# INFORME FINAL

## BIODEGRADACION ANAEROBIA DE RESIDUOS DE PETRÓLEO POR BACTERIAS SULFATORREDUCTORAS Y BIODIVERSIDAD EN LA ELIMINACIÓN MICROBIANA DE CRUDO EN SEDIMENTOS MARINOS

VEM2003-20075-C02-01


| | |
|---|---|
| INVESTIGADOR PRINCIPAL: | Silvia Marqués Martín |
| ORGANISMO: | Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) |
| CENTRO: | Estación Experimental del Zaidín (EEZ) |
| DEPARTAMENTO: | Protección Ambiental |
| FECHA DE INICIO: | 17/12/2003 |
| FECHA DE FINALIZACIÓN: | 16/12/2006, extendido hasta 31/03/2007 |

# BIODEGRADACION ANAEROBIA DE RESIDUOS DE PETRÓLEO POR BACTERIAS SULFATORREDUCTORAS Y BIODIVERSIDAD EN LA ELIMINACIÓN MICROBIANA DE CRUDO EN SEDIMENTOS MARINOS

## MEMORIA

De forma global, el proyecto proponía el empleo de organismos anaerobios autóctonos para la recuperación de sedimentos marinos contaminados con residuos de petróleo. El trabajo estaba centrado en una zona de Galicia contaminada con fuel tras el hundimiento del *Prestige*.

La utilización de microorganismos autóctonos para la regeneración de zonas contaminadas es una tecnología que en su estado actual es difícilmente aplicable a sedimentos, donde la concentración de oxígeno es muy limitada o nula. Esto hace además que técnicamente sea difícil implementar un proceso de biorremediación en el fondo marino. La aproximación a la utilización de microorganismos en zonas anaerobias requiere por tanto un trabajo previo de caracterización biológica del medio. En concreto, este proyecto proponía: i) estudiar y comparar la diversidad bacteriana presente en sedimentos expuestos o no a contaminantes, ii) aprovechar esta información para el aislamiento de cepas reductoras de Fe(III) o de sulfato con capacidad para degradar compuestos aromáticos presentes en el crudo. En una etapa posterior, de las cepas aisladas se caracterizarían las rutas de degradación y sus genes, con objeto de diseñar sondas para la detección fácil e inequívoca de esta actividad *in situ*. iii) establecer los factores esenciales para el crecimiento óptimo de las poblaciones bacterianas y determinación de aquellos que son limitantes *in situ*. iv) desarrollar una tecnología basada en la discriminación isotópica natural de las actividades biológicas para detectar *in situ* y de forma rápida y sensible la degradación anaerobia de compuestos aromáticos.

### Muestreos

El trabajo se diseñó para realizar un muestreo anual, es decir un total de tres muestreos a lo largo del proyecto. Los muestreos se llevaron a cabo en dos playas en la orilla este del parque natural de las Islas Cíes, en Pontevedra. Una de las playas había sufrido una contaminación intensa de crudo como consecuencia del hundimiento del *Prestige* y presentaba indicios claros de deterioro (Playa de Figueras). La otra, aunque también había sido expuesta al derrame, lo había sido de un modo mucho menos intenso e incluso fue limpiada y por tanto se utilizó como control "limpio" (Playa de Rodas).

El muestreo se realizó con la colaboración de la empresa CIS de Santiago de Compostela, que nos proporcionó información de gran valor para la selección de las zonas a muestrear. El muestreo de sedimento se hizo a unos 9 metros de profundidad, por lo que se necesitaron varias inmersiones de buzos del Equipo de Palma de Mallorca y de la empresa CIS. La primera campaña de muestreo se llevó a cabo en el mes de mayo de 2004, la segunda en octubre de 2005 y la última en periodo de prolongación del proyecto, en marzo de 2007. El procesamiento de muestras en Galicia se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Miguel Ángel Murado, del Instituto de Investigaciones Marinas del CSIC, en Vigo. En cada muestreo, se tomaron manualmente por inmersión varios testigos (cores) de sedimento de distinto tamaño, que fueron procesados en el laboratorio de acogida en Vigo, excepto en el último muestreo, en que el equipo transportó en frío, inmediatamente después de la toma, los testigos sin procesar para su análisis posterior en el laboratorio de Granada.

Análisis de la población bacteriana presente en sedimentos contaminados. Comparación con sedimentos limpios.

