

Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y heterocíclicos por *Pseudomonas* spp.

Mariangela Bracho*, Laugeny Díaz y Luz Marina Soto

Laboratorio de Microbiología Acuática, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, La Universidad del Zulia, Apartado 526, Maracaibo, Venezuela.

Recibido: 29-07-04 Aceptado: 06-10-04

Resumen

Se evaluó la capacidad de 14 cepas de *Pseudomonas* de degradar hidrocarburos aromáticos dicíclicos, tricíclicos y heterocíclicos tales como: naftaleno, antraceno, fenantreno y dibenzotiofeno, constituyentes de la fracción aromática del petróleo. Con este fin, los hidrocarburos disueltos en solventes orgánicos fueron rociados en placas de agar, formando una capa opaca de sustrato, sobre la cual fueron inoculadas las colonias. Las bacterias capaces de degradar los hidrocarburos se detectaron al presentar crecimiento visible y expansión de los límites de las colonias o aparición de zonas claras en la capa de los hidrocarburos, fenómenos que evidencian la solubilización y utilización del sustrato. Como resultado se encontró que el 100% de las cepas estudiadas fueron capaces de degradar los hidrocarburos naftaleno y antraceno, el 78,57% degradó fenantreno, el 71,42% dibenzotiofeno y el 50% los cuatro hidrocarburos. Estos resultados demuestran que las cepas aisladas poseen capacidades enzimáticas diferentes para degradar estos compuestos. Asimismo permitieron seleccionar cepas capaces de degradar algunos de los constituyentes de la fracción aromática del petróleo, característica que las hace ideales para su utilización en ensayos de biorremediación de suelos impactados con petróleo.

Palabras clave: Biodegradación; hidrocarburos policíclicos; *Pseudomonas*.

Biodegradation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas* spp.

Abstract

The ability of 14 bacterial strains of *Pseudomonas* to degrade aromatic hydrocarbons such as: naphthalene, anthracene, phenanthrene and dibenzothiophene was evaluated. With this aim, hydrocarbons dissolved in organic solvents were sprinkled in plates of agar, forming an opaque layer of substrate, on which the colonies were inoculated. The bacteria able to degrade hydrocarbons, were detected when presenting visible growth and expansion of the limits of the colonies, or for the appearance of clear zones in the layer of hydrocarbons, phenomena that demonstrate the solubilization and use of the substrate. As result, the 100% of the isolated strains studied were able to degrade naphthalene and anthracene, 78.57% degraded phenanthrene, 71.42% dibenzothiophene and 50% the four hydrocarbons. These results demonstrate, that the isolated strains have different enzymatic capacities to degrade these compounds. Also, they allowed to select bacterias strains able to degrade the aromatic fraction of the petroleum that makes ideals for its use in tests of biorremediation of petroleum contaminated soil.

Key words: Biodegradation; hydrocarbons; *Pseudomonas*.

* Autor para la correspondencia. E-mail: mabracho@hotmail.com

Introducción

El petróleo contiene numerosos hidrocarburos aromáticos y heterocíclicos, los cuales varían en tamaño molecular y complejidad; desde compuestos monocíclicos hasta estructuras de cadenas largas y complejas constituidas por anillos aromáticos (1). De estos, los hidrocarburos aromáticos son más complejos, siendo los más estudiados el tolueno, naftaleno, antraceno, fenantreno y dibenzotiofeno, debido a que estos anillos aromáticos, forman parte de una amplia variedad de productos de importancia biológica, química e industrial.

Los hidrocarburos poliaromáticos son constantemente liberados al ambiente principalmente a partir de las actividades antropogénicas, siendo la mayor fuente de liberación, los procesos de quema de combustibles fósiles, la licuefacción del carbón, la gasificación del petróleo y los derrames accidentales de petróleo. Cuando ocurre un derrame de petróleo en el ambiente, los compuestos de bajo peso molecular generalmente se pierden por volatilización, mientras que los hidrocarburos poliaromáticos y heterocíclicos permanecen como remanente, haciéndose de esta manera persistentes en el ambiente. Los hidrocarburos poliaromáticos con dos o más anillos, heterocíclicos y sus homólogos alquil sustituidos, que son liberados en los ecosistemas, constituyen un grave problema porque contaminan fuentes de agua y suelos, ocasionando un gran impacto ecológico, en virtud de los efectos recalcitrantes y tóxicos que ejercen sobre los seres vivos (1). Es por ello que estos hidrocarburos deben ser removidos o su concentración debe ser sustancialmente reducida del ambiente. Con este propósito, frecuentemente son utilizados procesos de degradación industrial tanto químicos como físicos, que pese haber demostrado su potencial para la recuperación de cientos de lugares contaminados, resultan relativamente inadecuados para la remoción de hidrocarburos complejos y además el costo de su aplicación resulta elevado (2).

