Estudio del desarrollo de comunidades bacterianas degradadoras de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) adsorbidos sobre modelos de suelo

Ana Mari López
CINDEFI (CONICET-UNLP) Facultad de Ciencias Exactas
lopezana@biotec.org.ar
Director: Maria Teresa Del Panno Codirector: Osvaldo M. Yantorno

Resumen

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) son contaminantes ambientales de relevancia por su toxicidad, mutagénesis y carcinogénesis. El principal proceso de degradación de estos compuestos en el ambiente es realizado por los microorganismos, implicando la selección de poblaciones con capacidades degradadoras especificas.
La biodegradación de PAH en suelo se encuentra marcadamente afectada por su baja biodisponibilidad, debido a la baja solubilidad en agua y tendencia a adsorberse fuertemente a la materia orgánica del suelo. Conforme aumenta el tiempo de residencia, se vuelven menos disponibles. Este "envejecimiento" es conocido como uno de los principales factores que gobiernan las rutas y transporte de los PAH en suelo.
Con el fin de conocer el comportamiento de las comunidades microbianas degradadoras en ambientes crónicamente contaminados con PHA, el proyecto propone el estudio de modelos sencillos, representando al suelo mediante diferentes soportes con distintas capacidades de adsorción de PAH.
El seguimiento del establecimiento y desarrollo de las comunidades microbianas degradadoras se realizará a través del estudio de los cambios estructurales (PCR-DGGE) y fisiológicos (Actividad de enzimas especificas; perfil fisiológico por ECO-plate, ®BIOLOG). Mediante la técnica de espectroscopía infrarroja se estudiará la evolución de poblaciones sésiles y planctónicas y el establecimiento *in situ* del biofilm bacteriano sobre los modelos de suelo-PAH.

Palabras claves: modelo de suelo, PAH, comunidades microbianas, PCR-DGGE, FT-IR

Introducción

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH), son contaminantes ambientales ubicuos producidos durante la combustión de compuestos fósiles y otros procesos antropogénicos. Debido a sus propiedades tóxicas, mutagénicas y carcinogénicas producen un severo impacto sobre la salud humana y ambiental (Kulhanek y col., 2005; Morelli y col., 1999; Pieper S, 2004). Consecuentemente, su remoción del ambiente es actualmente una prioridad.
En el ambiente, estos contaminantes se encuentran frecuentemente adsorbidos a las partículas de suelo, disueltos en una fase liquida no acuosa (NALP) representada como "gotas" o films en la superficie del suelo o, como fase libre en aguas subterráneas de sitios contaminados (Wild y Jones, 1995; Alexander M., 2000). El principal proceso de degradación de PAH en el ambiente es realizado por los microorganismos, implicando la selección de poblaciones con capacidades degradadoras especificas (Del Panno y col., 2005; Wattiau, P., 2000) .
La degradación de los PAH en suelos se encuentra marcadamente afectada por la baja biodisponibilidad de estos compuestos debido a la baja solubilidad en agua y a la tendencia a adsorberse fuertemente a la materia orgánica del suelo. Conforme aumenta el tiempo de residencia en el suelo, los PAH se vuelven menos disponibles. Este "envejecimiento" es conocido como uno de los principales factores que gobiernan las rutas y el transporte de los PAH en suelo (Swindell y Reid, 2006; Sabate y col., 2006).
Por estos motivos el éxito de la biorremediación de un suelo contaminado con PAH puede requerir la aplicación de estrategias especiales. Una de estas estrategias es el uso de bacterias degradadoras de PAH con capacidades promotoras de la biodisponibilidad (Gentry y col., 2004; Cunliffe y Kertesz, 2006).
Recientes estudios han sugerido que ciertas propiedades fisiológicas especificas de los microorganismos involucrados en la degradación de compuestos hidrofóbicos podría mejorar la disponibilidad de estos compuestos. Algunos de los mecanismos que promueven la transferencia de