### Genotecas

Para la construcción de las genotecas del ARN ribosomal se procedió a extraer ADN de sedimento congelado de tres profundidades seleccionadas previamente: zona óxica (3-7 cm),

zona de transición (11-15 cm) y zona anóxica (33-37 cm). Para la amplificación del gen ribosómico 16S se utilizaron oligos ya descritos[1]. Los productos amplificados fueron clonados y se analizaron 100 clones positivos de cada genoteca (CI, CII, CIII para el testigo C; R para el testigo de la "playa control") que fueron diferenciados mediante Análisis de Restricción del ADN ribosomal Amplificado (ARDRA). Con las secuencias obtenidas de los genes completos de 16S rDNA se construyó un árbol de similitud usando el programa ARB[2] (figura 1). Los resultados muestran que el sedimento contaminado y el no contaminado tienen una gran diversidad bacteriana. Muchos taxa están presentes en los dos tipos de sitio, aunque el estado metabólico de las células sea mayor en el sedimento contaminado (resultados previos de ensayos de FISH), lo que indica una rápida respuesta de las bacterias a la presencia de crudo en su hábitat. Las secuencias de 16S rDNA obtenidas en nuestro estudio concuerda con los resultados obtenidos en otros estudios de sedimentos marinos[3], donde se describe que la secuencias encontradas con mayor frecuencia en sedimentos marinos son asociadas con miembros de las sub-clases alfaproteobacteria, betaproteobacteria, y gamaproteobacteria[4,5,6,7] y deltaproteobacteria, Plantomicetales, Verrucomicrobiales, el grupo Cytophaga-Flavobacterium[8,9], y el grupo de Actinobacterias[6,7,10]. Las beta-proteobacterias y actinobacterias se encontraron esencialmente en los tres muestreos realizados, lo que parece indicar que no hay variaciones significativas en la población a lo largo del tiempo. Según la bibliografía mencionada, los grupos principales de alfa y beta-proteobacterias (monofiléticos) incluyen buenos candidatos para llevar a cabo procesos de biodegradación en sedimentos. Por otra parte, la mayoría de las secuencias de 16S obtenidas se agrupan con grupos de bacterias marinas no-cultivables, asociadas principalmente con delta-proteobacterias (bacterias sulfato-reductoras, SRB) y gamma-proteobacterias. De manera general, los clones secuenciados provenientes tanto de la playa control como de la playa contaminada y de distintas profundidades del sedimento se agrupaban de forma entremezclada en el árbol filogenético.

La diferencia en la composición de la diversidad entre las poblaciones de los sitios contaminados y no contaminado de forma global fue determinada mediante el uso de la técnica de TGGE (electroforesis en geles de gradiente de temperatura). Los diferentes estratos de cada sedimento contaminado revelaron la presencia de diferentes patrones de bandas amplificadas de 16S rRNA a medida que aumentaba la profundidad del estrato del sedimento.

Genes funcionales

Una metodología de aplicación cada vez más frecuente en la caracterización de poblaciones es el análisis de la presencia y diversidad de genes involucrados en algunas funciones de interés. En nuestro caso, hemos seleccionado varios genes conocidos de las distintas rutas de degradación de derivados del petróleo. Se utilizaron sondas para las zonas más conservadas de los genes *nah* (de degradación de naftaleno); de los 3 grupos de alkano mono-oxigenasas *alk1*, *alk2* y *alk3*; de la catecol-2,3-dioxigenasa (*C2,3O*); de las bombas de extrusión de solventes (*HAE1*) y de la enzima anaerobia benzoil-CoA reductasa (*bcr*). Para aumentar la probabilidad de amplificación, se utilizaron cebadores degenerados.

Se detectó mediante PCR la presencia de esos genes en el sedimento. Para determinar la diversidad de la secuencia de cada uno de los genes, construimos genotecas a partir del producto de cada reacción de PCR, con el fin de conocer la secuencia de los clones obtenidos. Podemos afirmar que las enzimas presentes en los sedimentos presentan una gran diversidad que disminuye a medida que el sedimento es más profundo en el caso del gen *alkB* (figura 2), seguramente debido a la especialización de las comunidades. Resultan especialmente interesan tes los resultados obtenidos con el gen *alkB*. Este gen se relaciona directamente con la capacidad de degradación aerobia de alcanos. Sin embargo, hemos encontrado una mayor presencia relativa de este gen en las zonas más profundas, donde la presencia de oxígeno es nula. Algunos autores relacionan esta actividad con una función de esta enzima en la detoxificación

