

DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO UTILIZANDO UN MICROBIOMA AGRÍCOLA

DEGRADATION OF PETROLEUM HYDROCARBONS USING AN AGRICULTURAL MICROBIOME

Cruz-Narváez, Y.¹; Rico-Arzate, E.^{*1}; Castro-Arellano, J.¹; Guajardo-Hernández, L.G.²; Almeraya-Quintero, S.X.²

¹Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas del Instituto Politécnico Nacional, Laboratorio de Posgrado e Investigación de Operaciones Unitarias, Unidad Profesional Adolfo López Mateos Del. Gustavo A. Madero Ciudad de México C.P. 07738. ²Estudios del Desarrollo Rural, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, México.

***Autor de Correspondencia:** ericoarz@yahoo.com

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió la capacidad de degradación de un microbioma, extraído de un suelo agrícola del sureste mexicano contaminado con hidrocarburos del petróleo, como método de biorremediación. Se prepararon muestras de agua contaminada con diesel comercial y con un petróleo ligero de 30°API. Las muestras fueron inoculadas con el microbioma en crecimiento, analizándose la concentración de hidrocarburos por cromatografía de gases (GC-FID), espectroscopía UV-vis e IR-ATR, el crecimiento microbiano por cuenta en placa. Se obtuvieron eficiencias de degradación de 95 % para las muestras de agua contaminadas con petróleo y 98 % para las muestras de agua contaminadas con diesel.

Palabras clave: biodegradación, aerobio, adaptación.

ABSTRACT

In this study, the degradation capacity of a microbiome extracted from an agricultural soil in the Mexican southeastern area contaminated with petroleum hydrocarbons was researched as a bioremediation method. Samples of contaminated water were prepared with commercial diesel and light petroleum of 30°API. The samples were inoculated with the growing microbiome, and the concentration of hydrocarbons by gas chromatography (GC-FID), spectroscopy UV-vis and IR-ATR, microbial growth by count on a sheet was analyzed. Degradation efficiencies of 95 % were obtained for the water samples contaminated with petroleum and 98 % for the samples of water contaminated with diesel.

Keywords: biodegradation, aerobic, adaptation.

Agroproductividad: Vol. 10, Núm. 4, abril, 2017. pp: 92-99.

Recibido: febrero, 2017. **Aceptado:** abril, 2017.

INTRODUCCIÓN

La Comisión Nacional de Hidrocarburos (CNH) ha reportado que desde el año 2000 se han derramado 93320 barriles de petróleo, de los cuales 85% han sido en tierra (CNH, 2014). Las alternativas para limpieza y descontaminación de zonas impactadas son muy caras, difíciles de aplicar, o bien, provocan que la contaminación se extienda a mayores áreas (Cummings, 2010). Entre estas alternativas están el lavado de suelos, el uso de barreras reactivas o la oxidación con agentes químicos. En algunas de estas técnicas se producen intermediarios por oxidación, los cuales tienen mayor toxicidad que los compuestos inicialmente presentes (Huaiquilaf, 2008). La aplicación de microorganismos con actividad degradadora es una estrategia que se ha utilizado desde hace varias décadas (González *et al.*, 2010). Su versatilidad y su impacto positivo en el ambiente han sido reportados (D'adamo *et al.*, 1984; Huaiquilaf, 2008; Kaplan and Kitts, 2004; Kurisu, 2008; Tahhan *et al.*, 2011). También se ha demostrado que tiene efectos como mejorador de suelos, haciéndolos aptos para el cultivo de algunas especies vegetales. Los microorganismos tienen diferentes mecanismos a través de los cuales son capaces de metabolizar los hidrocarburos, sin embargo, existen limitaciones que se relacionan con la presencia o ausencia de oxígeno, elementos esenciales y con la concentración de hidrocarburos en el medio. El mecanismo para conseguir la degradación de hidrocarburos puede ser aerobio o anaerobio. En ambos casos el microorganismo debe ingresar las moléculas del hidrocarburo al interior de su membrana celular mediante diferentes vías, y para lograrlo, puede involucrar la acción de exoenzimas, las cuales disminuyen el tamaño de la molécula, o surfactantes, sintetizados por el propio microorganismo, para hacer biodisponible las moléculas. Por tanto, existen propiedades que cambian en un sistema contaminado y que son evidencia indirecta de actividad metabólica sobre los hidrocarburos contaminantes, tal como la variación de la tensión superficial (Das y Chandran, 2011). Aunque la importancia de la actividad microbiana en pozos petroleros se conoce desde hace mucho tiempo, el estudio sobre la naturaleza y diversidad del desarrollo bacteriano en esos ecosistemas es pobre y su actividad metabólica *in situ* aún no ha sido totalmente esclarecido (Magot *et al.*, 2000). Una amplia variedad de microorganismos han sido aislados o detectados en fracciones de crudo mediante técnicas moleculares (aerobias, anaerobias facultativas y microaerofílicas). Las transformaciones que los microorganismos pueden llevar a cabo han revolu-