sustratos hidrofóbicos incluyen la producción de biosurfactantes, la presencia de sistema de captura con alta afinidad por el sustrato, y la reducción de la distancia entre célula-sustrato por medio de estructuras de superficie que promueven la adhesión a superficies hidrofóbicas, entre otros (Parales y Harwood, 2002; Johnsen y Karlson, 2004, Johnsen y col., 2007). Por otra parte, muchas bacterias manifiestan un desplazamiento directo hacia nutrientes y en dirección contraria si se trata de sustancias tóxicas. Esta respuesta quimiotáctica tendría un significado sustancial sobre el potencial de los microorganismos como biodegradadores (Lanfranconi y col., 2003).
Tradicionalmente la técnica de cultivo por enriquecimiento en medios líquidos ha sido el método de elección para el aislamiento de bacterias con un fenotipo especifico. Sin embargo, dependiendo de la forma en que se suplemente el PAH al medio, podrían ser seleccionados diferentes microorganismos con diferentes capacidades degradativas (Bastiaens y col., 2000).
Nuestro grupo de trabajo ha realizado recientemente investigaciones en este tema, realizando enriquecimientos en fase sólida, con el PAH adsorbido sobre membranas hidrofóbicas (Teflón). Bajo estas condiciones fueron obtenidos cultivos bacterianos con interesantes propiedades como ser mayor velocidad de crecimiento comparada con bacterias aisladas por las técnicas convencionales de enriquecimiento, actividad quimiotáctica hacia PAH (aún de bacterias no móviles), capacidad de producir biosurfactantes, adherencia y desarrollo sobre cristales de PAH (Dias R., 2006).
En este proyecto se propone el estudio del establecimiento de comunidades microbianas degradadoras sobre PAH adsorbido a diferentes tipos de soportes, con diferente capacidad de adsorción del contaminante. Para el seguimiento del desarrollo in situ sobre estos modelos de suelo con PAH adsorbidos, se estudiará la aplicabilidad de la técnica de espectroscopía infrarroja (FT-IR) con la intención de aportar una estrategia más realista para el entendimiento de la respuesta adaptativa de las bacterias degradadoras al crecimiento en superficies hidrofóbicas y conocer como estos microorganismos logran remover el contaminante in situ (Bosch y col., 2005).
En este contexto y dada la importancia de la adsorción sobre el control de la biodisponibilidad de los PAH, la estrategia del enriquecimiento donde los contaminantes son adsorbidos a fases inorgánicas u orgánicas sólidas aportará una selección ambiental más relevante y conducirá, eventualmente, a un mejor entendimiento sobre cuales microorganismos y procesos microbianos están involucrados en la degradación de estos contaminantes adsorbidos.

Objetivo general

Contribuir al mejoramiento de los conocimientos básicos relacionados con la ecología microbiana de suelos crónicamente contaminados con PAH.

Objetivos específicos

1. Estudiar la influencia de la biodisponibilidad del PAH sobre la estructura y función de comunidades bacterianas desarrolladas sobre hidrocarburos adsorbidos en soportes de suelo.
2. Determinar las condiciones óptimas para la degradación microbiana de PAH en modelos de suelo con PAH adsorbido.
3. Aislar, estudiar e identificar cultivos bacterianos representativos de las diferentes fases de formación del biofilm a partir del modelo de suelo-PAH adsorbido. Selección de cultivos con propiedades promotoras de la biodisponibilidad.

Plan y Metodología

Enriquecimiento en poblaciones microbianas adaptadas a ambientes con reducida disponibilidad de PAH.

Estudio de la cinética de formación de biofilm a partir de un inóculo de suelo. Se trabajará sobre un modelo de suelo (perlas de poliestireno; Amberlite 200), preadsorbido con fenantreno/pireno en

medio mineral liquido bajo diferentes condiciones: concentración de PAH puro o en mezcla y relación C:N:P (Friedrich y col. 2000; Grosser y col., 2000).

Seguimiento de los sistemas en estudio

a) Evolución de poblaciones cultivables (recuento de poblaciones microbianas en medios comunes y selectivos para bacterias degradadoras de PAH).
b) Cambios en la estructura genética de la comunidad bacteriana mediante la extracción directa del DNA, seguido de PCR-DGGE utilizando primers dirigidos al 16S rRNA. (Del Panno y col., 2005).
c) Cambios fisiológicos en la comunidad microbiana a través de la respuesta catabólica de diferentes sustratos (perfil fisiológico de la comunidad con el sistema ECO-plate de BIOLOG), actividad mineralizante (producción de CO2 en biometer), actividad enzimática (deshidrogenasa, proteasas, ureasas, lipasas).
d) Cinética de eliminación de fenantreno / pireno por cromatografía gaseosa (GC-FID), previa extracción exhaustiva con n-hexano en soxhlet y no exhaustiva en solución acuosa con Hidroxipropil β Ciclodextrinas, resinas tipo XAD (60/80 mesh).

Estudio de la formación de biofilm sobre PAH adsorbido a un modelo de suelo por espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR).

Se pretenden caracterizar los cambios fenotípicos temporales durante el establecimiento de poblaciones bacterianas sobre PAH preadsorbido a una superficie abiótica bajo diferentes condiciones experimentales (origen del inóculo, concentración de PAH, relación C:N:P). Se aplicarán técnicas espectroscópicas vibracionales combinadas con análisis basados en reconocimiento de patterns, con la intención de evaluar de manera no destructiva las características del biofilm formado.