Durante los últimos años ha sido objeto de intensa investigación el desarrollo de biotecnologías que complementen los procesos fisicoquímicos ya existentes, basadas en la utilización de microorganismos para la recuperación de los ambientes contaminados con petróleo y otros combustibles, en virtud de la capacidad que poseen estos organismos de oxidar los compuestos hidrocarbonados del petróleo degradándolos hasta metabolitos que pueden ser fácilmente removidos o dispersados del ambiente (3).

En este sentido, la habilidad que poseen algunas bacterias de metabolizar hidrocarburos aromáticos sencillos tales como tolueno, xileno y naftaleno ha sido ampliamente estudiada (4, 5). Sin embargo, se han descrito pocos géneros bacterianos capaces de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos y heterocíclicos en particular el antraceno, fenantreno (6, 7) y dibenzotiofeno (DBT) (8, 9). Generalmente las especies señaladas por su capacidad de degradar monoaromáticos no son capaces de metabolizar aromáticos más complejos.

En este trabajo se determinó cualitativamente el potencial biodegradativo que presentan bacterias autóctonas aisladas de suelos contaminados con petróleo frente a hidrocarburos aromáticos dicíclicos, tricíclicos y heterocíclicos, para así confirmar su especificidad hacia el sustrato, a fin de seleccionar cepas bacterianas con una amplia capacidad degradadora, que garanticen de esta forma la remoción de los hidrocarburos complejos presentes en el suelo.

Materiales y Métodos

Microorganismos: Se trabajó con un total de 14 cepas de *Pseudomonas* sp., aisladas en trabajos previos a partir de muestras de suelo contaminado con petróleo procedentes de la localidad de "La Concepción" Municipio Jesús Enrique Lossada del Estado Zulia (10). Estas fueron cultivadas en un medio selectivo a fin de enriquecer las cepas con la capacidad de degradar los compues-

tos de interés. Las cepas se incubaron en fio- las de 125 mL conteniendo 50 mL de medio mínimo mineral (MMM) (11), con una com- posición por Litro de solución NH_4Cl 1,2 g; KNO_3 2,4 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,00067 g; Na_2SO_4 2,4 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,04 g; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,65 g; $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02 g. Como fuente de carbono se emplearon los hidrocarburos naftaleno, antraceno, fenan- treno y DBT al 0,05% p/v.

Determinación de la capacidad de degradación de hidrocarburos por bacte- rias:

Para determinar la capacidad de utili- zación de los hidrocarburos antraceno, naf- taleno, fenantreno y DBT, como única fuen- te de carbono por las bacterias aisladas se empleó la técnica de Kiyohara y Nagao (12) con algunas modificaciones. Para ello, se utilizaron placas de MMM y agar al 1,5%, ro- ciadas de manera homogénea con naftale- no, antraceno y fenantreno (cada uno por separado) disueltos en éter al 0,05% y el DBT disuelto en acetona a la misma concen- tración. Las placas fueron incubadas previa inoculación, durante toda la noche con el fin de eliminar el solvente por evaporación. Como inóculo se utilizó un cultivo de cada una de las cepas aisladas con una densidad óptica correspondiente a la del tubo N° 2 del nefelómetro, el cual fue sembrado con un hi- sopo estéril en placas de agar nutriente, las cuales se incubaron a 37°C durante 24 a 36 horas. Posteriormente, con la ayuda de un palillo de madera estéril se transfirieron las colonias correspondientes a cada una de las cepas, a las placas rociadas con hidrocarbu- ro. Posterior a la inoculación, las placas se incubaron a 37°C durante 15 días. Durante este lapso fueron observadas periódicamen- te a través de un transiluminador UVPRO CHROMATO-VUE modelo TM-36, para de- terminar la desaparición de la fluorescencia propia del hidrocarburo evidenciada como zonas claras alrededor de las colonias, o el crecimiento de los límites de las colonias in- dicadores de la capacidad de la bacteria de degradar los hidrocarburos. Esto es posible, ya que estos hidrocarburos aromáticos fluo-

rescen en presencia de la luz UV, cuando está íntegra su estructura y propiedades fi- sicoquímicas. Sin embargo, si sufre alguna alteración por acción bacteriana, causa la pérdida de la fluorescencia y desaparece de las zonas vecinas a las colonias que efectiva- mente lo degradan.