| Enzima | Abrev. | Respiración | Compuesto | Fragmento | PCR | Referencia |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Benzoyl -CoA reductase | bcr A | Anaerobio | BTEX | 421 pb | - | Hosoda et al., 2005 |
| Benzylsuccinate synthase | bssA | Anaerobio | Tolueno | 132 pb | - | Beller et al., 2002 |
| Benzylsuccinate synthase | bssA | Anaerobio | Tolueno | 794 pb | + | Lueders et al., 2007 |
| Alkane Hydroxylase | alk1 | Aerobio | n-alkanos | 185 pb | - | Sei et al., 2001 |
| Alkane Hydroxylase | alk2 | Aerobio | n-alkanos | 271 pb | - | |
| Alkane Hydroxylase | alk3 | Aerobio | n-alkanos | 330 pb | + | |
| Alkane hydroxylase B | alkB | Aerobio | n-alkanos | 557 pb | + | Smits et al., 1999 |
| Naphthalene dioxygenase | nahAC | Aerobio | Naftaleno | 630 pb | - | Hedlung et al., 200 |
| Catechol 2,3-dioxygenase | C23O JP1 | Aerobio | BTEX | 527 pb | - | Junca & Pieper, 2004 |
| Catechol 2,3-dioxygenase | C23O JP2 | Aerobio | BTEX | 583 pb | - | |
| PCS transporter genes | PCS | Aerobio | Bombas extrusión | | - | Meguro et al., 2005 |
| HAE1 transporter genes | HAE1 | Aerobio | Bombas extrusión | 540 pb | Inesp. | |
| nitrile hydratase | Nhase SA | Aerobio | nitrilos | 350 pb | - | Brandao et al., 2002 |
| nitrile hydratase | Nhase BA | Aerobio | nitrilos | 350 pb | - | |
| nitrile hydratase | Nhase PA | Aerobio | nitrilos | 350 pb | - | |

**Tabla 1.** Genes funcionales detectados mediante PCR. No detectado (-), detectado (+), producto inespecífico (Inesp).

de las especies reactivas de oxígeno producidas durante el metabolismo, lo que explicaría su presencia en las zonas más profundas del sedimento muestreado. Actualmente, estamos analizando los niveles de expresión *in situ* de estos genes para determinar su papel en este proceso.

Detección de actividades *in situ*

Paralelamente a estos estudios moleculares, se ha llevado a cabo el análisis in situ de algunas actividades metabólicas, en concreto la oxidación de la fuente de carbono determinada como evolución de $CO_2$ empobrecido en $^{13}C$, y la respiración de sulfato, determinada como la formación y precipitación de sulfuro de cobre soluble que se puede leer a 480 nm. Se analizó la dinámica de respiración de las poblaciones de organismos sulfato-reductores frente a diferentes hidrocarburos como fuente de carbono. De manera general es interesante evidenciar que cada muestra analizada (sedimento limpio, el anóxico y el óxico (mezcla de la zona aerobia del sedimento y la zona de transición aerobiosis-anaerobiosis)) tiene tasas de sulfato particulares para cada tipo de hidrocarburo, seguramente debido a la presencia de diferentes grupos funcionales de organismos respiradores de sulfato (figura 3). Las tasas de respiración de sulfato en presencia de lactato y acetato no parecen discriminar la presencia dominante bien sea de organismos oxidadores completos o de oxidadores incompletos, algo que generalmente está determinado con la disponibilidad de materia orgánica en los sedimentos. En cuanto a la evolución de $CO_2$, el análisis de isótopos del carbono en el $CO_2$ disuelto en el agua de la zona de muestreo indica que está ocurriendo degradación de compuestos presentes en el crudo contaminante, de forma más señalada en la playa sometida a fuerte contaminación.