La metodología requerirá identificar marcadores espectrales correspondientes a bacterias degradadoras, la presencia de PAH y sus productos de degradación.

Aislamiento de cultivos degradadores de PAH representativos de las diferentes etapas críticas durante la formación del biofilm en los sistemas modelo de suelo.

Serán aislados microorganismos degradadores a partir de una alícuota del soporte-PAH adsorbido previamente lavado (eliminación de células planctónicas), por tratamiento en agitador a alta rpm,.

Estudio de propiedades promotoras de la biodisponibilidad.

A partir de los aislados se estudiarán propiedades de superficie como adherencia a cristales de PAH, adherencia a partículas de suelo, hidrofobicidad. Capacidad de producir surfactantes. Cinética de degradación de PAH suplementados como cristales y preadsorbido en soportes en medios minerales líquidos. Cálculo de los parámetros básicos de crecimiento (μ, Yx/s, etc.).

Caracterización de los aislados por FT-IR.

Identificación de marcadores espectrales correspondiente a la presencia de microorganismos en estudio.

Monitoreo y caracterización de la expresión fenotípica de los cultivos durante el biofilm y comparación con los resultados observados en cultivo en batch.

Establecimiento del grado de resistencia de las células sésiles a condiciones de estrés (acidez, salinidad, oxidación).

Establecimiento del niveles de adhesión y persistencia de células sésiles en diferentes condiciones.

Identificación de los aislados por secuenciación del fragmento 16SrDNA. Conservación de los cultivos puros seleccionados por liofilización y crioconservación (-80ºC).

Resultados parciales obtenidos

1-Adsorción de fenantreno a los soportes utilizados como modelos de suelo.
Se ensayan dos tipos de soportes, con distinta capacidad de adsorber fenantreno en su superficie: Amberlite 200 y perlas de Polipropileno (diámetro aproximado 4 mm).
El procedimiento de adsorción para cada uno de los soportes, se inicia con 3 lavados con agua destilada, esterilización y secado en estufa a 50 º C durante toda la noche. Con una solución 1:1 de metanol: agua, se preequilibran los soportes durante 12 horas, y se agregan 150 mg de fenantreno disueltos en acetona.
Se deja agitando toda la noche, se separa el soporte de la fase acuosa; se lava para arrastrar fenantreno no adsorbido y se seca en estufa a 50ºC durante 12 horas.
A partir del conocimiento del fenantreno total agregado y el obtenido en las aguas de lavado por método cromatográfico (HPLC) podemos estimar la cantidad de fenantreno adsorbido por gramo de soporte:
Amberlite 200: 2,5 mg fenantreno/g soporte)// Polipropileno: 4,9 mg fenantreno/g soporte

2-Cinética de desorción abiótica
Para la evaluación de la desorción del fenantreno de los soportes, en ausencia de microorganismos, se realiza el siguiente protocolo en condiciones de esterilidad:

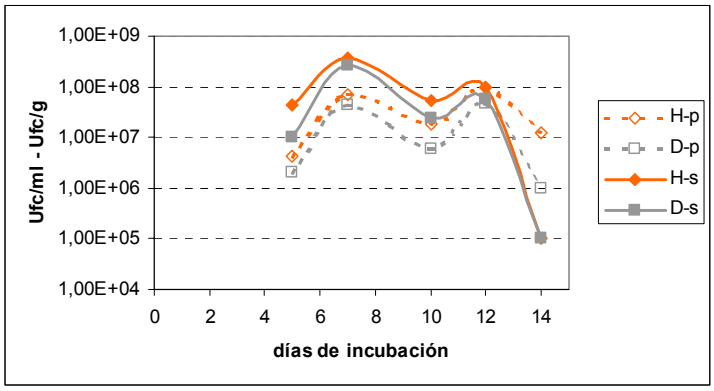
- En un erlenmeyer de 250 ml, conteniendo 50 ml de medio mineral (MML) se adicionan 2 gramos de soporte y se incuba a 27 º C con agitación suave.
- Cada 5 días se extraen 5 ml de medio mineral, y se reemplaza por medio fresco.
- Por HPLC se determina la cantidad de fenantreno desorbido en función del tiempo, previa extracción con acetato de etilo.

