

AVANCES EN EL USO DE MICROORGANISMOS PARA LA REMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS.

GERMAN ZAFRA, ÁNGEL E. ABSALÓN, DIANA V. CORTÉS-ESPINOSA

Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (CIBA-IPN). Ex-Hacienda San Juan Molino, Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, Tlaxcala, México.

* Autor principal. E-mail: dcortes@ipn.mx. Tel./fax: +52 (248) 48707 65

RESUMEN

La contaminación de los suelos con hidrocarburos es un problema ambiental prioritario. Los episodios de contaminación continua con petróleo crudo y sus derivados, favorecen el depósito y acumulación de compuestos xenobióticos y potencialmente tóxicos en los suelos. Uno de los contaminantes ambientales que se consideran prioritarios debido a su alta toxicidad y persistencia, son los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs). Los PAHs son hidrocarburos que poseen características que favorecen su toxicidad y persistencia en el suelo, representando un riesgo para la flora y la fauna de los hábitats afectados. En esta nota se describen brevemente las investigaciones realizadas y algunos de los avances obtenidos en el CIBA-IPN en cuanto a la biorremediación de suelos contaminados con PAHs utilizando microorganismos nativos, modificados genéticamente y consorcios microbianos mixtos. Los resultados obtenidos demuestran que la biorremediación es una tecnología eficaz y promisoría para la remediación de suelos contaminados con PAHs, representando una alternativa costo-efectiva y amigable con el medio ambiente.

Palabras Clave: Biorremediación, PAHs, microorganismos, suelos, degradación

ABSTRACT

Contamination of soils with hydrocarbons is a priority environmental problem. Continuous contamination with crude oil and its derivatives favor the deposition and accumulation of xenobiotics and potentially toxic compounds in soils. One of the environmental pollutants considered as a priority in Mexico because of its high toxicity and persistence are the Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). PAHs possess characteristics that favor their toxicity and persistence in soil, representing a risk for the flora and fauna of affected habitats. This note briefly describes the research conducted at CIBA-IPN regarding the bioremediation of soils contaminated with PAHs by using native and genetically modified microorganisms, as well microbial consortia. The results demonstrate that bioremediation is an effective and promising technology for the remediation of soils contaminated with PAHs, being a cost-effective and environmentally friendly alternative.

Key Words: Bioremediation, PAHs, microorganisms, soils, degradation

Introducción

Durante las últimas décadas el avance de diferentes actividades industriales a nivel mundial, pero en especial de la industria petroquímica y de refinación del petróleo, ha dado origen a grandes cantidades de residuos peligrosos. Los accidentes y emergencias ambientales tales como fugas, derrames e incendios durante el almacenamiento y transporte del petróleo crudo y sus derivados, así como la disposición no controlada de los residuos que se generan, contribuyen en gran medida a la contaminación de los suelos y cuerpos de agua. En el caso particular de México, existe un número elevado de sitios con suelos contaminados con hidrocarburos. Según PEMEX, al finalizar el año 2013 el área total de la superficie de suelo afectada con hidrocarburos fue de 1,020.24 hectáreas, tan solo un 0.3% menos que el año 2012. Además

se presentaron 153 eventos de fugas y derrames; en total, tan solo en 2013 se estima un total de 7276 barriles de hidrocarburos derramados en suelos [1]

Los constantes episodios de contaminación con petróleo y sus derivados favorecen el depósito y acumulación de compuestos tóxicos en los suelos. Uno de los contaminantes ambientales que se consideran prioritarios debido a su alta toxicidad y persistencia son los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs). Los PAHs son compuestos químicos presentes en el petróleo crudo y poseen características físicas y químicas que favorecen su persistencia en el ambiente, así como de altos niveles de toxicidad. Por lo tanto los PAHs son contaminantes ambientales que pueden tener un fuerte impacto sobre la flora y la fauna de los hábitats afectados, resultando en la acumulación de productos

Thermolab

Resposta no mayor a 72 hrs.
Garantía mínima de 1 año
Soporte Técnico
Servicio de mantenimiento
Stock para entrega inmediata

