su aplicación se emplean microorganismos nativos y por ello representa una opción menos invasiva. La capacidad de degradación en la bioaumentación puede mejorarse, si se emplean consorcios microbianos, ya que, al interactuar los microorganismos, la capacidad metabólica de los consorcios se aprovecha y los productos del mismo generan compuestos bioasimilables para el medio ambiente donde se encuentran. En este estudio, se emplearon seis consorcios microbianos conformados por tres cepas cada uno, previamente aisladas del Río Lerma de Salamanca, Guanajuato

(García-Cedillo & Morales-Vargas, 2015) y de una toma clandestina ubicada en el municipio de Pueblo Nuevo, Guanajuato (Álvarez-Mejía *et al.*, 2016), tres de los consorcios empleados (C1, C2, y C3) fueron previamente diseñados y probados en medio líquido mineral suplementado con hidrocarburos (Gutiérrez-Amézquita & López-Ramírez, 2016) y el diseño de los consorcios C4, C5 y C6 fue parte de este estudio. Se propuso como objetivo de este estudio, determinar de manera cualitativa si los consorcios C1, C2, C3, C4, C5 y C6 presentaban la capacidad para degradar naftaleno y diésel *in vitro*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Microorganismos utilizados

Se emplearon 29 cepas microbianas previamente aisladas de una toma clandestina de gasolina en Pueblo Nuevo y de los márgenes del río Lerma en Salamanca, Guanajuato, (García-Cedillo & Morales-Vargas, 2015; Álvarez-Mejía *et al.*, 2016), y que forman parte del cepario del Laboratorio de Diversidad e Interacción Microbiana (LDIM), perteneciente a la Coordinación de Ingeniería Bioquímica del Instituto Tecnológico Superior de Irapuato.

Las cepas se inocularon en medios nutritivos como PDA (Agar Papa Dextrosa, BD Dixon[®]), YPD (yeast extract-peptone-dextrose, Fisher Scientific[®]) y Agar nutritivo, para hongos, levaduras y bacterias, respectivamente (Tabla 1). Se incubaron de 1 a 4 días a 28°C.

Tabla 1. Cepas correspondientes a los microorganismos empleados.

Bacterias	SA1-1, SA1-4, SA1-8, SA1-9, SA1-11, SA1-12, SA1-13, SA1-14, SA1-15, SA2-6, SA2-7, SA3-1, SA3-3, SS2-8, SS2-9, SS3-1, AG2, AG3, AG4, AG8, AG13, AG15
Hongos	M2, M12, M20, M38
Levaduras	C10, C15, C16

2.2 Pruebas de actividad antagonista

2.2.1 Confrontación de hongos-bacterias y hongos-levaduras

Se realizaron pre-inóculos de las bacterias y levaduras señaladas en la Tabla 1, en medio nutritivo líquido y YPD líquido respectivamente, se incubaron a 28°C por 48 horas a 130 rpm. Se tomaron 100 µL de cada pre-inóculo y fueron sembrados con la técnica de extensión por superficie en placas de PDA, sobre esta siembra, se colocó un trozo de cada aislado fúngico mencionado en la Tabla 1, con un sacabocados de 5 mm de tal manera que en todos los ensayos se consiguiera el mismo orden (Fig. 1). Las placas fueron incubadas a 28°C, hasta visualizar la presencia de halos de inhibición.

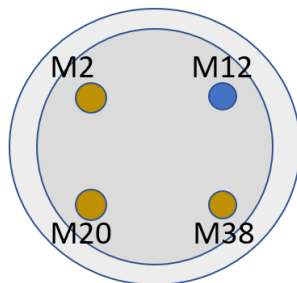


Fig. 1. Distribución de los inóculos fúngicos en las confrontaciones.

2.2.2 Confrontación de bacterias-levaduras

Previo a nuestro estudio, las relaciones antagónicas entre cepas de bacterias y levaduras con capacidad degradadora de hidrocarburos fueron evaluadas (Gutiérrez-Amézquita & López-Ramírez, 2016) siguiendo el protocolo previamente reportado (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2013). En este trabajo se incorporaron 5 cepas microbianas más al análisis (Tabla 2), las cuales se sometieron a confrontaciones con las cepas evaluadas previamente. Las confrontaciones se realizaron utilizando la técnica de punto césped, en la cual, 5 ml de pre-inóculos cultivados en caldo nutritivo (bacterias) y en caldo YPD (levaduras), incubados a 28°C por 48 horas a 120 rpm, se mezclaron con 20 ml de agar nutritivo atemperado. Una vez solidificado el medio, se colocaron sobre el 10 μ L de pre-inóculos bacterianos y de levaduras de manera ordenada (Fig. 2), los ensayos fueron incubados a 28°C por 48 h o hasta observar la presencia de halos de inhibición.