cionado la industria petroquímica en los últimos 20 años y estas incluyen biodesulfuración, biodenitrogenación, biodesmetalización, bioemulsificación y recuperación mejorada de petróleo por microorganismos (Magot *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2012). Todas las operaciones en la industria del petróleo, tales como exploración, producción, transporte y refinamiento son fuentes potenciales de contaminación de agua, suelo y aire (Caliman *et al.*, 2011). Entre las tecnologías disponibles para la limpieza de zonas contaminadas por hidrocarburos, la biorremediación y fitorremediación son las más económicas y más amigables con el ambiente. Las bacterias son capaces de degradar compuestos tóxicos orgánicos, tales como xenobióticos, que incluyen herbicidas, pesticidas, refrigerantes, solventes, etcétera. también actúan como mejoradores de la fitorremediación, participando activamente en el proceso (Glick, 2010; Singh *et al.*, 2012). La comprensión de los procesos involucrados en la biotransformación, biodegradación y biorremediación del petróleo por parte de los microorganismos ha ido esclareciéndose, gracias al desarrollo de técnicas moleculares, debido a que menos de 1% de microorganismos son cultivables en condiciones de laboratorio. Estas técnicas permiten estudiar material genético de todo un conjunto de microorganismos sin necesidad de aislar y cultivar. Estas mismas técnicas han permitido la caracterización detallada de la estructura de la membrana bacteriana, lo cual permite establecer mecanismos de ingreso y ascensión de las moléculas de hidrocarburos al interior celular (Van Hamme *et al.*, 2003). La comprensión de este mecanismo es vital para la aplicación de principios correctos de ingeniería (Singh *et al.*, 2012; Van Hamme *et al.*, 2003). Se ha reportado el uso de microorganismos para el monitoreo de diferentes compuestos orgánicos contaminantes como alcanos, benceno y derivados, naftaleno, salicilatos, bifenilos policlorados y clorocatecoles (Daunert *et al.*, 2000). Entre los microorganismos reportados con actividad degradadora de hidrocarburos se encuentran *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Corynebacterium* y *Rhodococcus* (Das and Chandran, 2011). En el metabolismo aerobio de alcanos, *Pseudomonas putida*, con la enzima monooxigenasa unida a la membrana permite la conversión de un alcano en un alcohol, el cual puede ser oxidado más tarde en un aldehído y en ácido para proceder a la β -oxidación y al ciclo de los ácidos tricarbónicos (Patel *et al.*, 2012; Van Hamme *et al.*, 2003). En la Figura 1 se muestra la regulación que se lleva a cabo por un par de operones para

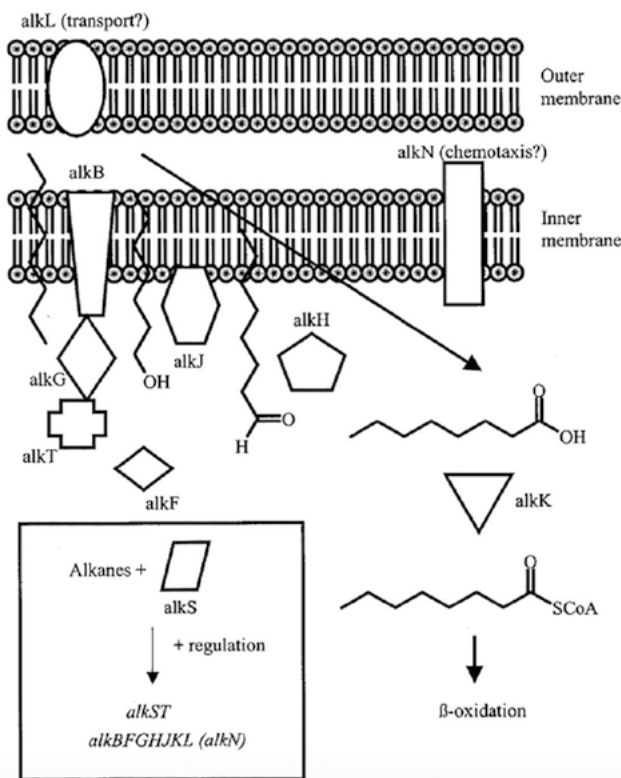


Figura 1. Transformación de alcanos en acetil coenzima-A, mediada por el operón *alkBFGHJKL* y el operón *alkST* que decodifica la rubredoxina reductasa [tomado de (Van Hamme *et al.*, 2003)].

transformar alcanos en acetil coenzima-A (Van Hamme *et al.*, 2003). Se ha reportado que *Pseudomonas putida*, *Burkholderia cepacia* y *Acinetobacter sp.* poseen operones con capacidad degradadora del tipo *alk* (Magot *et al.*, 2000; Van Hamme *et al.*, 2003). En *Acinetobacter sp.* se ha descrito una vía donde una dioxigenasa convierte un alcano a aldehídos a través de *n*-alquilhidroperoxidasa sin un alcohol intermedio. Esta dioxigenasa requiere oxígeno molecular para catalizar la oxidación de los *n*-alcanos (C_{10} a C_{30}) y alquenos (C_{12} a C_{20}) sin la producción de radicales (Van Hamme *et al.*, 2003). Uno de los principales factores que limita la biodegradación de un hidrocarburo es su biodisponibilidad (Barathi and Vasudevan, 2001).