Equipos de Laboratorio

- AGITADOR MAGNÉTICO
- AGITADOR ORBITAL
- AUTOCLAVE
- BALANZA ANALÍTICA
- BAÑO CON AGITACIÓN
- BAÑO REFRIGERADO
- BAÑO ULTRASONICO
- CÁMARA DE HUMEDAD
- CÁMARA PARA PRUEBAS DE ESTABILIDAD
- CAMPANA DE FLUJO LAMINAR
- CAMPANA EXTRACTORA DE HUMO
- CENTRÍFUGA CLÍNICA
- CENTRÍFUGA C/S REFRIGERACIÓN
- CENTRÍFUGA DE ISO
- CONCENTRADOR DNA / PROTEÍNAS
- CONGELADOR
- CONTENEDOR DE NITRÓGENO L
- CUARTOS DE GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO
- DIGESTOR KJELDAHL
- FERMENTADOR
- HOMOGENIZADOR
- HORNO
- HORNO DE HIBRIDACIÓN
- INCUBADORA BOD
- INCUBADORA CO₂
- LIOFILIZADOR
- MICROCENTRÍFUGA
- MICROPIPETA
- MUFLA
- PARRILLA C/S AGITACIÓN
- PROPÍPETA
- RECIRCULADOR DE AGUA
- REFRIGERADOR
- SONICADOR
- TERMOBLOCK
- TITULADOR
- ULTRACENTRÍFUGA
- ULTRACONGELADOR
- VORTEX

Partners: NORLAK, Hettich, AC Gene, CONVIRON, INFORS HT, VELP SCIENTIFICA, etc.

Servicios: Biología Molecular, Laboratorio de Control Ambiental, Control de Fugas, etc.