Resultados

Se observó, entre el quinto y séptimo día de incubación, en las placas rociadas con naftaleno y DBT, que las colonias de las cepas degradadoras aumentaron su exten- sión, produciendo zonas de crecimiento con un diámetro de 3 a 4 mm; mientras que en las cepas controles y en las no degradado- ras, el tamaño de la colonia permaneció constante sin mostrar variación durante 15 días de incubación. Por otro lado, en las pla- cas rociadas con antraceno y fenantreno, la degradación del hidrocarburo se evidenció al observar zonas claras (halo) alrededor de las colonias, fácilmente diferenciables en la capa opaca del hidrocarburo, que indican la solubilización y utilización del sustrato por parte de la bacteria.

El comportamiento de cada cepa sobre los hidrocarburos estudiados se incluye en la Tabla 1, en esta se observa que el 100% de las cepas estudiadas fueron capaces de de- gradar los hidrocarburos aromáticos policíc- licos naftaleno y antraceno, mientras que el 78,57% degradó el fenantreno. En rela- ción a la fracción de heterocíclicos azufrados estudiada representada por el DBT, este fue degradado sólo por el 71,42% de las cepas aisladas.

Es importante destacar que el 50%, las cepas de *Pseudomonas* estudiadas fueron capaces de degradar naftaleno, antraceno, fenantreno y DBT. Tres de estas, el equiva- lente al 42,85%, designadas como PLC 2, PLC16, PLC42 degradaron los hidrocarbu- ros en la mitad del tiempo (3 días) requerido por las restantes, condición que las convier- te en cepas ideales para la realización de en- sayos de biorremediación de suelos impac-

Tabla 1
Crecimiento de cepas de *Pseudomonas* en hidrocarburos aromáticos policíclicos y heterocíclicos como única fuente de carbono

<i>Pseudomonas</i>	Naftaleno	Antraceno	Fenantreno	DBT
PLC 20-1	+	+	+	+
PLC 31	+	+	+	-
PLC 36	+	+	+	+
PLC 24-1	+	+	+	-
PLC 16	+	+	+	+
PLC 42	+	+	+	+
PLC 33	+	+	+	-
PLC 15	+	+	+	-
PLC 20	+	+	+	+
PLC17-1	+	+	-	+
PLC 18	+	+	-	+
PLC 22	+	+	-	+
PLC 19	+	+	+	+
PLC 2	+	+	+	+

+ = crecimiento en placas de MMM más hidrocarburo al 0,05% p/v. - = ausencia de crecimiento.

tados, en virtud de su capacidad de degradar un amplio rango de sustratos en menor tiempo. Por ello, estas fueron seleccionadas para realizar futuras investigaciones relacionadas con sus condiciones óptimas de degradación.

Discusión

El orden de la degradación de los hidrocarburos aromáticos por las bacterias estudiadas fue: naftaleno = antraceno > fenantreno > dibenzotiofeno, siendo todas las cepas capaces de crecer en presencia de naftaleno y antraceno como única fuente de carbono. Esto indica que todas las bacterias estudiadas cuentan con el sistema enzimático requerido para la degradación de estos hidrocarburos aromáticos policíclicos y su utilización como fuente de carbono y energía.

El hecho de que el DBT haya sido el hidrocarburo para el cual las cepas presenta-

ron la menor capacidad de crecimiento, indica que de los hidrocarburos aromáticos estudiados este es el más resistente al ataque microbiológico. La recalcitrancia de este compuesto puede deberse tanto a factores físicos, relacionados con su estructura, como a restricciones biológicas debidas a la incapacidad de los organismos estudiados para sintetizar las enzimas requeridas para su degradación (13).

Trabajos realizados por Gundlanch y col., (14) y Fedorack y Westlake (15) demostraron que los hidrocarburos aromáticos alquilsustituidos y heterocíclicos azufrados son más recalcitrantes que sus contrapartes no sustituidos. En este sentido, desde el punto de vista estructural el DBT es mucho más complejo que el antraceno y el fenantreno (Figura 1), a pesar de poseer sólo dos anillos aromáticos, ya que está sustituido por un grupo azo, el cual actúa como aceptor de electrones (altamente electrofílico) y crea

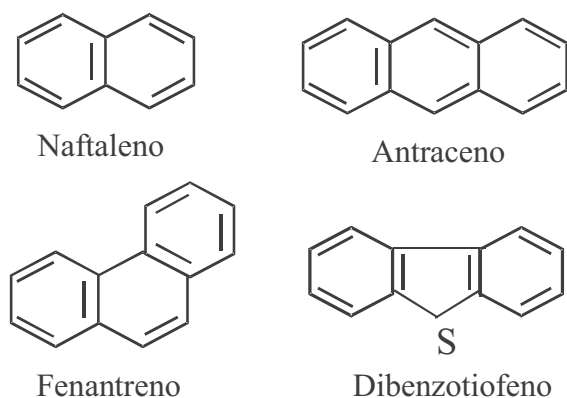


Figura 1. Estructura de los hidrocarburos usados en este estudio.

impedimentos estéricos, afectando de esta manera la acción de las enzimas dioxigenasas que inician el ataque electrofílico de la molécula al oxidar los enlaces carbono-carbono de los compuestos aromáticos (13).