Los hidrocarburos difieren en su susceptibilidad para ser atacados por un microorganismo en el siguiente orden: alcanos lineales, alcanos ramificados, aromáticos pequeños, cicloalcanos y con mayor dificultad los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs, por sus siglas en inglés) (Das and Chandran, 2011), y los factores que afectan la efectividad de la biodegradación de hidrocarburos son las propiedades fisicoquímicas del contaminante, como la temperatura, debido a que afecta directamente la química de los contaminantes, su solubilidad, fisiolo-

gía y diversidad de la microflora, presencia de nutrientes, tales como nitrógeno, fósforo y ocasionalmente hierro (Atlas M. Ronald, 1981; Das and Chandran, 2011; Van Hamme *et al.*, 2003).

MATERIALES Y MÉTODOS

Adaptación de consorcio microbiano

El medio mínimo (1.2 ml L^{-1} FeCl_2 0.1%, KH_2PO_4 0.5 g L^{-1} , MgCl_2 0.4 g L^{-1} , NaCl 0.4 g L^{-1} , NH_4Cl 0.4 g L^{-1} , CaCl_2 0.05 g L^{-1} , 1 ml L^{-1} solución elementos traza: ZnSO_4 10 mg L^{-1} , MnCl_2 3.0 mg L^{-1} , H_3BO_3 30 mg L^{-1} , CoCl_2 20 mg L^{-1} , CuCl_2 1.0 mg L^{-1} , NiCl_2 2.0 mg L^{-1} , Na_2MoO_4 3.0 mg L^{-1} ; todos los reactivos grado analítico proporcionados por Fermont) fue inoculado con una relación de 1 g de soporte (conteniendo el microbioma) por cada 100 mL de solución. Se mantuvo en agitación a 200 rpm por 3 h a 30°C para ser filtrado posteriormente. Para la adaptación del microbioma se tomaron tres volúmenes de 9 mL de la solución de medio mínimo inoculadas. Se agregaron 1 mL de diesel y 1 mL de petróleo de 30°API , manteniéndose en agitación a 200 rpm a 30°C por 36 h. Se realizó el conteo en placa de las soluciones obtenidas.

Contaminación de muestras de agua y montaje de reactores y métodos analíticos

Las muestras de agua contaminada fueron preparadas tomando nueve volúmenes de medio mínimo por un volumen del hidrocarburo (diesel o petróleo). Los sistemas se mantuvieron en agitación por 24 h a 200 rpm a 30°C . Se utilizaron tres reactores (Figura 2), con un volumen de 600 mL. Se mantuvieron condiciones aerobias, proporcionando un flujo de aire de 60 L h^{-1} y una

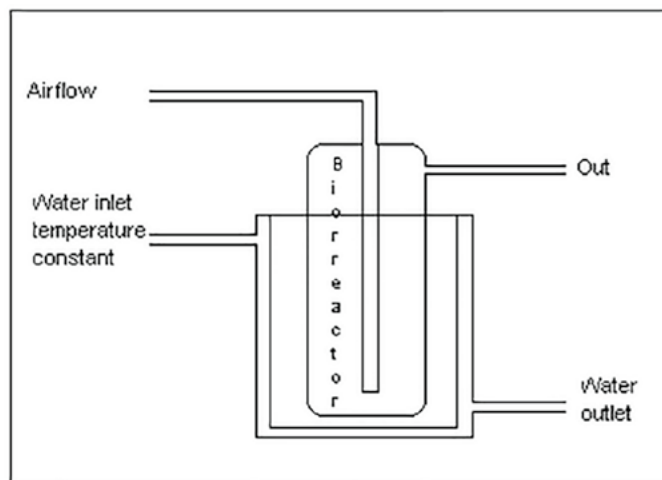


Figura 2. Biorreactor utilizado en el estudio de degradación de hidrocarburos por el microbioma agrícola.

temperatura constante de 30 °C. Los reactores fueron cargados con 450 ml de muestra contaminada, dos con muestra contaminada con petróleo y dos con muestra contaminada con diesel. Se adicionaron 50 ml del inóculo correspondiente a un reactor conteniendo muestra contaminada con diesel y a otro con muestra contaminada con petróleo. Los dos restantes se completaron con solución de medio mínimo para tomarse como blancos. Las condiciones se mantuvieron por seis días, tomando muestras de 2 ml cada 12 h.

Análisis por espectrofotometría de UV-vis, IR-ATR y cromatografía de gases

Debido a que las técnicas espectrofotométricas de UV-vis e IR-ATR no son destructivas, las muestras tomadas fueron medidas primero por estas dos técnicas. Se utilizó un espectrofotómetro de ultravioleta-visible (Ocean Optics Serie Jaz, USA) y uno de infrarrojo con reflexión total atenuada (Perkin Elmer Spectrum-100, USA). Se utilizó 0.5 ml de CCl_4 por cada 2 ml de muestra para la extracción. La fase orgánica obtenida fue filtrada a través de fibra de vidrio con Na_2SO_4 anhidro (Fermont) para eliminar cualquier traza de agua presente. El ex-