Contacto: T (5255) 5603-4700, clientes@thermolab.mx

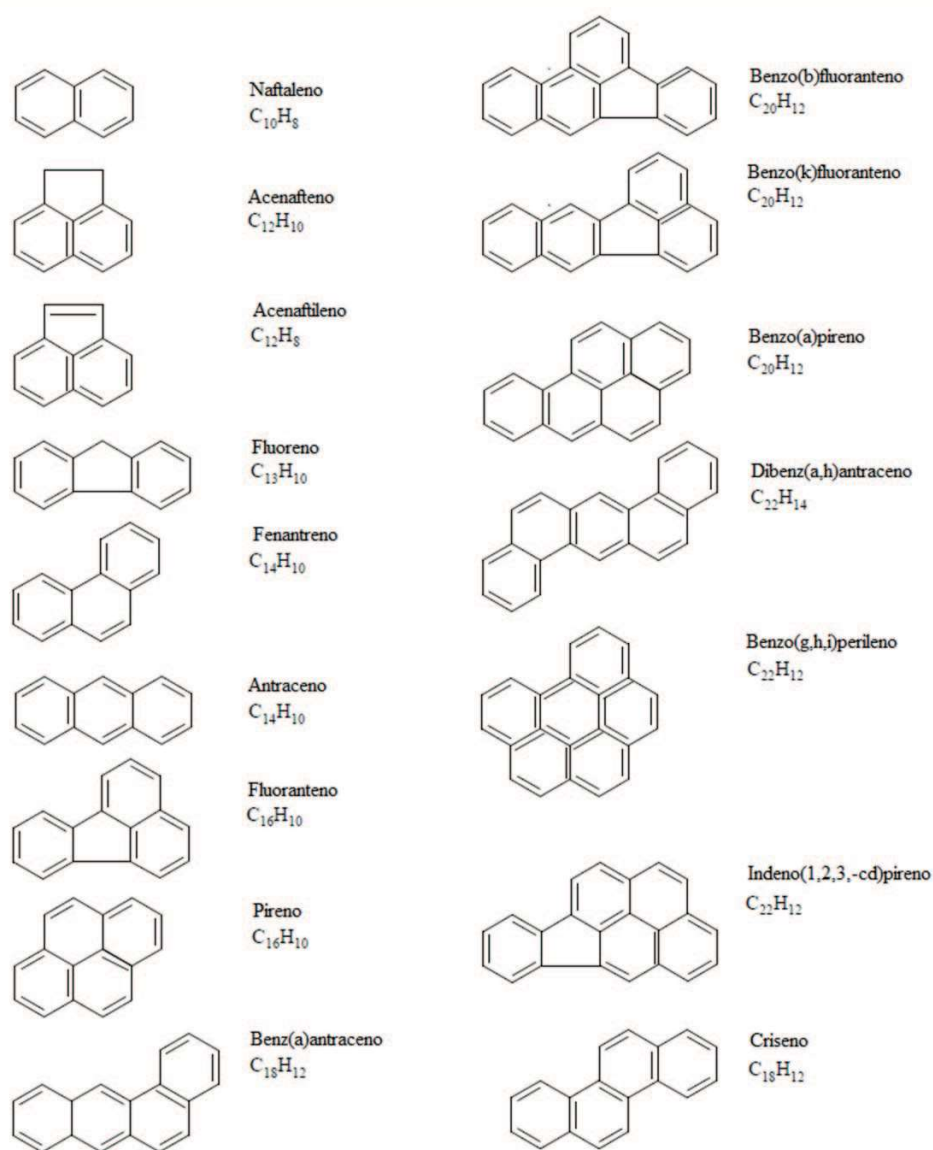


Figura 1. Estructura y fórmula molecular de 16 PAHs designados como contaminantes prioritarios por la US-EPA

químicos tóxicos y en problemas de salud graves o defectos genéticos en animales y seres humanos. La agencia de protección ambiental de USA ha designado a 16 de estos compuestos como prioritarios por su alta toxicidad y recalcitrancia (figura 1) [2].

En respuesta a esta problemática el grupo de investigación en *biotecnología ambiental y biorremediación* del CIBA-IPN ha venido adelantando investigaciones relacionadas con la recuperación y remediación de los suelos contaminados con PAHs y otros

hidrocarburos. El trabajo realizado hasta el momento se centra en la biorremediación de los suelos utilizando microorganismos tales como hongos y bacterias para descontaminar los suelos. En este artículo se describe de forma breve algunas de las estrategias y resultados obtenidos como resultado de estas investigaciones.

Bioremediación de suelos

Para eliminar o reducir la contaminación de los suelos con PAHs u otros hidrocarburos existen varias tecnologías y estrategias, cuyas condiciones óptimas de operación están determinadas principalmente por las propiedades físico químicas del contaminante, su concentración y por las condiciones ambientales predominantes [3]. Existe un factor importante en la implementación de una tecnología de remediación: su costo. En este sentido la bioremediación, que se basa

en el uso de microorganismos para degradar los contaminantes, es una tecnología prometedora debido a su alta eficiencia y costo-efectividad. Desde hace más de tres décadas se ha demostrado que microorganismos tales como bacterias, hongos y algas poseen actividades catabólicas específicas que pueden ser aprovechadas para la remediación de aguas y suelos contaminados con PAHs [4]. La biorremediación hace uso de la versa-

tilidad metabólica de los microorganismos para degradar diferentes contaminantes peligrosos, entre ellos los PAHs.

El objetivo principal de la biorremediación es transformar los contaminantes orgánicos en compuestos no tóxicos o mineralizarlos a dióxido de carbono (CO_2) y agua [5]. Para esto, nuestra investigación se basa en el uso de dos estrategias generales: 1) la adición de microorganismos degradadores de contaminantes a los suelos o bioaumentación y 2) bioestimulación ambiental mediante la adición de fertilizantes y texturizantes, con el fin de mejorar las condiciones generales de crecimiento de los microorganismos degradadores en los suelos. Estas dos estrategias pueden aplicarse en el suelo mediante métodos como land farming, el composteo y las biopilas para la degradación de los PAHs en suelos [5].

Uso de hongos nativos

El papel de los hongos en el proceso de biodegradación de los PAHs y los mecanismos asociados al mismo se conocen ampliamente [6]. Dos grupos se encuentran directamente asociados con la degradación de PAHs: los hongos ligninolíticos (basidiomicetos), que aunque producen enzimas ligninolíticas que degradan PAHs no se adaptan bien al suelo y los hongos no ligninolíticos (principalmente ascomicetos), habitantes normales de los suelos pero que no producen la gama de enzimas producidas por los basidiomicetos.

