

# Degradación de hidrocarburos por microorganismos

Por J. Pérez Vargas\*, G. Calva Calva\*\*, Juan Suárez Sánchez\*

Los problemas de contaminación ambiental no sólo están relacionados con derrames de hidrocarburos, sino también con otras fuentes como: tanques de gasolina enterrados, basureros, acumulación de desechos peligrosos en plantas, fosas y lagunas de oxidación, sistemas sépticos domésticos, áreas de aplicación de plaguicidas, pozos abandonados de agua y petróleo, intrusión salina (cerca de las costas), así como derrames superficiales de hidrocarburos.

## Sobre los autores...

\* Investigador del Laboratorio de Biotecnología Ambiental, en el Centro de Investigación del TESE.

\*\* Investigador del Departamento de Biotecnología del CINVESTAV-IPN.



Los derrames de hidrocarburos afectan fuertemente el medio ambiente, y el territorio Nacional no es la excepción, debido a que gran parte de su extensión es explotado por los yacimientos de petróleo (Botello *et al.* 1991). Las costas del Atlántico se ven afectadas grandemente por las excavaciones y el transporte a lo largo del Caribe, donde se han encontrado cantidades considerables de diversos hidrocarburos en suelo y agua (Botello *et al.* 1991; Prince, 1993), algunos de estos componentes son difíciles de degradar (Schnoor, 1992 y Schnoor *et al.* 1995; Prince, 1993), y muchos corresponden a los derrames accidentales, como el caso del IXTOC I en 1979, el del buque cisterna Exxon Valdéz en 1989, la Guerra del Golfo Pérsico en 1991, etcétera.

Los microorganismos han sido utilizados en los procesos de limpieza de suelos contaminados debido a su capacidad para usar los hidrocarburos como fuentes de carbono. Se ha identificado a una serie de microorganismos que degradan distintos componentes del petróleo. La compleja composición del queroseno hace que los microorganismos no puedan degradarlos fácilmente, esto se debe a la diversidad de su estructura y solubilidad, estas características juegan un papel muy importante en la remoción de estos hidrocarburos de los sitios contaminados.

### **Contaminación de suelos por hidrocarburos del petróleo**

Los hidrocarburos del petróleo pueden entrar en contacto con el agua o suelo como resultado de derrames durante su uso o transporte o por lixiviación (filtración de depósitos de almacenamiento). Los componentes más volátiles del combustible (alcanos de bajo peso molecular) se evaporan del suelo y agua y entran a la atmósfera donde serán degradados por procesos de fotooxidación (Jarsjö *et al.* 1994). Los componentes alifáticos (mayores de 20 átomos de carbono), tienen una solubilidad muy baja en agua y no se

volatilizan del suelo o de la superficie del agua. Por lo tanto, los componentes más pesados presente en el suelo o en la columna de agua donde podrán adsorberse a la partículas de materia orgánica o se sedimentarán en los cuerpos del vital líquido (Prince, 1993; Leahy y Colwell, 1990; Swannell *et al.* 1996).

Los hidrocarburos saturados son lentamente transportados al sedimento en forma de partículas de materia suspendida. El movimiento del queroseno a través del suelo, depende del contenido de humedad de este. Mientras mayor es el contenido de humedad, menor es la adsorción de los componentes más volátiles del queroseno, y mayor y más rápida es la penetración de los componentes líquidos a través del suelo. Contrariamente, la movilidad ascendente tanto de la fase líquida como del vapor del queroseno a través del suelo, disminuye cuando aumenta el contenido de humedad y la capacidad de campo, de esta manera la capilaridad ascendente del queroseno se inhibe completamente (Leahy y Colwell, 1990). Los hidrocarburos son eventualmente biodegradados por microorganismos del suelo; la velocidad y la magnitud de este proceso dependen de la temperatura ambiente, de la presencia de un número suficiente de microorganismos capaces de metabolizar estos hidrocarburos, y de la concentración del combustible en el suelo o en el agua (Botello *et al.* 1991; Jarsjö *et al.* 1994 y Benazon *et al.* 1995). Los compuestos aromáticos (benceno y alquilbencenos) de los combustibles, pueden migrar a través del suelo, hasta llegar al agua subterránea.