tracto fue recibido en un vial ambar de 2 ml y sometido al análisis de cromatografía de gases. Se utilizó una jeringa de 10 μl para inyectar 1 μl de muestra en un cromatógrafo de gases (GC Clarus 580 Perkin Elmer Inc, USA) equipado con un detector de ionización de flama (FID). Se usó una columna capilar Elite-MS (30 m x D.I. 0.25 mm x espesor de película 0.25 μm). El gas de arrastre fue nitrógeno con un flujo de 1 ml min^{-1} . La temperatura del inyector fue de 350 °C. Se usó una rampa de temperatura (50 °C (1 min), $\Delta 15$ °C hasta 180 °C, $\Delta 7$ °C hasta 230 °C, $\Delta 30$ °C hasta 380 °C) para lograr la separación de los hidrocarburos en la columna. La cuantificación se realizó con una curva de referencia, usando diesel comercial en CCl_4 . Para el recuento de microorganismo se utilizaron placas 3M™ Petrifilm™ para el recuento de aerobios, de acuerdo con la metodología marcada por el fabricante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la degradación de los hidrocarburos a través de uv-visible se muestran en la Figura 3, y la disminución de la concentración del sustrato hidrocarbonado se muestra en la Figura 4.

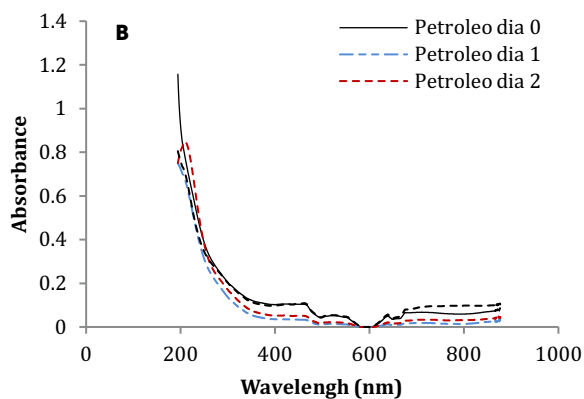
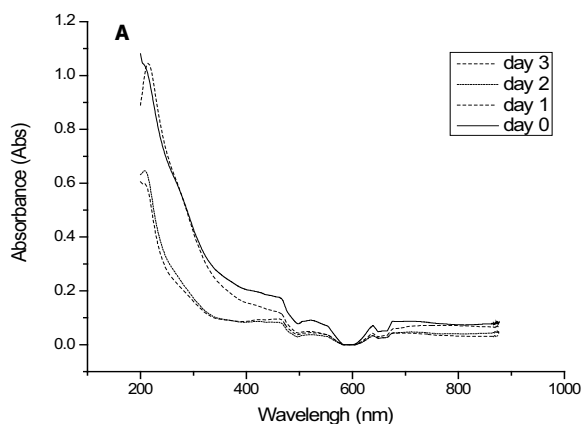


Figura 3. Decremento de la concentración de compuestos aromáticos en la muestra de agua contaminada con A: diesel y B: petróleo a través de espectrofotometría UV-vis.

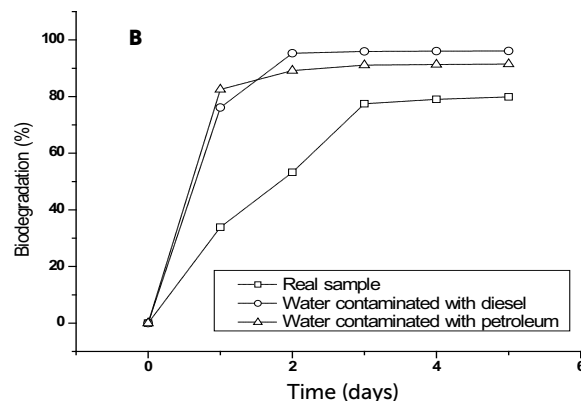
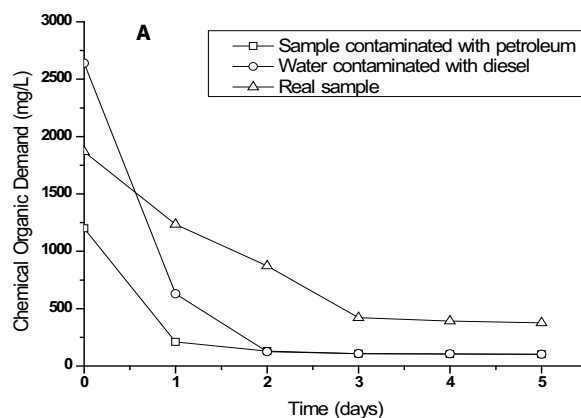


Figura 4. A: Disminución de DQO y B: porcentaje de biodegradación.

En el tercer día de tratamiento se alcanzó una degradación por el consorcio microbiano de 96% para el agua contaminada con diesel y 91.5% para la contaminada con petróleo. Los cromatogramas obtenidos se muestran en las figuras 5 y 6. La degradación de cada fracción obedece a su complejidad y contenido de carbonos. Las fracciones degradadas más rápidamente fueron con menor número de carbonos. Por otra parte, las que tuvieron la mayor cantidad persistieron durante más tiempo. Los microorganismos que conforman el consorcio microbiano utilizado degradaron primero los componentes presentes de menor complejidad y menor peso molecular. Los compuestos remanentes después del tratamiento tienen menos de 16 carbonos, ya que la degradación microbiana fragmenta los hidrocarburos de mayor peso molecular en moléculas más pequeñas, como se muestra en la Figura 7 (Tahhan et al., 2011).