Tabla 2. Bacterias y levaduras añadidas al cepario.

Bacterias	SA1-11, SA2-7, SS2-8
Levaduras	C15, C16

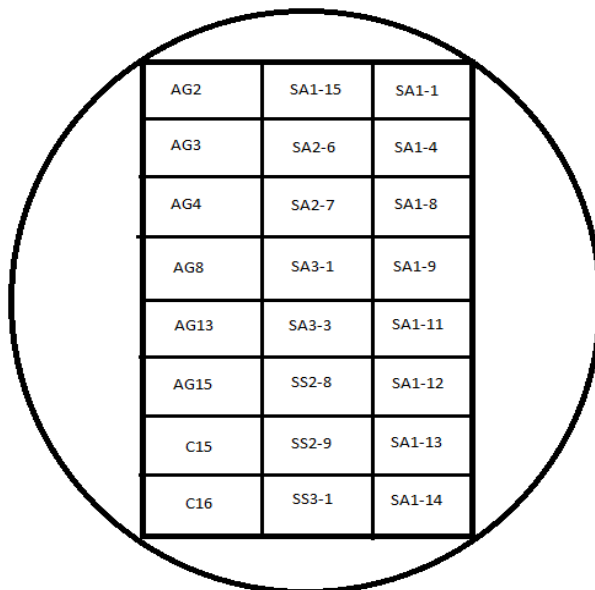


Fig. 2. Distribución de pre-inóculos en las cajas sembradas con la técnica de punto en césped, para la determinación de las relaciones antagonicas entre bacterias y levaduras.

2.3 Diseño de consorcios microbianos

Los consorcios microbianos fueron diseñados en base en los resultados de las relaciones antagonicas y mutualistas, procurando que las características de los aislados, como género, morfología y/o respuesta a la tinción de Gram, fueran diferentes entre aquellos que conformaban el consorcio, con la finalidad de evitar duplicidad de especies dentro de los mismos, dado a que no se contaba con la caracterización molecular de todos los aislados.

2.4 Ensayos de degradación *in vitro*

2.4.1 Preparación de inóculo

Para determinar la cantidad de microorganismos inoculados y su viabilidad a lo largo de los ensayos, se determinaron las unidades formadoras de colonia (UFC) a las 0, 144 y 288 horas para los consorcios C4 y C5, mientras que para los consorcios C1, C2, C3 y C6 se realizó el conteo a 0, 168 y 648 horas, los consorcios 4 y 5 fueron tratados por separado, debido a su composición (aislados fúngicos), estableciendo tiempos de exposición del ensayo de 2 y 5 semanas respectivamente, basados en metodología propuesta por Wu *et al.* (2016). Para la determinación de las UFC de los inóculos iniciales, se hizo el conteo de colonias de la dilución 10^{-5} de los pre-inóculos bacterianos y de levaduras en medio sólido

Luria Bertani (LB), se incubaron a 28°C durante 48 a 72 horas. Para los inóculos fúngicos se realizó el conteo de esporas en cámara de Neubauer. Las diluciones se llevaron cabo en medio Bushnell-Hass (Bushnell & Haas, 1940).

2.4.2 Inoculación

Para los ensayos de degradación *in vitro* se aplicaron los consorcios, C1, C2, y C3 (Tabla 3) diseñados previamente y los diseñados en este estudio (C4, C5 y C6), así como, individualmente, cada una de los aislados que los componen. Cada consorcio o aislado se probó en 20 g de suelo estéril humedecido con 4 ml de agua estéril (Wu *et al.*, 2016) y contaminado con 100 µL diésel y en el caso del naftaleno con 0.1 g, cada aplicación se homogeneizó cada 5 días con agitadores de vidrio estériles.