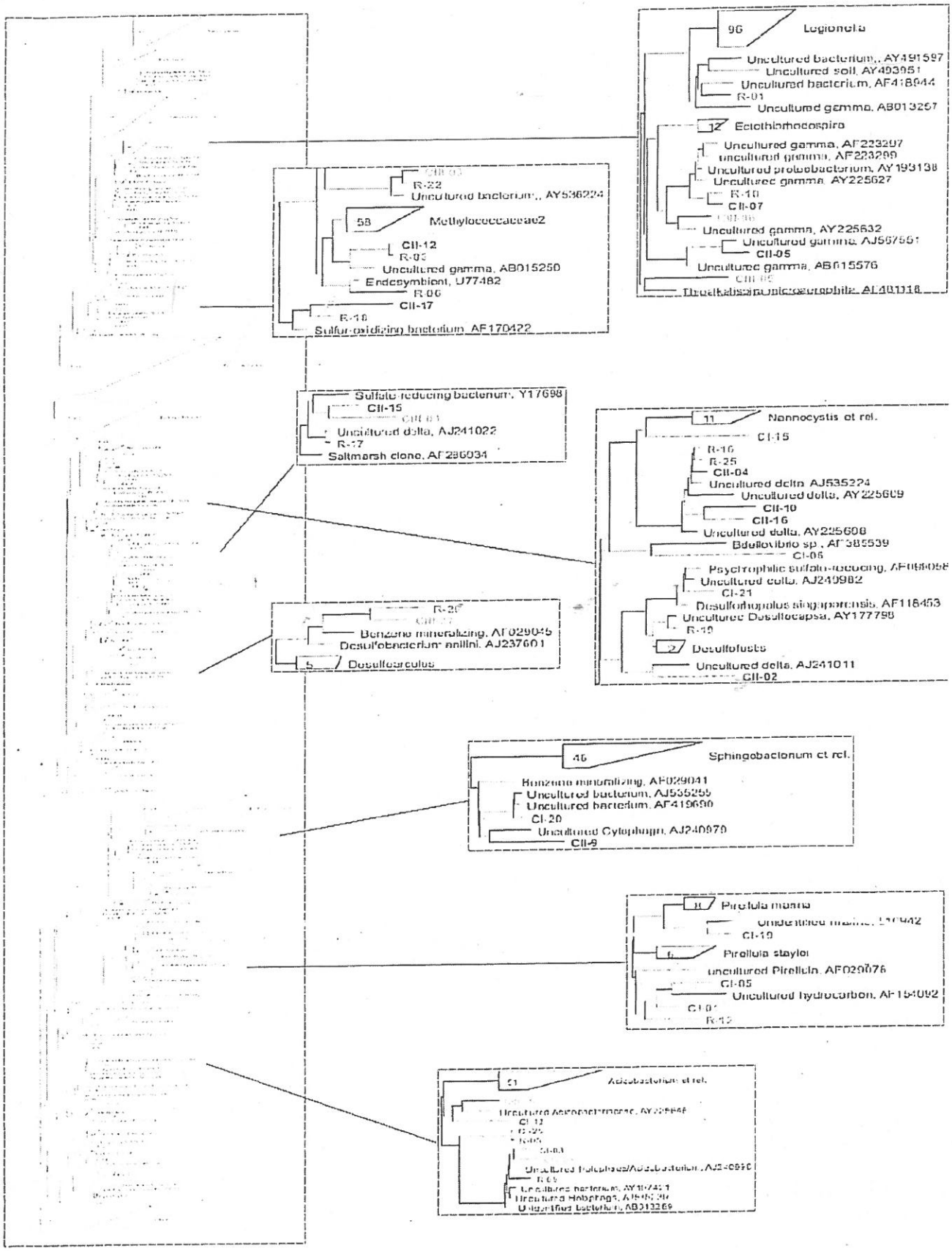



**Figura 1.** Árbol de similitud de secuencias 16S rDNA. CI (azul)= 3-7 cm; CII (azul oscuro)= 11-15 cm; CIII (amarillo)= 33-37 cm; R (rojo) = Playa de Rodas ("playa control")