En los espectros infrarrojos que se muestran en la Figura 8 se observan los picos característicos del estiramiento C-H propio de los hidrocarburos presentes en las muestras de agua contaminada en la región de 2950-3000

cm⁻¹. Al final del tercer día de tratamiento los picos no se detectan, lo que confirma la alta eficiencia obtenida con el consorcio utilizado.

La ecuación que relaciona el número de células microbianas con la masa de peso seco es (D'adamo et al., 1984):

$$W=7\times 10^{-6} UFC+3382.6$$

Donde: W[=]mg/L; UFC[=]n° de microorganismos/mL

El tratamiento de los datos obtenidos se realizó a través del modelo propuesto por Monod (Monod 1949):

$$r_g = \frac{\mu_{m\acute{a}x} C_s C_c}{K_s + C_s}$$

Los parámetros $\mu_{m\acute{a}x}$ y K_s se obtuvieron a través de la forma de Hanes-Woolf de la ecuación de Monod (Bacosa et al., 2011) (Cuadro 1), y los perfiles de degradación y crecimiento microbiano a una temperatura de 30 °C se muestran en la Figura 9 para el diesel y el petróleo.

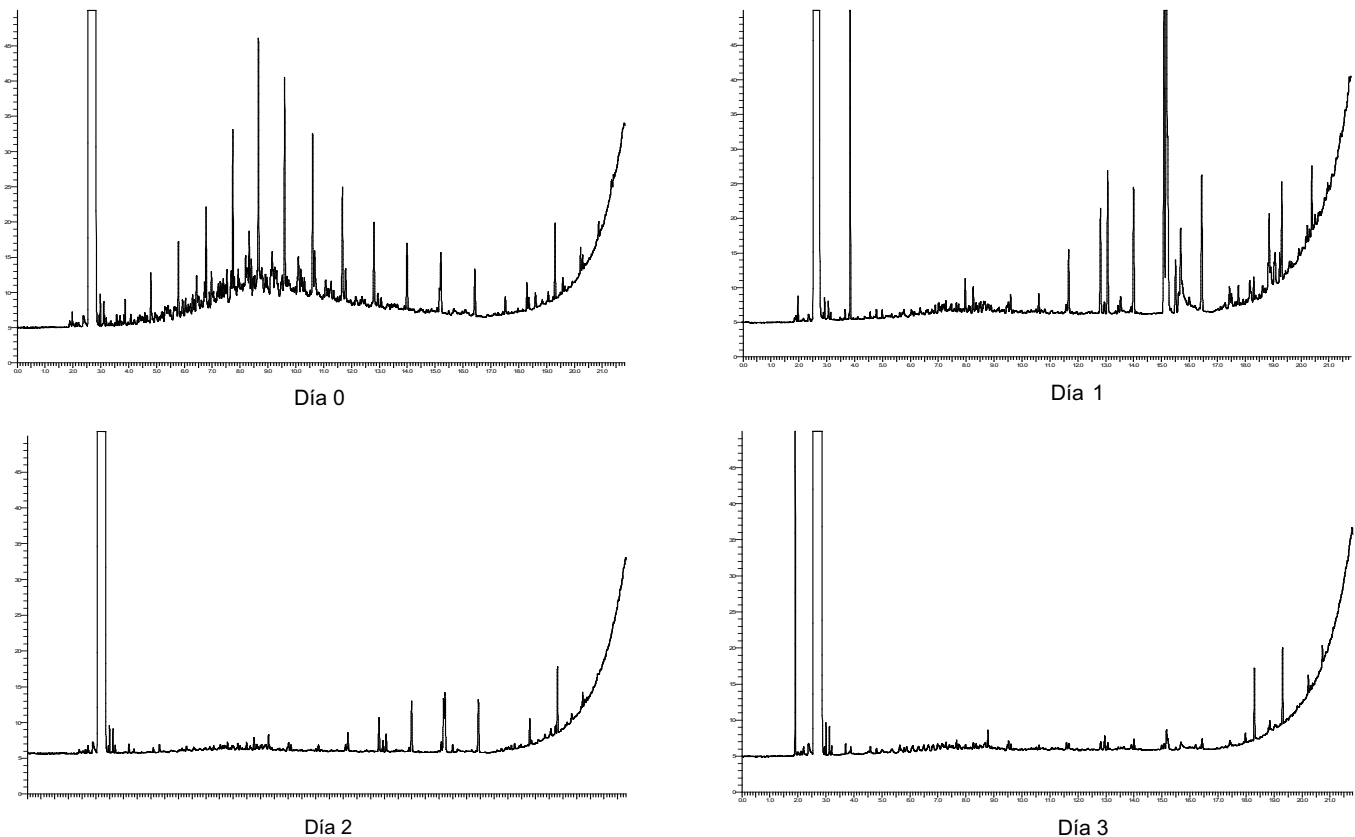


Figura 5. Cromatogramas obtenidos durante la biodegradación de las muestras de agua contaminadas con diesel.