Trichoderma asperellum H15 es un hongo filamentoso no ligninolítico aislado por nuestro grupo de un suelo contaminado con petróleo crudo pesado en el estado de Veracruz (figura 2). Este y otros hongos aislados del mismo suelo se caracterizaron por ser capaces de degradar hidrocarburos y presentar niveles de tolerancia elevados hacia diferentes tipos de PAHs [7]. El trabajo

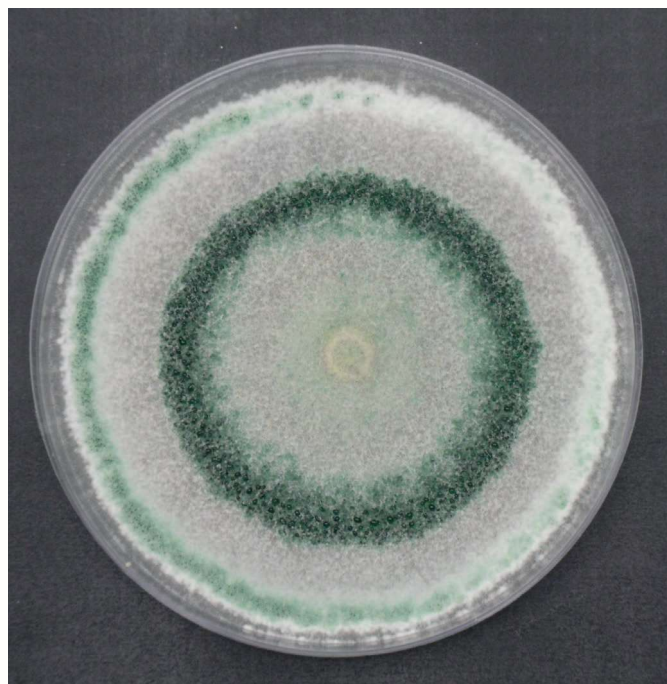


Figura 2. *Trichoderma asperellum* H15 en una placa de medio PDA después de 5 días de cultivo

posterior con *Trichoderma asperellum* H15 consistió en probar su capacidad para degradar PAHs de bajo (fenantreno) y alto peso molecular (pireno y benzo[a]pireno) en suelo a nivel laboratorio, mediante bioaumentación y bioestimulación con bagazo de caña. *Trichoderma asperellum* H15 se adaptó rápidamente al suelo contaminado, produciendo más CO_2 que cuando se cultivaba en suelos no contaminados, indicando una mayor actividad metabólica. Este hongo consiguió degradar entre 60 y 80% de los PAHs presentes en los suelos contaminados durante un periodo de dos semanas de tratamiento. También se observó que algunas enzimas, tales como lacasa, catecol dioxigenasa y diferentes peroxidasas no ligninolíticas estaban implicadas en diferentes momentos del proceso de degradación de los PAHs en sistemas de microcosmos. Los resultados mostraron el potencial de *T. asperellum* de ser usado en un proceso de biorremediación a mayor escala, gracias a su elevada

tolerancia, gran adaptación al suelo y a la producción de enzimas útiles para la degradación de hidrocarburos. Este es además el primer reporte de la utilización de esta especie de hongo en la biorremediación de hidrocarburos.

Uso de hongos modificados genéticamente

Como se mencionó anteriormente, los hongos no ligninolíticos no poseen la maquinaria enzimática capaz de degradar PAHs que poseen los hongos ligninolíticos, pero si pueden poseer otros tipos de enzimas útiles para hacerlo (como en el caso de *Trichoderma asperellum* H15). En consecuencia, otro de los trabajos llevados a cabo en el CIBA-IPN consiste en mejorar genéticamente hongos no ligninolíticos para que produzcan las enzimas de los hongos ligninolíticos [8]. De esta manera se busca mejorar la degradación de los PAHs en suelos combinando las características de ambos tipos de hongos que permitan acelerar el proceso.

Aspergillus niger SCB2 es un hongo aislado a partir de bagazo de caña, que inicialmente mostró niveles de tolerancia altos (800 ppm) y una capacidad moderada de degradar PAHs [9]. Este hongo fue modificado genéticamente para que produjera la enzima ligninolítica manganeso peroxidasa (MnP), producida originalmente por el hongo ligninolítico *Phanerochaete chrysosporium*, con el fin de aumentar su capacidad de degradación de PAHs. El hongo resultante fue denominado *Aspergillus niger* MnP+7 y se comprobó que después de la modificación era capaz

de producir la enzima MnP. En orden de probar la efectividad de la nueva cepa para degradar PAHs, se realizaron ensayos con suelos contaminados con 600 ppm de fenantreno, en donde se observó que la cepa podía degradar hasta 44% en un periodo de 14 días, en comparación con 7% que degradó la cepa sin modificar SCB2. Además la cepa transformante aumentó su capacidad de tolerar PAHs. Esto demuestra una vez más que algunos hongos no ligninolíticos son una buena alternativa para su aplicación en sistemas de biorremediación, ya que pueden ser degradadores eficientes de PAHs y a la vez adaptarse bien y no ser desplazados fácilmente en el suelo por otros microorganismos.