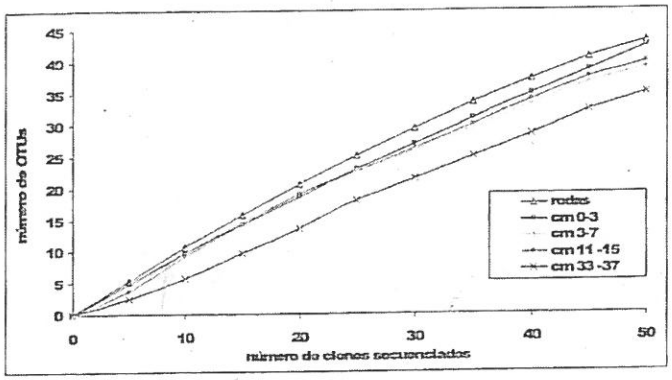



**Figura 2.** Curva de rarefacción construidas a partir de las secuencias obtenidas del gen *alkB*.

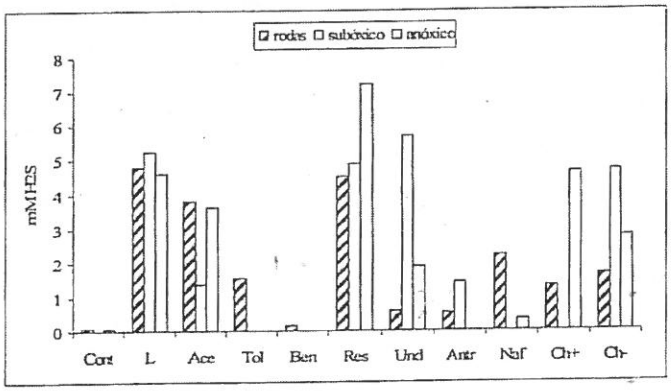



**Figura 3.** Ensayos de sulfato reducción en medio mínimo de sales (microcosmos). Los tratamientos fueron: Cont = control (sin fuente de carbono), L = lactato, Ace = acetato, Tol = tolueno, Ben = benceno, Res= resorcinol, Und = undecano, Antr = antraceno, Naf = naftaleno, Ch+ = petróleo normal, Ch- = petróleo autoclavado.

**Aislamiento de bacterias con capacidad de mineralizar compuestos aromáticos a partir de sedimentos anaeróbicos contaminados con petróleo.-**

El objetivo fue principalmente aislar bacterias reductoras de Fe (III) o sulfato capaces de degradar hidrocarburos derivados del petróleo. Nos hemos centrado en los compuestos aromáticos de uno o varios anillos, para establecer su susceptibilidad a ser degradados y las condiciones óptimas en las que se lleva a cabo el catabolismo.

Después de cada uno de los tres muestreos realizados, se iniciaron cultivos en distintos medios selectivos con dos finalidades: hacer un conteo del número de organismos de cada tipo presentes (utilizando el método de número más probable, NMP), e iniciar cultivos de enriquecimiento en determinados medios de interés. Como se ha descrito anteriormente, los conteos de NMP dieron positivo en todos los medios ensayados, tanto aerobios como anaerobios. Los valores más bajos fueron los de bacterias nitrato reductoras, acorde con las bajas concentraciones de este aceptor en el mar. En el último muestreo se analizó la presencia de microorganismos reductores de manganeso (IV), otro tipo de respiración importante en algunos sedimentos marinos.

La presencia de poblaciones de bacterias sulfato-reductoras (SRB) del orden de mínimo $10^2$cel/g en las muestras contaminadas (testigos A, B y C) para la mayoría de las fuentes de carbono probadas es muy importante en nuestro estudio porque permite establecer que la sulfato reducción es el tipo de respiración dominante en el sedimento. La muestra del testigo F, donde el sedimento estaba impregnado de petróleo, también se detectaron poblaciones sulfato-reductoras degradadoras esta vez en todas las fuentes de carbono, aunque en menor orden de magnitud ($10^3$cel/g) indicando que a pesar de la alta toxicidad que representa el contacto directo con los hidrocarburos las bacterias son capaces de biodegradar los mismos. En

los recuentos de todos los testigos contaminados existe una población degradadora de fenantreno y naftaleno del orden de $10^3$/g de sedimento. Este dato es interesante ya que son los PAHs son la mayor fracción aromática presente en el vertido. La presencia de $10^4$cel/g de degradadores de pireno, antraceno y undecano, todos muy poco solubles en agua, es muy interesante en el testigo C (contaminado). Para los testigos A y B, se detectaron SRB del orden de $10^3$ cel/g con algunas de las fuentes de carbono (naftaleno, tolueno, benceno y resorcinol), probablemente a debido en parte a la solubilidad de estos compuestos. Para las bacterias reductoras de hierro (FRB) se obtuvieron órdenes de magnitud máximos de $10^3$ cel/g, mucho menores que los de SRB ($10^5$-$10^6$cel/g) en fuentes de carbono como lactato y acetato. De nuevo, en el testigo C se obtuvieron valores mayores que en A y B. Los resultados por fuente de carbono son similares a los de SRB, excepto por el tolueno, ya que aparentemente no se obtuvieron FRB con esta fuente de carbono. En el caso del testigo F, se obtuvieron poblaciones de FRB un orden de magnitud menor que para SRB. Los recuentos de NMP en los testigos control (D y E) de la zona limpia es notablemente menor ($10^{-1}$cel/g) al de la zona contaminada. Probablemente los microorganismos puedas adaptarse a la presencia de tóxicos como los hidrocarburos pero necesitan al menos la exposición de éstos por algún mínimo de tiempo para biodegradarlos.