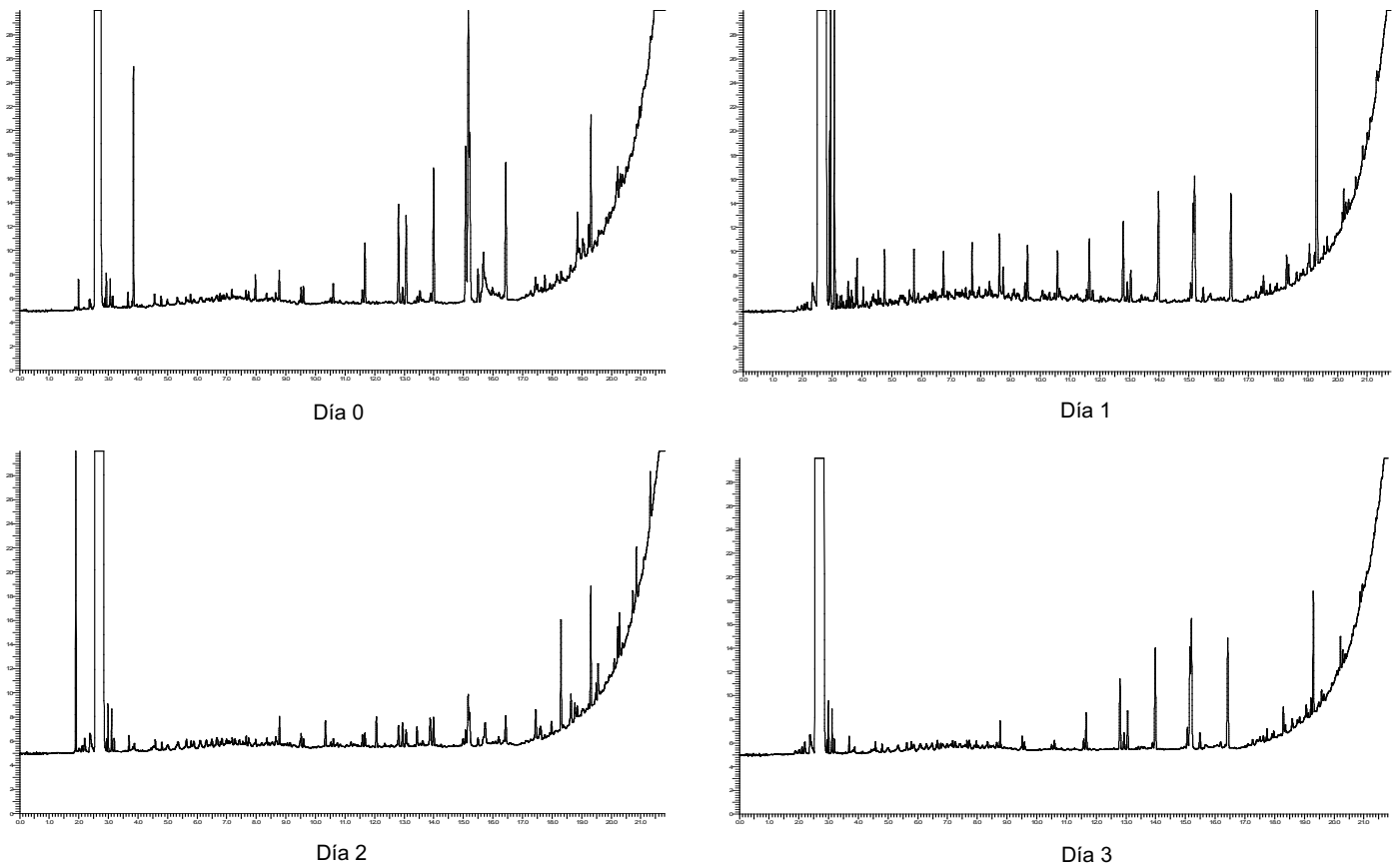


Figura 6. Cromatogramas obtenidos durante la biodegradación de las muestras de agua contaminadas con petróleo.

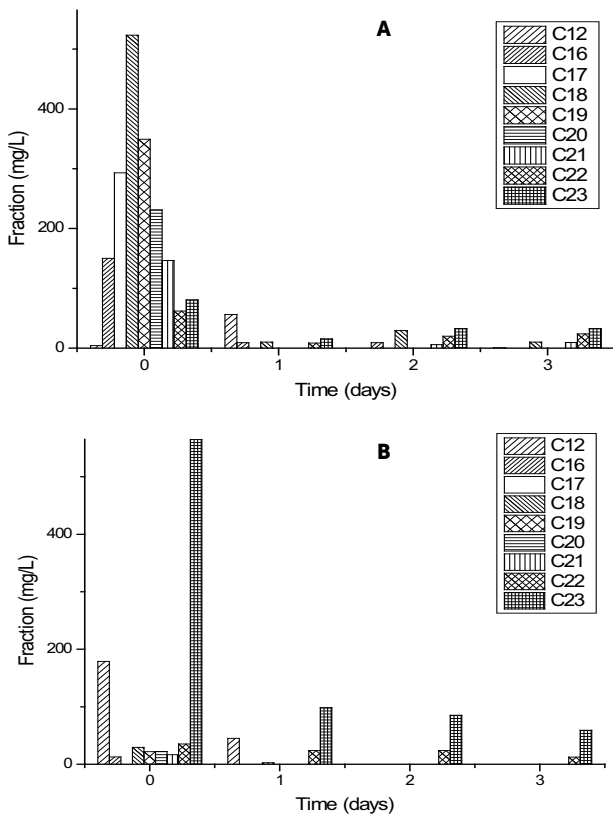


Figura 7. Biodegradación de hidrocarburos en agua contaminada. A: con diesel y B: con petróleo.