Uso de consorcios microbianos

Un consorcio microbiano es la combinación

CIENTIFICA SENNA

Científica Senna S.A. de C.V. ofrece soluciones para la investigación científica, nuestra compañía ofrece productos de marcas con renombre internacional, como son:

 NOVUS BIOLOGICALS Today's Research. Tomorrow's Discovery. Anticuerpos, Lisados, Peptidos, Proteínas y Kits	 ATCC Líneas celulares, bacterias, sueros y medios de cultivo	 MO BIO Laboratories, Inc. Extracción de ácidos nucleicos, enzimas, reactivos
 RayBiotech, Inc. the protein array pioneer company Microarreglos de Anticuerpos y Proteínas y Kits de Elisa	 CORNING Material de Plástico, cajas de cultivo celular, multiplacas	 cellgro Medios de Cultivo, suplementos, antibióticos
 Cytoskeleton, Inc. Anticuerpos para detectar actina y proteínas	 GOLDBIO.COM GOLD BIOTECHNOLOGY, USA Reactivos, antibióticos, enzimas, factores de crecimiento	 IBI SCIENTIFIC Reactivos para biología molecular, electroforesis

Para mayor información de productos o marcas que ofrecemos favor de comunicarse a:
 Tel: (55) 5740-2603 info@cientificasenna.com www.cientificasenna.com