De acuerdo con estudios realizados por distintos grupos de investigadores (Benazon *et al.* 1995; Jarsjö *et al.* 1994; Botello *et al.* 1991) se han encontrado que en los diferentes tipos de suelo puede haber retención de compuestos olefínicos  $C_{14}$  y  $C_{15}$  ó "lixiviarse" y llegar a zonas en donde al mezclarse con el agua del manto freático, producen

una zona de mayor contaminación, dado que se acumulan diversos tipos de hidrocarburos (Jarsjö *et al.* 1994). Se han hecho estudios sobre la retención del queroseno en suelos, arenoso, arcilla glacial, arcilla post-glacial, suelo y suelo húmico en los cuales se examinaron las fracciones volátiles que comprenden mezclas de hidrocarburos de C<sub>9</sub> - C<sub>11</sub>. Se observó que la capacidad de retención de queroseno, comparada con la capacidad del agua, en un suelo arcilloso, era igual, pero la retención de los componentes de mayor número de átomos de carbono es debida a su difícil volatilización (Jarsjö *et al.* 1994).

### Contaminación de Agua por Hidrocarburos del Petróleo

Los combustibles llegan a ser liberados en las aguas superficiales como resultado de los derrames en los pozos de extracción, durante su transporte o desde depósitos localizados en forma adyacente a las aguas superficiales. El queroseno puede arribar a las aguas superficiales y subterráneas por lixiviación, desde tanques de almacenamiento sobre o por debajo de la superficie terrestre (Prince, 1993). Se ha encontrado que inhibe la respiración en *Anabaena doliolum* y está relacionada con los componentes aromáticos. También se ha observado que en concentraciones pequeñas de fracciones parafínicas, pueden estimular la fotosíntesis y la respiración de algas verde-azules (cianobacterias). (Singh y Gaur, 1990).

En estudios acerca del comportamiento del zooplancton, en peces y organismos bénticos, éstos han sido muy sensibles durante las pruebas de toxicidad aguda (Panigrahi y Konar, 1989). Se encontró además, que determinadas especies microbianas al estar en contacto con el queroseno pueden crecer, al utilizarlo como fuente de carbono, lo cual permite o favorece su estudio en ambientes acuáticos contaminados con hidrocarburos (Buckley *et al.* 1976).

### Biodegradación de hidrocarburos del petróleo

Debido a la capacidad biológica de los microorganismos para degradar hidrocarburos del petróleo, se les utiliza en procesos de tratamientos de aguas contaminadas con hidrocarburos; algunos microorganismos usan compuestos derivados del petróleo como fuentes de carbono en la producción de proteína, grasas, aminoácidos, etc. Dependiendo de los microorganismos utilizados, es posible localizar intermediarios del proceso degradativo, como son ácidos grasos de cadena larga, pero no mayores a 18 átomos de carbono (Radwan y Sorkhoh, 1993; Labare y Alexander, 1995; Wilson y Bradley, 1996; Blasig *et al.*, 1989).

De los primeros estudios realizados (ZoBell, 1946) y otros posteriores, se ha observado que los microorganismos tienen un gran potencial para el uso de fuentes hidrocarbonadas complejas como sustrato, que favorece el crecimiento, disminuyendo su toxicidad (Leahy y Colwell, 1990; Atlas 1981; Neufel *et al.* 1983; Fu y Alexander, 1995; Ristau y Wagner, 1983; Setti *et al.* 1995), y por lo tanto permite su empleo en la degradación de componentes hidrocarbonados tóxicos. Entre los géneros de microorganismos degradadores de hidrocarburos se encuentran las bacterias, las algas, las levaduras y los hongos filamentosos. Los más importantes que se han aislado en ambientes acuáticos son: *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Candida*, *Rhodotorula* y *Sporobolomyces* (Atlas 1981; Bartha y Atlas 1977). Entre los hongos degradadores de hidrocarburos en suelos se encuentran: *Penicillium*, *Cunninghamella*, *Verticillium*, *Beauveria*, *Mortieriella*, *Phoma*, *Scolecobasidium* (Atlas 1981; Bartha y Atlas 1977).