Tabla 3. Aislados empleados en los consorcios propuestos por Gutiérrez-Amézquita & López-Ramírez (2016)

Consorcio	Aislado	Género
C1	SA1-1	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
	SS3-1	<i>Enterobacter sp.</i>
	AG13	<i>Citrobacter freundii</i>
C2	SA1-15	<i>Providencia rettgeri</i>
	AG2	<i>Esnterobacter sp.</i>
	SA3-3	<i>Providencia rettgeri</i>
C3	SA1-12	<i>Pseudomona aeruginos</i>
	SA1-15	<i>Providencia rettgeri</i>
	SS2-9	<i>Enterobacter sp.</i>

En el caso de los consorcios se adicionaron 70 µL de cada pre-inóculo correspondiente a las 3 cepas que lo integraban, para alcanzar un volumen final de 210 µL. Mientras que, para los ensayos con las cepas individuales, se adicionaron 210 µL de pre-inóculo. Cada ensayo se realizó por duplicado. Como controles se establecieron suelo contaminado con diésel y suelo contaminado con naftaleno.

2.4.3 Evaluación cualitativa de la degradación de naftaleno y diésel

La determinación cualitativa de la degradación de hidrocarburos se llevó a cabo observando la concentración que presentaban a lo largo del ensayo, para ello, se tomó 0.1 g de suelo de cada ensayo y se colocó en tubos Eppendorf nuevos y estériles, se les añadió 1 ml de diclorometano (DCM) Golden Bell^{RM}, para realizar la extracción del hidrocarburo, posteriormente se agitó la muestra vigorosamente por 3 minutos y se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos. La fase orgánica se depositó en tubos nuevos y estériles y sobre un papel filtro (Whatman No. 5), se depositaron 10 µL del extracto con DCM dejando secar cada vez por dos ocasiones sobre el mismo punto del papel. En una cámara cromatográfica se colocaron 6 perlas de yodo metálico (Fermont[®]), se introdujo el papel filtro y se expuso a los vapores de yodo por 1 min. Se observó la intensidad de la mancha develada en el papel filtro, la cual se debe a la reacción que existe entre los hidrocarburos y el yodo metálico.

3. RESULTADOS

3.1 Pruebas de actividad antagónica

La evaluación de las relaciones antagónicas entre aislados, mostraron que los microorganismos analizados presentan mayormente relaciones mutualistas entre sí, es decir, el crecimiento de los aislados es favorable al observarse una interacción entre los aislados (Fig. 3).

	SA1-11	SA2-7	SS2-8	C15	C16	M2	M12	M20	M38
SA1-1									
SA1-4									
SA1-8									
SA1-9									
SA1-11									
SA1-12									
SA1-13									
SA1-14									
SA1-15									
SA2-6									
SA2-7									
SA3-1									
SA3-3									
SS2-8									
SS2-9									
SS3-1									
AG2									
AG3									
AG4									
AG8									
AG13									
AG15									
C15									
C16									

Fig. 3. Relaciones antagónicas entre los aislados. En color verde se muestran las relaciones antagónicas, mientras que en color gris se representan las mutualistas.

3.2 La diversidad metabólica se aseguró en la selección de aislados que constituían los consorcios microbianos

Para asegurar la diversidad microbiana y con ello el mayor aprovechamiento de los mecanismos metabólicos de cada aislado, se procuró que los consorcios estuvieran conformados por cepas de diferente género (Tabla 4).

Tabla 4. Consorcios microbianos propuestos.

Consortio	Aislado	Descripción de los aislados
4	AG2	<i>Enterobacter sp.</i>
	M12	N/I
	SS2-8	coccobacilli Gram (-)
5	AG3	<i>Pseudomonas sp.</i>
	M20	N/I
	SA2-7	<i>Alcanivorax sp.</i>
6	SA2-6	<i>Providencia sp.</i>
	C15	N/I
	SS2-9	cocoGram (-)

N/I: Cepa no Identificada.

3.3 Los consorcios microbianos evaluados son selectivos a la degradación de hidrocarburos

En este estudio, determinamos que los consorcios que presentaron mejor degradación para diésel y naftaleno fueron los C2 y C6 (Fig. 4) respectivamente, mostrando el mayor decremento en la intensidad de la concentración develada en la reacción yodo-hidrocarburo en comparación con el control, esta evaluación cualitativa debe de ser cuantificada para establecer el porcentaje de remoción específica en cada combinación probada.