Los resultados obtenidos indican la presencia en la población microbiana estudiada de tres fenotipos degradadores $N^+A^+F^+D^+$ (7 cepas), $N^+A^+F^+D^-$ (4 cepas), y $N^+A^+F^-D^+$ (3 cepas). Si se toma en cuenta que las bacterias son capaces de degradar los hidrocarburos debido a que contienen las enzimas involucradas en las rutas metabólicas degradativas, se puede concluir que las cepas estudiadas poseen capacidades enzimáticas diferentes para degradar los hidrocarburos aromáticos analizados, a pesar de que las rutas metabólicas implicadas en la oxidación de estos compuestos sean similares. Estos resultados concuerdan con los reportados en numerosos estudios fisiológicos, bioquímicos y genéticos, en los cuales se ha demostrado que existen diversas rutas para la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en especies bacterianas diferentes (2, 4, 8, 16, 18).

Las cepas que presentan el fenotipo $N^+A^+F^+D^+$ tienen la capacidad de oxidar o degradar hidrocarburos aromáticos tricíclicos

(antraceno y fenantreno) dicíclicos (naftaleno) y heterocíclicos azufrados (DBT) en condiciones aeróbicas, lo que indica que poseen enzimas del tipo oxigenasas con un amplio rango de sustratos, que son responsables de la oxidación de diversos compuestos aromáticos.

Estos resultados concuerdan con los encontrados por Sanseverino y col., (17) quienes utilizaron cepas de *Pseudomonas* para investigar el papel de la ruta codificada en plásmidos *NAH* en la mineralización de otros hidrocarburos tales como el fenantreno y antraceno. Los resultados obtenidos indicaron que estos genes catabólicos están involucrados en la degradación de otros hidrocarburos poliaromáticos además del naftaleno, tales como el antraceno y fenantreno. Asimismo, Gibson y Subramanian, (18), establecieron que el antraceno y el fenantreno son metabolizados por las mismas enzimas que catalizan los pasos iniciales del metabolismo del naftaleno.

Por otro lado, trabajos realizados con cepas de *Pseudomonas* demostraron que los genes que codifican las enzimas involucradas en la degradación del naftaleno, son los mismos que codifican las enzimas involucradas en la oxidación del DBT (8). Por su parte, Denome y col., (19), reportaron cepas de *Pseudomonas* capaces de metabolizar, naftaleno, fenantreno y DBT, por acción de un mismo sistema enzimático. Todos estos resultados reportados en trabajos previos pueden explicar la actividad degradativa hacia el naftaleno, antraceno y DBT encontrada en los fenotipos $N^+A^+F^+D^-$ y $N^+A^+F^-D^+$.

El grupo de cepas que portan el fenotipo $N^+A^+F^+D^+$, utilizan el naftaleno pero no son capaces de degradar el fenantreno, indicando que en estas cepas las rutas para la degradación de estos hidrocarburos poliaromáticos son independientes la una de la otra. En este sentido, en algunos trabajos se ha sugerido la existencia de un segundo tipo de complejo enzimático involucrado en una ruta alternativa para la degradación del naf-

taleno la cual no estaría en capacidad de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos más complejos como el fenantreno y el antraceno (20). Al respecto, Kiyohara y Nagao (12) en un trabajo realizado con 13 cepas degradadoras de fenantreno diferentes (*Pseudomonas*, *Vibrio* y cepas no identificadas) encontraron que la ruta de degradación del fenantreno en estos casos era independiente a la del naftaleno. Por su parte, Bransley (21) reporta que la oxidación inicial del naftaleno y el fenantreno es llevada a cabo por dos enzimas diferentes.