Bacterias reductoras de Fe (III).

En cuanto a los cultivo de enriquecimiento, y como era de esperar, hemos obtenido resultados positivos en varias de las condiciones ensayadas, aunque las tasas de crecimiento son lentas. Nos estamos centrados en bacterias reductoras de hierro y capaces de degradar naftaleno y pireno. En concreto disponemos de bacterias degradadoras de naftaleno. El tiempo de generación es de varias semanas y el crecimiento se detecta únicamente como la reducción del hierro de los testigos incluidos en los medios de cultivo. El crecimiento es persistente y se recupera tras cada nueva dilución. Cuando se haya alcanzado un número considerable de generaciones, se identificará(n) la(s) especie(s) presente en los cultivos. De ser un cultivo puro, sería el primer reductor de hierro descrito capaz de degradar naftaleno, y será el punto de partida para la caracterización bioquímica y molecular de su ruta de degradación.

Bacterias reductoras de sulfato

Paralelamente mantenemos varios enriquecimientos en medios con sulfato como aceptor de electrones. De nuevo estamos especialmente interesados en aquellas bacterias capaces de degradar naftaleno, ya que hasta la fecha hay sólo se ha podido aislar una especie SR capaz de crecer con naftaleno.

Durante los pasos iniciales de los cultivos de enriquecimiento, se están siguiendo los cambios en la estructura de las poblaciones utilizando técnicas moleculares, con objeto de entender los mecanismos por los cuales se establecen consorcios capaces de degradar determinados compuestos más o menos recalcitrantes.

## Hibridación in situ con sondas fluorescentes (FISH)

Paralelamente a los conteos de grupos específicos mediante NMP, se llevó a cabo un conteo exhaustivo utilizando hibridación *in situ* detectada con microscopia de fluorescencia (FISH). Disponemos de los resultados de los dos primeros muestreos y estamos procesando los del tercer muestreo. Se utilizaron sondas universales que hibridan con el 16S ribosomal de eubacterias (EUB 338) y sondas específicas que permitieron determinar la actividad *in situ* de grupos bacterianos importantes como son las citofagas (fermentadores), Desulfococcus-Desulfosarcina (degradadores importantes de compuestos recalcitrantes) y Desulfovibrio sp. (degradadores de compuestos tóxicos menos complejos) en el sedimento marino. Estos grupos están presentes en sedimentos metabolitamente muy activos[11], lo que indica que el estado metabólico de los sedimentos contaminados puede ser debido a la presencia de los contaminantes. Normalmente, estos mismos grupos son encontrados en sedimentos marinos aunque con porcentajes generalmente más bajos. Es notable la diferencia entre los porcentajes

de organismos activos en el sedimento contaminado y el no contaminado, siendo mayores en los primeros en dos o tres ordenes de magnitud.

Marcaje isótopos estables.

Sin embargo, la detección de las cepas concretas que llevan a cabo la degradación in situ se puede conseguir de forma inequívoca utilizando marcaje con isótopos estables. Aunque esta actividad no estaba incluida en el proyecto inicial, los resultados obtenidos en los dos primeros años aconsejaban inicial un estudio con isótopos estables. Con este fin, en el último muestreo se reservaron varios testigos cilíndricos tomados en las dos zonas para este estudio en el laboratorio de Granada. En primer lugar se sometieron a la influencia bien de naftaleno, bien de crudo del *Prestige*, contenidos en una pipeta perforada lateralmente y rellena de este compuesto, clavada en el centro de los testigos (Figura 4). Tras 15 semanas de incubación en estas condiciones a una temperatura semejante a la de la zona de origen, los testigos se inyectaron con varias dosis de naftaleno marcado con $^{13}C$ en todos sus átomos de C (Figura 5).