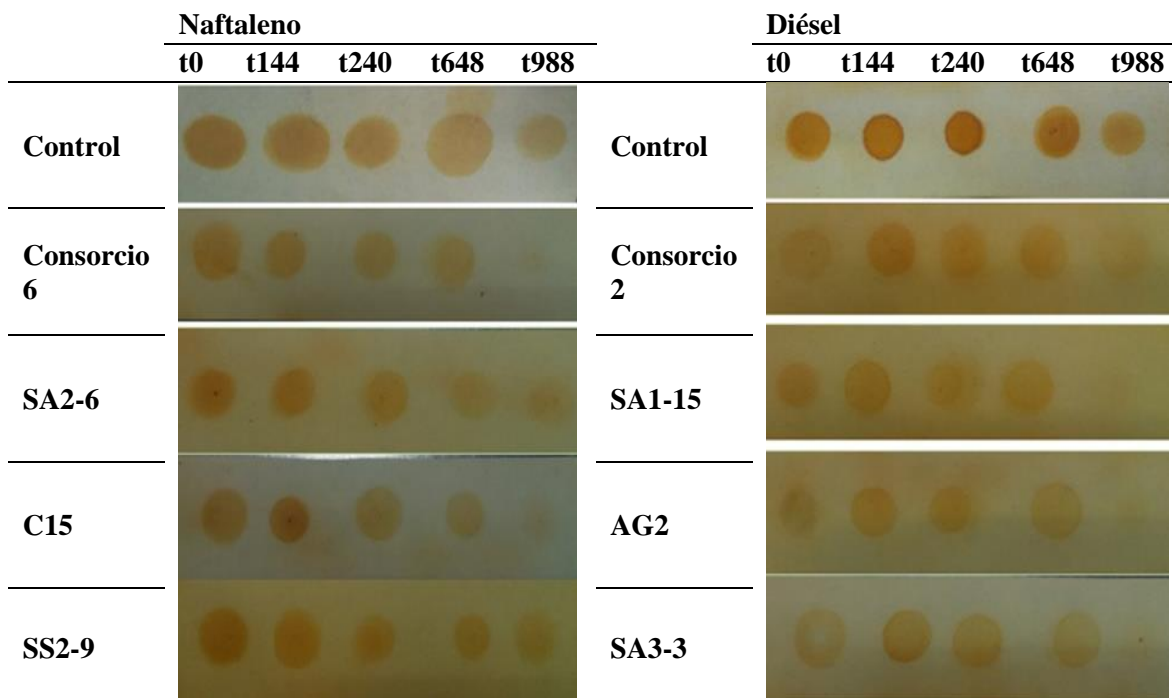


Fig. 4. Evaluación cualitativa de la degradación de naftaleno y diésel por consorcios microbianos.

3.4 Conteo celular

En la figura 5 se puede apreciar el crecimiento microbiano de los ensayos presentados en la figura 4. Los aislados al estar integrados como consorcio presentaron mayor crecimiento que cuando se encuentran como cepas individuales, este comportamiento se destaca principalmente en el consorcio 6 que presentó crecimiento hasta las 648 horas. Mientras que el consorcio 2, la población microbiana sufre un decremento sustancial a partir de las 144 horas.

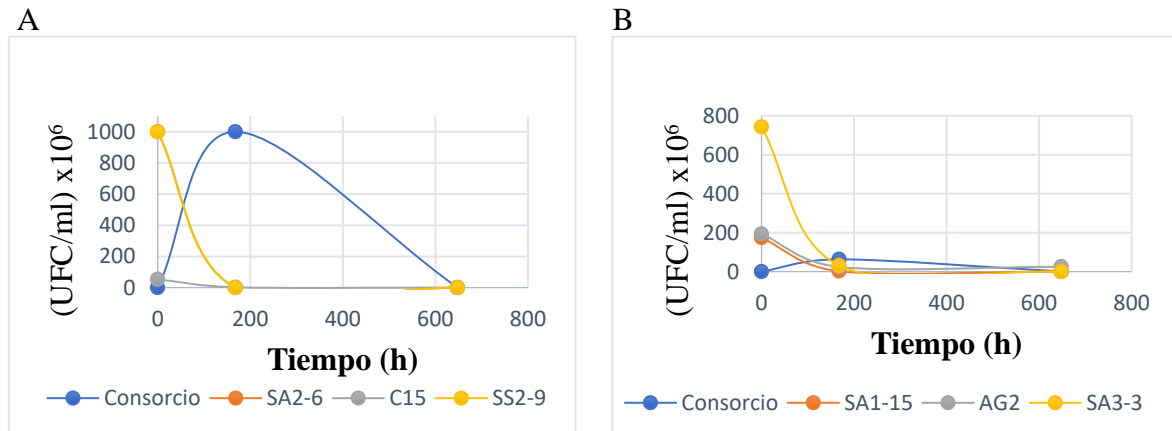


Fig. 5. Crecimiento microbiano; A) Consorcio 6 en presencia de naftaleno y B) Consorcio 2 en presencia de diésel.