En relación al fenotipo N⁺A⁺F⁺D⁻, presentado por un 28,57% de las cepas, la incapacidad para degradar el DBT puede deberse a la necesidad de estas cepas de contar con una fuente adicional de carbono como cosustrato. Al respecto, varios trabajos han demostrado la necesidad de la presencia de hidrocarburos más sencillos como el benceno, naftaleno o antraceno como fuente de carbono y energía para que pueda darse la activación de las enzimas involucradas en la ruta de oxidación del DBT, confirmando de esta forma que este hidrocarburo es oxidado en la mayoría de los casos por cometabolismo (8, 16, 22)

Conclusiones

Las cepas estudiadas presentaron diferencias en cuanto a sus capacidades para degradar los hidrocarburos fenantreno y dibenzotiofeno; sin embargo, todas fueron capaces de crecer en presencia de naftaleno y antraceno. En este sentido, se observaron tres fenotipos degradadores diferentes N⁺A⁺F⁺D⁻, N⁺A⁺F⁺D⁺ y N⁺A⁺F⁺D⁻.

El dibenzotiofeno fue el hidrocarburo para el que se obtuvo el menor porcentaje de cepas degradadoras, condición que lo señala como el hidrocarburo más difícil de degradar por las bacterias, en virtud de su complejidad estructural, impedimento estérico y su naturaleza altamente electrofílica.

En este trabajo se demuestra el potencial natural que poseen las bacterias autócto-

nas aisladas de suelos contaminados con petróleo, para la degradación de diferentes hidrocarburos aromáticos, las cuales podrían utilizarse en procesos de bioestimulación para el tratamiento de derrames de petróleo, procesos éstos tan urgidos en nuestro país.

Referencias Bibliográficas

1. TISSOT B., WELTE D.H. **Petroleum formation and occurrence**, Springer-Verlang, New York (USA), pp. 699, 1984.
2. PARALES R., YU C., PARALES J., GIBSON D.T. Expanding the limits of naphthalene Dioxigenase as a biocatalyst. **ASM Conference of Biodegradation, Biotransformation, and Biocatalysis (B3)**. Puerto Rico, pp. 6, 2001.
3. MONTICELLO D.J. The molecular biology of dibenzothiophene desulfurization. **The Seven International IGT Symposium of Gas, Oil and Environmental Microbiology**. pp.1-15, 1994.
4. KANALY R.S., HARAYAMA. **Journal of Bacteriol** 182:2059-2067, 2000.
5. VAN HAMM J., SING A., WARD O. **Appl Environ Microbiol** 67:503-549, 2003.
6. JOHSEN A., WINDING A., KARLSON U., ROSLEV P. **Appl Environ Microbiol** 68: 6106-6113, 2002.
7. WICK L., PASCHE N., BERNASCONI S., PELZ O., HARMS, H. **Appl Environ Microbiol** 69: 6133-6142, 2003.
8. BALDI F., PEPI M., FAVA F. **Appl Env Microbiol** 69: 4689-4696, 2003.
9. WIDADA J., NOJIRI H., KASUGA K., YOSHIDA T., HABE H., OMORI T. **Appl Microbiol Biotechnol** 58: 202-209, 2002.
10. BRACHO M., DUPONT L., DIAZ L., SOTO L.M. Degradative potential over polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from crude oil contaminated soils. **ASM Conference of Biodegradation, Biotransformation, and Biocatalysis (B3)**. Puerto Rico, pp. 55, 2001.

11. JOBSON A., COOK F.D., WESTLAKE D.W.S. *Applied Microbiol* 23(6): 1082-1089, 1972.
12. KIYOHARA H., NAGAO K., YANA K. *Appl Environ Microbiol* 43: 454-457, 1982.
13. FIELD A., STARMS A., KATO M., SCHRAA G. *Antonie Van Leeuwenhoek* 67:47-77, 1995.
14. GUNDLANCH E.R., BOEHM P.D, MARCHAND M., ATLAS R.M., WARD D.M., WOLFW D.A. *Science* 22:122-129, 1983.
15. FEDORACK P.M., WESTLAKE D.W. *Can J Microbiol* 29: 291-296, 1983.
16. FOGHT J.M., FEDORACK P.M., WESTLAKE W.S. *Appl Env Microbiol* 64: 365-373, 1990.
17. SANSEVERINO J., APLEGATE B.M., KING J.M., SAYLER G.S. *Appl Env Microbiol* 59: 1931-1937, 1993.
18. GIBSON D.T., SUBRAMANIAN V. *Microbial degradation of aromatic hydrocarbons*. Edited by Gibson, D.T. Marcel Dekker, Inc. New York (USA), pp. 535, 1994.
19. DENOME S.A., OLDFIELD C., NASH L.J. YOUNG K.D. *Journal of Bacteriology* 176: 6707-6716, 1994.
20. YEN K., SERDAR C. *Crit Rev Microbiol* 15: 247-268, 1988.
21. BARNSLEY E.A. *J Gen Microbiol* 88:193-196, 1983.
22. KODAMA K. *Agric Biol Chem* 41(7): 1193-1196, 1977.