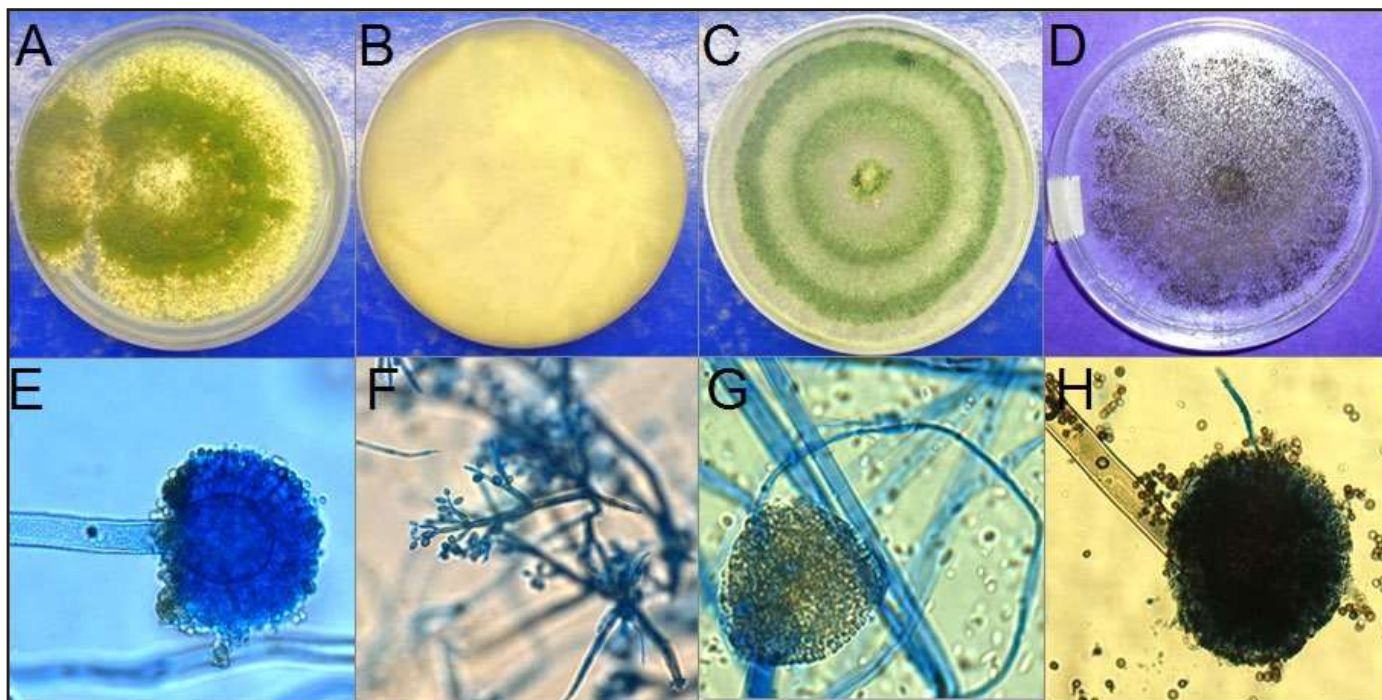


Figura 3. Características macroscópicas y microscópicas de hongos que conforman el consorcio microbiano degradador de PAHs. A, E) *Aspergillus nomius* H7. B, F) *Rhizomucor variabilis* H9. C, G) *Trichoderma asperellum* H15. D, H) *Aspergillus niger* LiP5.

de dos o más microorganismos diferentes conviviendo simbióticamente [10]. Para fines de biorremediación, la posibilidad de degradar y mineralizar un contaminante es mayor cuando las actividades enzimáticas de dos o más microorganismos se combinan [11]; por ello se han propuesto combinaciones definidas entre hongos y bacterias como una forma de mejorar la degradación de PAHs en los suelos, en especial de alto peso molecular [12].

Nuestro grupo de investigación está trabajando en la evaluación de las condiciones óptimas bajo las cuales sea posible implementar una tecnología de biorremediación de suelos contaminados mediante la bioaumentación con consorcios microbianos y la bioestimulación con residuos agroindustriales. Como parte de este trabajo se aislaron 21 cepas de hongos y 29 de bacterias a partir de suelos altamente contaminados con PAHs. Varios de estos hongos y bacterias

mostraron una resaltante tolerancia hacia concentraciones elevadas de PAHs [7, 13] y por consiguiente el potencial para degradar hidrocarburos en suelos. A partir de estos microorganismos se construyó un consorcio microbiano degradador conformado por 5 diferentes hongos (*Aspergillus flavus* H6, *Aspergillus nomius* H7, *Rhizomucor variabilis* H9, *Trichoderma asperellum* H15 y *Aspergillus fumigatus* H19) y 7 bacterias (*Klebsiella pneumoniae* B1, *Enterobacter* sp. B3, *Bacillus cereus* B4, *Pseudomonas aeruginosa* B6, *Streptomyces* sp. B8, *Klebsiella* sp. B10 y *Stenothrophomonas maltophilia* B14) (figura 3)[7].

El uso del consorcio en el tratamiento de un suelo contaminado con 1000 ppm de PAHs llevó a una degradación del 88% de fenantreno, 48% de pireno y 57% de benzo[α]pireno después de 14 días de tratamiento, utilizando como texturizantes y soporte de crecimiento tres residuos agroindustriales

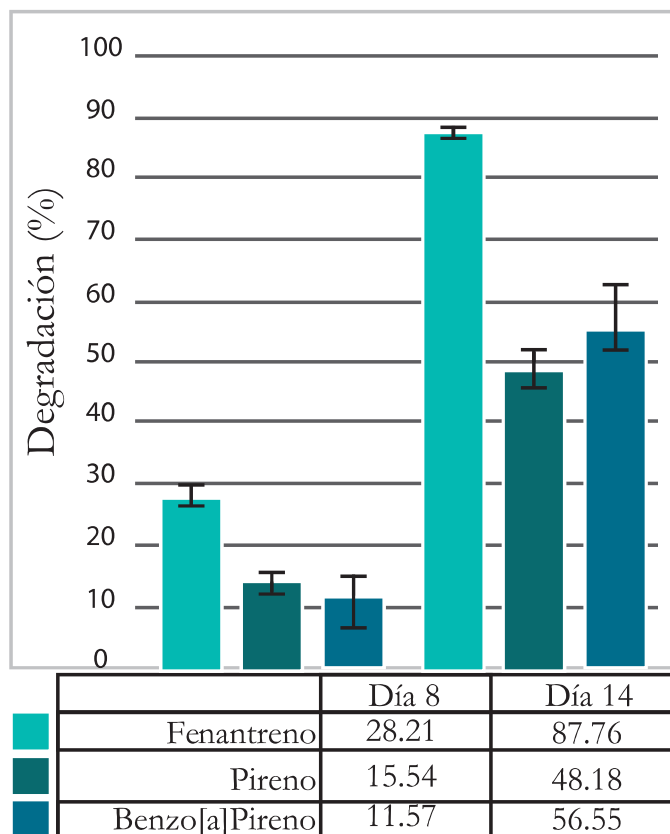


Figura 4. Degradación de PAHs a los 8 y 14 días por un consorcio microbiano en un suelo contaminado con PAHs