3-Evolución del crecimiento microbiano en modelo de suelo, en cultivo batch.
Diseño experimental
Se realiza una cinética fraccionada con 10 erlemeyers, conteniendo cada uno 1 gramo de Amberlite con fenantreno adsorbido y 10 ml de MML. Unos 5 erlenmeyers son sembrados con 40µl de un inoculo enriquecido en bacterias degradadoras de fenantreno, reservando los 5 restantes sin inocular, como control de esterilidad de los sistemas. Todos los sistemas se incuban a 27ºC con agitación suave (100rpm).
Un erlenmeyer conteniendo 30 ml de MML y suplementado con 3 g Amberlite sin fenantreno, es inoculado con 120 µl e incubado en idénticas condiciones para el control de adsorción inespecífica.

Monitoreo de los sistemas
Cada 2 días se procesa un erlenmeyer separando células sésiles de planctónicas.
A partir de cada fracción se realizan recuentos de poblaciones bacterianas heterótrofas (R2-agar) y degradadoras de fenantreno en medio mineral agarizado con una capa superficial de fenatreno en agarosa (MMS-fen) y paralelamente se procesa una alícuota de cada fracción para el análisis mediante la técnica de espectroscopia infrarroja (FT-IR).

a) Recuentos bacterianos.
Para el recuento de células planctónicas, se toman directamente alícuotas del sobrenadante, se realizan las diluciones correspondientes en solución fisiológica y se plaquean 100 µl , en placas de medio R2-agar y MMS-fen.
Para el recuento de células sésiles, se trasvasa el soporte a un tubo de centrifuga, se lava 3 veces con solución fisiológica, se descarta solución de lavado y se resuspende en 5 ml de buffer

fosfato (pH 7). Se vortea durante 3 min. a alta velocidad, se separa una alícuota para realizar diluciones y proceder de la misma manera que en el recuento de células planctónicas.



Los recuentos bacterianos mostraron un incremento de un orden logarítmico en la población heterótrofa (R2-agar) y degradadora de fenantreno (MMS-Fen) entre el quinto y séptimo día de incubación, siendo la densidad de células sésiles (Ufc/g) mayor a la de células planctónicas (Ufc/ml). A los 12 días la densidad sésiles y planctónicas de ambas poblaciones se igualan y decrecen significativamente al día 14.

a) Obtención y análisis de espectros vibracionales por FT-IR.

A partir de cada fracción de células sésiles y planctónicas obtenidas de cada erlenmeyer de la cinética fraccionada y de los correspondientes controles de esterilidad, se realiza un espectro IR. Los resultados de estas determinaciones se encuentran en evaluación.

Bibliografía

Alexander, M. 2000. Environ. Sci. Technol., 20, 4259-4265.
Bastiaens L., Springael D., Wattiau P., Harms H., de Wachter R., Verachtert H. and Diels L. 2000. Appl. Environ. Microbiol., 66: 1834-1843.
Cunliffe M and Kertesz M., 2006. Environmental Pollution, 144, 228-237.
Del Panno, MT, Morelli IS, Engelen B. and Berthe-Corti L. 2005. FEMS Microbial Ecology. 53: 305-316.
Gentry T., Rensing C., Pepper I. 2004. Critical Review in Environmental Science and Technology. 34,447-494.
Kulhanek, A., Trapp S., Sismilich M., Janku J. and Zimova M., 2005. Sci. Total Environ. , 339, 71-80.
Parales R. and Harwood C. 2002. Current Opinion in Microbiology, 5, 266-273.
Pieper S., 2004, http://opus.kobv.de/tuberlin/voltexte/2004/301/.
Sabaté J., Viñas M. Y solana A. 2006. Chemosphere, 63, 1648-1659.
Swindell A. and Reid B. 2006. Chemosphere, 62, 1126-1134.
Wattiau P., 2000. En:Biotechnology for the Environment: Strategy and Fundamentals. Agathos S. and Reineke W. (eds) Kluwer Academic Publishers.
Dias R. 2006. Tesina de grado. Universidad Nacional de Quilmes.
Bosch A., Serra D., Prieto C., Schmitt J., Naumann D. and Yantorno O. 2005. Appl. Microbiol. Biotech. On line (16-12-2005) http: //www.springelink.com/app/home/contribution-
Morelli IS., Vecchioli GI., Costanza OR., Schäfer R., Berthe-Corti L. and Painceira MT. 1999. Environ. Toxicol., 14, 227-233.
Friedrich M., Grosser R., Kern E., Inskeep W. and Ward M. 2000. Appl. Environ. Microbiol., 66: 2703-2710.
Grosser R., Friedrich M., Ward D. and Inskeep W. 2000. Appl. Environ. Microbiol., 66: 2695-2702.
Lanfranconi M., Alvarez H. and Studdert C. 2003. Environmental Microbiology, 5: 1002-1008.