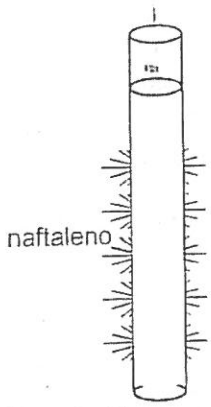



Figura 4: Esquema del dispositivo para la incubación de los sedimentos con naftaleno o crudo

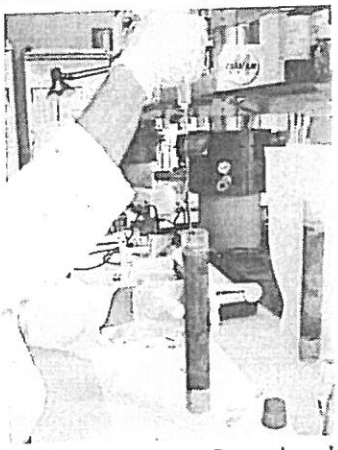


Figura 5: Ejemplo de inyección de naftaleno marcado en los testigos.

Estos testigos se encuentran actualmente en incubación en las mismas condiciones. Pasado el tiempo estipulado, se procederá a la extracción del DNA de los sedimentos tratados. El DNA pesado, es decir el de los organismos que hayan incorporado el marcaje como parte de su biomasa, se separará del DNA total mediante centrifugación en gradiente de densidad, y se utilizará como molde para la amplificación con cebadores universales para el gen 16S. Con los productos obtenidos se construirá una genoteca, a partir de la cual se identificarán los organismos que están participando en la degradación de naftaleno.

En resumen, los RESULTADOS MÁS DESTACABLES alcanzados en el proyecto son:

1. El análisis de la diversidad microbiana (enriquecimientos, cultivos y 16S rDNA) evidencia el potencial bioremediador que los sedimentos contaminados han adquirido con el desastre del *Prestige*.

2. La diversidad metabólica de los genes funcionales analizados sugiere que existen nuevas rutas y mecanismos de tolerancia y degradación a tóxicos presentes en los sedimentos que aún no han sido descritos en el campo.

3. Descripción por primera vez de una nueva cepa reductora de hierro capaz de degradar naftaleno y utilizarlo como única fuente de carbono.

**Bibliografía**

[1] Muyzer, G., Teske, A., Wirsen, C.O., and Jannasch, H.W. (1995) Phylogenetic relationships of Thiomicrospira species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. Arch Microbiol 164: 165 172

[2] Ludwig, W., *et al.*. 2004. ARB: a software environment for sequence data. Nucleic Acids Research 32:1363-1371.

[3] Ravenschlag, K., Sahm, K., Knoblauch, C., Jorgensen, B. & Amann, R. (2000). Community Structure, Cellular rRNA Content, and Activity of Sulfate-Reducing Bacteria in Marine Arctic Sediments. Appl. Environ. Microbiol. 66: 3592-3602.

[4] Bowman, J.P., Rea, S.M., McCammon, S.A. & McMeekin, T.A. 2000. Diversity and community structure within anoxic sediment from marine salinity meromytic lakes and a coastal meromictic marine basin, Vestfold Hills, eastern Antarctica. Environ. Microbiol. 2 (2):227-237

[5] Cifuentes, A., Antón, J., Benloch, S., Donnelly, A., Herbert, A. & Rodriguez-Varela, F. 2000. Procaryotic diversity in Zostera noltii-colonized marine sediments. Appl. Environ. Microbiol. 66(4):1715-1719.

[6] Gray, J.P. & Herwig, R.P. 1996. Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments. Appl. Environ. Microbiol. 62:4049-4059

[7] Li. et. Al., 1999

[8] Rochelle, P.A., Cragg, B.A., Fry, J.C., Parkes, R.J. & Weightman, A.J. 1994. Effect of sample handling on estimation of bacterial diversity in marine sediments by 16S rRNA gene sequence analysis. FEMS Microbial. Ecol. 15:215-225.

[9] Urakawa, H., Kita-Tsukamota, K. & Ohwada, K. 1999. Microbial diversity in marine sediments from Sagami Bay and Tokyo Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene analysis. Microbiol. 145:3305-3315.

[10] Zhang, Chunlong and Bennett, George N. (2005) Biodegradation of xenobiotics by anaerobic bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology 67 (5): 600-618.