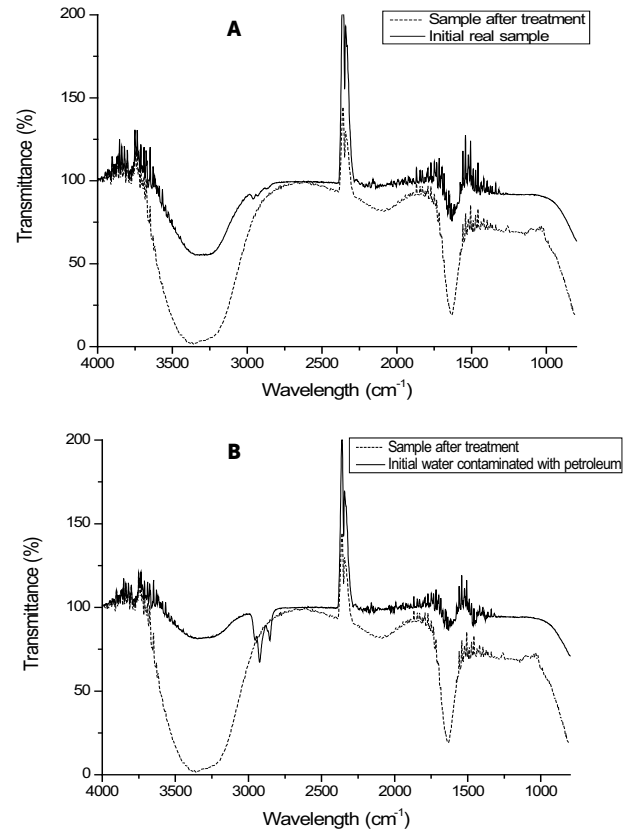


Figura 8. Espectros de infrarrojo en el inicio y final del tratamiento de muestras de agua contaminada. A: con diesel y B: con petróleo.

Cuadro 1. Valores de los parámetros $\mu_{m\acute{a}x}$ y K_s para el agua con petr3leo y con diesel.						
	Agua contaminada con petr3leo			Agua contaminada con diesel		
Temperatura	20 3C	30 3C	40 3C	20 3C	30 3C	40 3C
$\mu_{m\acute{a}x}$ [dia ⁻¹]	1.1976	1.6085	3.7693	0.3098	0.4841	0.6748
K_s [mg/L]	815.904	1096.493	2555.107	109.468	99.951	78.946
R^2	0.95	0.94	0.93	0.93	0.86	0.90

Cuadro 2. Balances considerados en el biorreactor en fase libre.	
Balace	Ecuaci3n
C3lulas	$\frac{dC_c}{dt} = r_g - r_d$
Sustrato	$\frac{dC_s}{dt} = Y_{s/c}(-r_g) - mC_c$
Producto	$V \frac{dC_p}{dt} = r_p V = Y_{p/s}(-r_s)V$

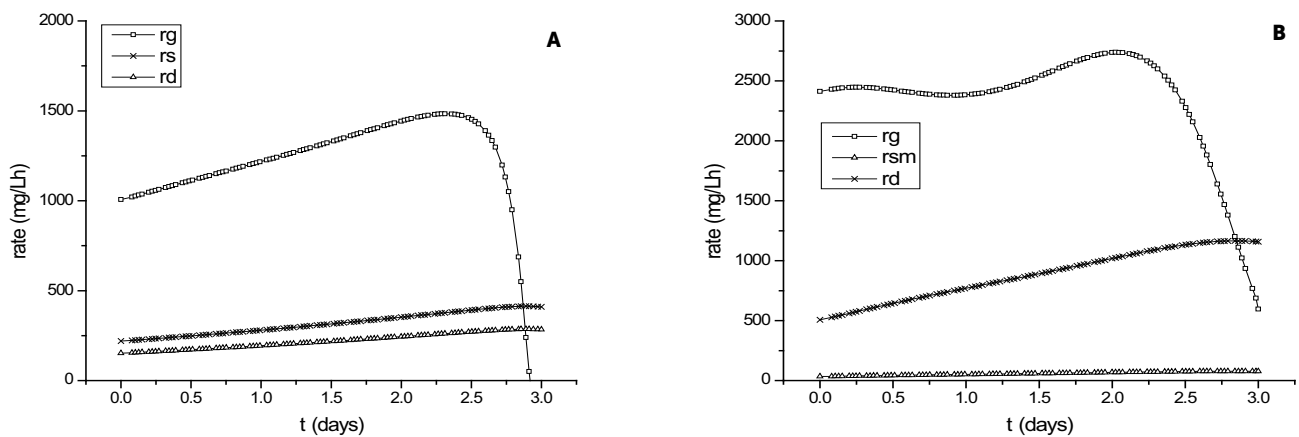


Figura 9. Perfil de velocidades obtenido con el modelo de Monod para de biodegradaci3n a 30 3C. A: diesel y B: petr3leo.

Los balances propuestos para realizar el modelado de las ecuaciones se proporcionan en el Cuadro 2, donde se consider3 el factor de muerte y el de mantenimiento celular.