4. DISCUSIÓN

La aplicación *in vitro* de organismos degradadores de hidrocarburos es una alternativa para la remoción de dichos contaminantes. A través de la bioaumentación, el tiempo de remoción de los hidrocarburos se reduce sin afectar el entorno. Por ello, en este trabajo el tiempo de exposición fue de 5 semanas, con resultados favorables para la remoción de dos contaminantes de diferente naturaleza, como son el diésel y el naftaleno. Las capacidades metabólicas de los aislados que integran el consorcio permiten que se aproveche el contaminante como fuente de carbono, demostrando mayor viabilidad de los aislados cuando se encuentran en conjunto que cuando se inocularon de forma individual, ya que el decremento en la intensidad de las reacciones con yodo fue más notorio.

En reportes previos el tiempo de exposición de los aislados con hidrocarburo totales de petróleo fue de hasta por 10 semanas (Wu *et al.*, 2016). En nuestro caso, fue posible determinar viabilidad de las cepas y de forma cualitativa la reducción de los contaminantes en un periodo menor, gracias a la diversidad microbiana empleada.

Por otra parte, se ha determinado que microorganismos que son aislados de suelo contaminado por hidrocarburos, presentan la capacidad de degradar dichos compuestos (Chaîneau *et al.*, 1999). En este trabajo empleamos microorganismos aislados de sitios donde recurrentemente persiste la presencia de hidrocarburos (Álvarez-Mejía *et al.*, 2016).

En las confrontaciones entre aislados microbianos realizadas en este estudio fue posible determinar un amplio catálogo de relaciones mutualistas, lo cual representa la posibilidad de poder generar un mayor número de consorcios microbianos con capacidad degradadora de hidrocarburos y probar su eficiencia *in situ*, con el fin de mitigar el impacto ambiental que causan los derrames de hidrocarburos en suelo.

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Investigación del Instituto Tecnológico Superior de Irapuato por el apoyo financiero para llevar a cabo este proyecto. A los compañeros de trabajo que mostraron actitud solidaria y apoyaron en el montaje de los ensayos.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Álvarez-Mejía C., Aguirre-Gómez E., Navarro-Gallardo A., & López-Ramírez V. 2016. Degradación microbiana de gasolina en suelos agrícolas de Pueblo Nuevo, Guanajuato. *Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias*. 3(8): 24–32.

Ameen F., Moslem M., Hadi S., & Al-Sabri A. 2016. Biodegradation of diesel fuel hydrocarbons by mangrove fungi from Red Sea Coast of Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 23(2): 211–218.

Bushnell, L. & Haas, H. 1940. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *Kansas Agricultural Experiment Station*, 653-673.

Chaîneau C., Morel J., Dupont J., Bury E., & Oudot J. 1999. Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. *Science of the Total Environment*. 227(2–3): 237–247.

Gutiérrez-Amézquita M., López-Ramírez V. 2016. Diseño y generación de un consorcio microbiano para la degradación de hidrocarburos en suelo y cuerpos de agua. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico Superior de Irapuato. Irapuato, Guanajuato. México.

García-Cedillo C., Morales-Vargas, A. T. 2015. Degradación diferencial de hidrocarburos por cepas de levadura aisladas del Río Lerma en Salamanca, Guanajuato. Irapuato. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico Superior de Irapuato. Irapuato, Guanajuato. México.

Ortíz, F. 2017. Confirma CONAGUA que PEMEX contamina río Lerma, Salamanca, Guanajuato. *El salamantino*, México, <http://salmantino.mx/2017/02/01/confirma-conagua-que-pemex-contamina-rio-lerma/>, Guanajuato, México, (consultado diciembre 1, 2017).

Pérez-Gutiérrez R., López-Ramírez V., Islas, A., Alcaraz, L. D., Hernández-González, I., Luna Olivera, B. C., Eguiarte, L., Souza, V., Travisano, M., Olmedo-Álvarez, G. 2013.

Antagonism influences assembly of a *Bacillus* guild in a local community and is depicted as a food-chain network. *The ISME Journal*. 7: 487–497.

Wu, M., Dick, W. A., Li, W., Wang, X., Yang, Q., Wang, T., Xu, L., Zhang, M., Chen, L. 2016. Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 107: 158–164.