

Biomarcadores y su utilidad en la evaluación de la biodegradación del petróleo

El empleo de biomarcadores es útil en el estudio de la evolución de la degradación del petróleo cuando se emplean microorganismos. En función de la resistencia a la degradación, existen biomarcadores que sirven para evaluar mejor la eficacia de la biorremediación en las primeras etapas, como es el caso de los hidrocarburos alifáticos, mientras que otros, como los hidrocarburos aromáticos o los hopanos, permiten determinar la degradación a más largo plazo.

Biomarkers are useful compounds for the determination of the oil degradation when microorganisms are used. There are some biomarkers such as the aliphatic hydrocarbons which are used to evaluate the bioremediation in the first stages after an oil spill, while others, aromatic hydrocarbons or hopanes, are used to determine the contamination at longer stages.

J.E. Ortiz
Dr. Ingeniero de Minas
M.J. García
Ingeniero de Minas
Laboratorio de Estratigrafía
Biomolecular
E.T.S.I. de Minas de Madrid

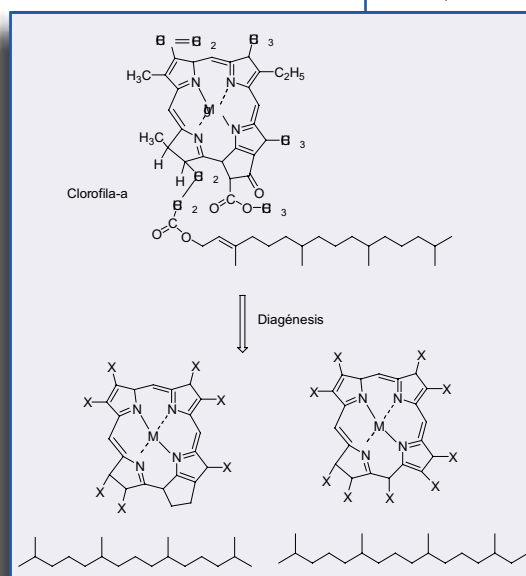
J.L. Rodríguez Gallego
Ingeniero de Minas
Dpto. Explotación de
Minas-Metalogenia
E.T.S.I. de Minas de Oviedo

Introducción

Los biomarcadores presentan una gran utilidad en el estudio de la eficiencia de la biorremediación. Se conoce como biomarcadores a aquellos compuestos que pueden ligarse de forma inequívoca con sus precursores biológicos y cuyo esqueleto de carbonos base se preserva de tal forma que es reconocible a pesar de la diagénesis y de gran parte de la catagénesis. Muchos biomarcadores tienen inicialmente grupos funcionales que contienen oxígeno (dado que muchos de ellos derivan de los lípidos de los organismos) y se ven sometidos al mismo proceso de pérdida de grupos funcionales que el resto de la materia orgánica. Por lo tanto, los productos diagenéticos son generalmente hidrocarburos, aunque pueden sobrevi-

vir a la diagénesis pequeñas cantidades de compuestos con grupos funcionales, como los ácidos grasos. Al mismo tiempo, los compuestos no saturados (aquellos que contienen doble enlace C=C) tienden a re-

Figura 1. Esquema de la degradación de la clorofila-a, que puede derivar mediante procesos diagenéticos a pristano (vía de la izquierda) o fitano (vía de la derecha).



ducirse (mediante hidrogenación), lo que resulta en la formación de hidrocarburos alifáticos (esteranos, hopanos...), o a aromatizarse.

Los biomarcadores son muy importantes dado que, en general, pueden proporcionar información acerca de: fuentes biológicas de materia orgánica sedimentaria, medios deposicionales, madurez de la materia orgánica, edad geológica... Estos compuestos son tan sólo constituyentes traza, pero pueden ser muy útiles, especialmente en el caso de los petróleos: se emplean una gran cantidad de tipos estructurales en la geoquímica del petróleo y, lo que es más importante en el tema que nos ocupa, también se ha demostrado su gran utilidad en la evaluación de la efectividad

de la biorremediación de vertidos de petróleo como se expandirá a continuación.