Los hidrocarburos remanentes despu3s de tratamiento podr3an degradarse totalmente si las condiciones de desarrollo microbiano 3ptimas se mantienen durante un mayor tiempo.

CONCLUSIONES

El tiempo para alcanzar un grado de degradaci3n de contaminantes mayor a 90% fue de tres d3as, observando que existe un intervalo 3ptimo de temperatura de operaci3n

entre 30 3C y 40 3C. Es posible reducir la contaminaci3n por hidrocarburos del agua a valores que ya no representen toxicidad al medio ambiente. La cin3tica de Monod, para este consorcio, describe adecuadamente el crecimiento bacteriano, no as3 la utilizaci3n de sustrato ni la generaci3n de producto; esto debido a que la medida del sustrato se realiz3 a trav3s de DQO, el cual es capaz de oxidar las c3lulas microbianas, lo cual puede incrementar el valor del contaminante presente. La tasa de mantenimiento se reduce realizando el aporte de energ3a al sustrato, por lo que las actividades metab3licas dentro de la c3lula microbiana se enfocan en la degradaci3n del mismo. Esto mejora el rendimiento general del consorcio. Se obtuvieron eficiencias de biodegradaci3n de 96% para el diesel y de 91.5% para el

petróleo (medidos a través de la reducción de DQO), y de 95.8% para el diesel y 93.8% para petróleo (medidos como hidrocarburos totales del petróleo), con una adaptación previa del consorcio bacteriano. En diferente sustrato, es decir, en diesel y petróleo, la velocidad máxima de crecimiento microbiano a la misma temperatura fue el cuadrado de su correspondiente valor; es decir, para el petróleo el valor fue n^2 veces el valor del diesel.

LITERATURA CITADA

- Atlas M.R. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol. Rev.* 45, 180–209.
- Bacosa H.P., Suto K., Inoue C. 2011. Preferential utilization of petroleum oil hydrocarbon components by microbial consortia reflects degradation pattern in aliphatic–aromatic hydrocarbon binary mixtures. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 1109–1117. doi:10.1007/s11274-010-0557-6
- Barathi S., Vasudevan N., 2001. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. *Environ. Int.* 26, 413–416.
- Caliman F.A., Robu B.M., Smaranda C., Pavel V.L., Gavrilescu M., 2011. Soil and groundwater cleanup: benefits and limits of emerging technologies. *Clean Technol. Environ. Policy* 13, 241–268. doi:10.1007/s10098-010-0319-z
- CNH. 2014. Comisión Nacional de Hidrocarburos.
- Cummings S.P. (Ed.). 2010. Bioremediation, *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ.
- D'adamo P.D., Rozich, A.F., Gaudy, A.F., 1984. Analysis of growth data with inhibitory carbon sources. *Biotechnol. Bioeng.* 26, 397–402.
- Das N., Chandran P., 2011. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnol. Res. Int.* 2011, 1–13. doi:10.4061/2011/941810
- Daunert S., Barrett G., Feliciano J.S., Shetty R.S., Shrestha S., Smith-Spencer W. 2000. Genetically Engineered Whole-Cell Sensing Systems: Coupling Biological Recognition with Reporter Genes. *Chem. Rev.* 100, 2705–2738. doi:10.1021/cr990115p
- Glick B.R. 2010. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnol. Adv.* 28, 367–374. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.02.001
- González H.H.R., Bustillos L.G.T., Fernández I.M., Cortes J. de J.B., Moroyoqui P.G., 2010. Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Quím. Viva* 9, 120–145.
- Huaiquilaf B.C. 2008. Contaminación de aguas subterráneas por hidrocarburos líquidos livianos en fase no acuosa. *Cienc. Ahora*.
- Kaplan C.W., Kitts C.L. 2004. Bacterial Succession in a Petroleum Land Treatment Unit. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1777–1786. doi:10.1128/AEM.70.3.1777-1786.2004
- Kurusu F. 2008. 11. Bioremediation of Groundwater and Soil in Urban Areas. *Groundw. Manag. Asian Cities Technol. Policy Sustain.* 2, 207.
- Magot M., Ollivier B., Patel B.K. 2000. Microbiology of petroleum reservoirs. *Antonie Van Leeuwenhoek* 77, 103–116.
- Patel V., Cheturvedula S., Madamwar D. 2012. Phenanthrene degradation by *Pseudoxanthomonas* sp. DMVP2 isolated from hydrocarbon contaminated sediment of Amlakhadi canal, Gujarat, India. *J. Hazard. Mater.* 201-202, 43–51. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.11.002
- Singh A., Singh B., Ward O. 2012. Potential applications of bioprocess technology in petroleum industry. *Biodegradation* 23, 865–880. doi:10.1007/s10532-012-9577-2
- Tahhan R.A., Ammari T.G., Goussous S.J., Al-Shdaifat H.I. 2011. Enhancing the biodegradation of total petroleum hydrocarbons in oily sludge by a modified bioaugmentation strategy. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 65, 130–134. doi:10.1016/j.ibiod.2010.09.007
- Van Hamme J.D., Singh A., Ward O.P. 2003. Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 503–549. doi:10.1128/MMBR.67.4.503-549.2003