(bagazo de caña, paja de trigo y rastrojo de maíz) (figura 4). Este estudio, además de mostrar elevadas tasas de degradación de PAHs, representó el primer estudio en donde se evaluó la tolerancia de los microorganismos a concentraciones extremas de PAHs, llevando a la construcción de un consorcio microbiano altamente tolerante que se podría utilizar en sitios con niveles de contaminación muy elevados. Las principales ventajas del consorcio degradador son 1) el sitio del cual se aisló (altamente contaminado) y 2) su elevada tolerancia hacia PAHs de bajo y alto peso molecular, facilitando en general su adaptación y competición en sitios contaminados y asimismo aumentando la velocidad de degradación.

Conclusiones y perspectivas futuras

Los avances obtenidos y la investigación de los procesos y microorganismos asociados a la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados demuestran que la biorremediación es una tecnología viable, que puede utilizarse de forma barata y eficaz. En paralelo se están adelantando más investigaciones en cuanto al uso y optimización de las condiciones de degradación, tanto de microorganismos nativos como modificados genéticamente y a la supervivencia de los microorganismos degradadores en los suelos a través del tiempo. Son necesarios estudios adicionales para probar las tecnologías y microorganismos desarrollados por nuestro grupo a nivel de campo, así como para mejorar el entendimiento de los efectos e interacciones microbianas producidas en los suelos durante los procesos de biorremediación.

Agradecimientos

Los trabajos mencionados en esta nota fueron financiados por CONACYT proyecto CB2008-105643, IPN proyectos SIP20131157, SIP20144071 y CONACYT beca 269828.

REFERENCIAS

1. **PEMEX, Informe Anual 2013.** http://www.pemex.com/acerca/informes_publicaciones/Documents/informes_art70/2013/Informe_Anual_PEMEX_2013.pdf. Accessed 12 May 2014.
2. **US-EPA, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs).** (Office of Solid Waste, United States Environmental Protection Agency), <http://www.epa.gov/wastes/hazard/wastemin/minimize/factshts/pahs.pdf>. Accessed 12 May 2014.
3. **S. Gan, E.V. Lau, H.K. Ng, J. Hazard. Mater.** 172, 532-549, (2009).
4. **A.L. Juhasz, R. Naidu,** *Int. Biodegr. Biodegr.* 45, 57-88, (2000).
5. **M. Alexander,** *Biodegradation and bioremediation.* 2nd edn. (Academic Press, San Diego, 1999).
6. **C.E. Cerniglia, G.R. Sutherland. in K.N. Timmis** (ed). *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology.* Springer, Berlin ; London, 2010, pp. 2079-2110.
7. **G. Zafra, A.E. Absalón, M.C. Cuevas, D.V. Cortés-Espinosa,** *Water Air Soil. Poll.* 225, 1826, (2014).
8. **D.V. Cortés-Espinosa, Á.E. Absalón. in V. Kutcherov, and A. Kolesnikov** (eds). *Hydrocarbon,* 2013.
9. **B. Perez-Armendariz, O. Loera-Corral, L. Fernandez-Linares, F. Esparza-Garcia, R. Rodriguez-Vazquez,** *Lett. Appl. Microbiol.* 38, 373-377, (2004).
10. **M.T. Madigan, T.D. Brock,** *Brock biology of microorganisms.* 12th edn. (Pearson/Benjamin Cummings, San Francisco, CA, 2009).
11. **C.J. van der Gast, C.J. Knowles, M. Starkey, I.P. Thompson,** *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29, 20-27, (2002).
12. **S. Boonchan, M.L. Britz, G.A. Stanley,** *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1007-1019, (2000).
13. **G. Zafra, A.E. Absalón, D.V. Cortes-Espinosa,** *Second International Symposium on Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies, A-13,* (2013).