La capacidad degradativa de hidrocarburos por parte de estos microorganismos, ha propiciado el desarrollo de

investigaciones sobre posibles alternativas para su uso en "biorremediación" de suelos contaminados o el tratamiento de efluentes con mejores resultados (Radwan *et al.*, 1996, Leahy y Colwell, 1990; Fu y Alexander, 1995; Wilson y Bradley, 1996; Swannell *et al.* 1996; Prince, 1993).

Sin embargo, son pocos los trabajos de investigación acerca del impacto de las fracciones específicas del petróleo, como las que corresponden al queroseno, en especial su contaminación en el suelo y en mantos acuíferos, sobre los que se han hecho estudios de degradación de algunos de sus componentes como es el caso de xileno (Álvarez y Vogel. 1995, Vernace *et al.* 1996), de la degradación de cicloalcanos (Hernán *et al.* 1993), de derivados aromáticos (Prince, 1993; Oberbremer y Müller-Hurting, 1989; Cripps y Watkinson, 1978) n-alcanos (Radwan *et al.* 1996; Radwan y Sor-khoh, 1993; Setti *et al.* 1992; Oberbremer y Müller-Hurting, 1989; Blasig *et al.* 1989; Buckley *et al.* 1976; Cameotra *et al.* 1983), y dibenzotiofenos (Setti *et al.* 1995; Setti *et al.* 1992).

Es importante mencionar que es necesaria la mezcla de varias especies bacterianas para la conversión de los contaminantes; la mejor mezcla de microorganismos depende de los contaminantes y del sitio al cual van a ser aplicados, como ha sido reportado por varios investigadores (Dehorter *et al.* 1992, Duba *et al.* 1996; Rojas-Avelizapa *et al.* 1999; Shen y Bartha, 1996; Hirschler *et al.* 1998). Las interacciones físicas entre los microorganismos y los contaminantes es fundamental debido a que se debe saber la biodisponibilidad del microorganismo para degradar el contaminante, ya que lo podrá tomar sólo si se encuentra en una fase acuosa, de lo contrario el microorganismo debe tener la capacidad de producir ciertas sustancias llamadas biosurfactantes, para hacer biodisponible el compuesto y así degradarlo (Rojas-Avelizapa *et al.* 1999, Jonge *et al.* 1997).

La biodisponibilidad se ve afectada por varios factores, entre ellos se encuentran: las propiedades físicas, químicas y estructurales tanto de los contaminantes como de los microorganismos y del suelo. La baja solubilidad de los hidrocarburos en agua, está relacionada con la primera etapa de la degradación, la cual involucra una oxigenasa que se encuentra en membrana; por tanto, la membrana celular es el marcador esencial de la bacteria para el contacto directo con el contaminante. Para ello, se han determinado dos mecanismos que sugieren este contacto:

**a) Mecanismos de Adhesión Específica.** Está relacionado con las fimbrias hidrófobas, proteínas de superficie, lípidos o ciertas moléculas de gramidina S (Rosenberg *et al.* 1985), que permiten la adhesión de los hidrocarburos. Aunque las cápsulas bacterianas y otros exopolisacáridos parecen inhibir la adhesión (Rosenberg *et al.* 1983).

**b) Emulsificación de los Hidrocarburos.** La desadsorción de los hidrocarburos es un paso crítico en el crecimiento de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos. *A. calcoaceticus* tiene un mecanismo de desadsorción, el cual asegura la reutilización de la gota de hidrocarburo, entonces la bacteria libera su cápsula para nutrirse. La cápsula bacteriana que el microorganismo produce, está constituida por un heteropolisacárido con cadenas de ácidos. Debido a que el microorganismo produce este polisacárido, se le denomina biosurfactante ya que permite la emulsificación del hidrocarburo de tal manera que lo envuelve y puede adherir la micela formada para utilizarla como fuente de carbono (Rosenberg, 1986).

Por tanto, estos mecanismos permiten utilizar los hidrocarburos y dependiendo del tipo de microorganismos, pueden desarrollar diversas capacidades que tienen una gran aplicación en las tecnologías de limpieza de sitios contaminados por hidrocarburos. 

«La capacidad degradativa de hidrocarburos por parte de estos microorganismos, ha propiciado el desarrollo de investigaciones sobre posibles alternativas para su uso en "biorremediación"»

## Bibliografía...

- Alvares P. J. J., and Vogel T. M. (1995). Degradation of BTEX and their aerobic metabolites by indigenous micro-organisms under nitrate reducing conditions. *Wat. Sci. Tech.* 31(1): 15-28.
- Atlas R. M. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol. Rev.* 45(1): 180-209.
- Bartha R., and Atlas R. M. (1977) The isolation of a thermophilic biosurfactant producing *Bacillus* sp. *Adv. Appl. Microbiol.* 22: 255-266.
- Benazon N., Lafrance P., Simard R. R., and Villeneuve J. P. (1995). The effect of residual kerosene on the transport of ammonium and nitrate ions in sandy soil. *J. Contam. Hydrol.* 20(1-2): 111-116.
- Blasig R., Huth J., Franke P., Bortnelit P., Schunck W-H., and Muller H. G. (1989). Degradation of long-chain n-alkanes by the yeast *Candida maltosa* III. Effect of solid n-alkanes on cellular fatty acid composition. *Appl. Microbiol. Technol.* 31: 571-576.
- Botello A. V., González G. and Díaz G. (1991). Pollution by petroleum hydrocarbons in sediments from continental shelf on Tabasco state, Mexico. *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 46: 565-571.
- Buckley E. N., Jonas R. B., and Pfaender E. K. (1976). Characterisation of microbial isolates from an estuarine ecosystem: relationship of hydrocarbon utilisation to ambient hydrocarbon concentration. *Appl. Environ. Microbiol.* 32(2): 232-237.
- Cameotra S. D., Singh H. D., Hazarika A. K., and Baruah J. N. (1983). Model of uptake of insoluble solid substances by microorganism. II Uptake of solid n-alkanes by yeast and bacterial species. *Biotech. Bioeng.* 25: 2945-2956.
- Cripps R. E. y Watkinson R. J. (1978). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: metabolism and environmental aspects. In "Developments in Biodegradation of Hydrocarbons 1". De. R. J. Watkinson. Applied Science Publishers LTD. London. 113-134.
- Fu M. H. y Alexander M. (1995). Use of surfactants and slurring to enhance biodegradation in soil of compounds initially dissolved in nonaqueous-phase liquids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 551-558.
- Hernán D.C.; Fedorak P.M., y Costerton J. W. (1993). Biodegradation of cycloalkane carboxylic acids in oil sand tailings. *Can. J. Microbiol.* 39: 576-580.
- Jarsjö J., Destouni G. y Yaron B. (1994). Retention and volatilisation of kerosene - Laboratory experiments on glacial and post-glacial soils. *J. Contaminant Hydrology* 17(2): 167-185
- Jonge, H., Freijer J. Y., Verstraten J.M., and Westerveld J. (1997). Relation between bioavailability and fuel oil hydrocarbon composition in contaminated soils. *Environ. Sci. Technol.* 31:771-775
- Labare M. P. y Alexander M. (1995). Enhanced mineralization of organic compounds in non-aqueous-phase liquids. *Environ. Toxicol. Chem.* 9(2) pp 157-265.
- Leahy J. G. y Colwell R. R. (1990). Microbial Degradation of Hydrocarbons in the environment. *Microbiological Rev.* 54(3): 305-315.
- Neufeld R. J., Zajic J. A., y Gerson D. F. (1983). Growth characteristics and cell partitioning of *Acinetobacter* on hydrocarbon substrates. *J. Ferment. Technol.* 61(3): 315-321.
- Oberbremer A. y Müller-Huting R. (1989). Aerobic Stepwise hydrocarbon degradation and formation of biosurfactants by an original soil population in a stirred reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 31(5): 629-634.
- Panigrahi A. K. y Konar S. K. (1989). Acute toxicity of some petroleum pollutants to plankton, fish and benthic organisms. *Environ. Ecol.* 7(1): 44-49.
- Prince R. C. (1993). Petroleum spill bioremediation in marine environments. *Crit. Rev. Microbiol.* 19(4): 217-242.
- Radwan S. S., y Sorkhoh N.A. (1993). Lipids of n-alkane-utilizing microorganisms and their potential application. *Adv. Appl. Microbiol.* 39: 29-90.
- Radwan S. S., Sorkhoh N.A., Felzmann H. y El-Desouky A. F. (1996). Uptake utilisation of n-octacosane and n-nonacosane by *Arthrobacter nicotiniande* KCC B35. *J. Appl. Bacteriol.* 80: 370-374.
- Ristau E. y Wagner F. (1983). Formation of novel anionic trehalose-tetraesters from *Rhodococcus erythropolis* under growth limiting conditions. *Biotechnol. Lett.* 5(2): 95-100.
- Rosenberg E. (1986). Microbial Surfactants. CRC Crit. Rev. In Biotechnol 3: 109-132.
- Rosenberg E., Kaplan N., Pines O., Rosenberg M., Gutnick D. (1983). Capsular polysaccharides interference with adherence of *Acinetobacter*. *FEMS Microbiol. Lett.* 17: 157-161.
- Rosenberg E., Brown D. R., and Demain A.L. (1985). The influence of gramicidin S on hydrophobicity of germinating *Bacillus brevis* spores. *Arch. Microbiol.* 142: 51-54.
- Schnoor J. L. (1992). Industrial Ecology route to slow global change proposed. *Chemical Engineering News.* 70: 7-14.
- Schnoor J. L., Light L. A., McCutcheon S. T., Wolfe N. L. y Carreira L. H. (1995). Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. Pilot and full-scale studies are demonstrating the promise and limitations of using vegetation for remediating hazardous wastes in soil and sediments. *Environ. Sci. Tech.* 29(7): 1-4.
- Setti L., Lanzarini G., y Pifferi P. G. (1995). Dibenzothiophene biodegradation by a *Pseudomonas* sp in model solutions. *Process. Biochem.* 30(8): 721-728.
- Setti L., Rossi M., Lanzarini G., y Pifferi P.G. (1992). The effect of n-alkanes in the degradation of dibenzothiophene and of organic sulphur compounds in heavy oil by a *Pseudomonas* sp. *Biotechnol Lett.* 14(6): 551-520.
- Sing A. K.; Gaur J. P. (1990). Effects of petroleum oils and their paraffinic, asphaltic and aromatic fractions on photosynthesis and respiration of microalgae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 19(1): 8-16
- Swannell R. P., Leck K., McDoagh M., (1996). Field evaluations of marine oil spill bioremediation. *Microbiol. Rev.* 60(2): 342-365.
- Vermace E. M.; Christensen F. R.; Parkin F.G.; Alvares P. J. J. (1996). Relationship between the concentration of denitrifiers and *Pseudomonas* spp. In soils: Implications for BTX bioremediation. *Water Res.* 30(13): 2630-2636.
- Wang T. C., Weissman., Ramesh G., Varadarajan R., ad Benemann J. R. (1995).
- Wilson N. G. y Bradley G. (1996). Enhanced degradation of petrol (Slovene diesel) in an aqueous system by immobilised *Pseudomonas fluorescens*. *J. Appl. Bacteriol.* 80: 99-104.
- ZoBell C. E. (1946). Action of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriol. Rev.* 10: 443-486.