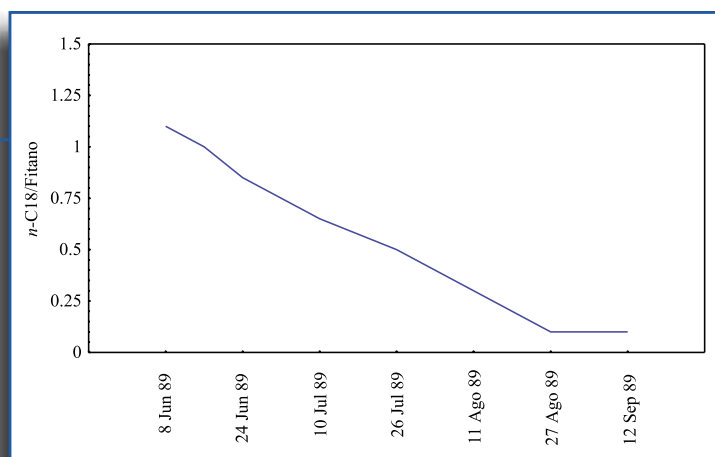
Aplicación de los biomarcadores a la biorremediación

El estudio de biomarcadores permite obtener información sobre el rendimiento de los distintos métodos de degradación de los residuos del petróleo, principalmente los que se refieren al empleo de microorganismos. Asimismo se puede evaluar la eficacia del uso de diferentes fertilizantes o catalizadores que intervienen en la proliferación de las bacterias y, en consecuencia, en la degradación de los productos del petróleo.

Los biomarcadores son moléculas que retienen el esqueleto básico hidrocarbonado de los compuestos biológicos a través de los procesos de maduración. La mejor opción para el control van a ser algunos tipos de biomarcadores, en especial aquellos cuya degradación biológica es muy lenta o directamente no va a tener lugar. En concreto, los compuestos que se utilicen deberían ser referencias que no se originen en el crudo ni en ningún derivado en procesos de envejecimiento o biodegradación. Además, sea cual fuere el tipo de analítica utilizada se debe demostrar que la eficiencia en la extracción del biomarcador es la misma que para el resto de los compuestos (**Riser-Roberts**, 1998).

Además, en la aplicación de las técnicas de biorremediación es de vital importancia la selección de compuestos que dentro de la mezcla compleja del petróleo no sean biodegradables. Este hecho será aprovechado para conseguir referencias que permitan medir si la degradación que tiene lugar es biológica o no y, si es así, qué microorganismos

Figura 2. Cambios en las relaciones $n\text{-C18}/\text{fitano}$ en playas de guijarros de Alaska. Modificado de Pritchard (1997).



y de qué manera están degradando los contaminantes y cuáles no. Como criterio general, partiremos de que la proporción entre compuestos biodegradables y no biodegradables en una mezcla de contaminantes disminuye si hay biodegradación.

Entre los hidrocarburos del petróleo es fácil encontrar cantidades relativamente pequeñas de biomarcadores (usualmente por debajo del 1% en peso) de origen lipídico. Al final de la diagénesis sus precursores son transformados en hidrocarburos que, después de la catagénesis, todavía permiten fijar los precursores específicos.

Cualquier programa de ensayo sobre biorrecuperación que implique la desaparición de residuos de petróleo o de hidrocarburos, presentará dificultades analíticas. Ello es debido a que existen otros procesos que implican la desaparición de residuos de petróleo o de hidrocarburos medidos mediante cromatografía de gases, que pueden afectar o contribuir a la desaparición de los residuos. Para hacer frente a estos problemas, se supone que la desaparición de algunos grupos de hidrocarburos se puede utilizar como indicador definitivo de la biodegradación. Los indicadores de la biodegradación estarían asociados a cambios sustanciales en la composición de varias fracciones del petróleo,

especialmente los hidrocarburos aromáticos. También se supone una correlación entre los cambios en la composición de los hidrocarburos y los cambios de peso residual del petróleo, para poder calcular tasas de desaparición de los pesos residuales como primer indicativo cuantitativo del efecto del fertilizante y, en consecuencia, de la eficacia de la limpieza durante períodos de tiempo más largos.

Existen varios parámetros que se pueden emplear para determinar el grado de biodegradación. En primer lugar, se puede usar la concentración de hidrocarburos alifáticos, aunque presenta algunas desventajas, ya que constituyen la fracción más fácil de degradar, son los menos tóxicos y suponen solamente un pequeño porcentaje en peso del petróleo. También se pueden determinar los cambios producidos por los organismos y fertilizantes en la fracción aromática, que es más resistente a la degradación y más tóxica. Por último, otro método eficaz para estimar la eficacia de la biorremediación se basa en la separación de las distintas fracciones del petróleo: alifática, aromática, heterocíclica, polar y asfáltica, y determinar la disminución del peso de cada una (**Jobson et al.**, 1972).

No obstante, todos estos índices se verán afectados en mayor o menor medida por los

otros procesos, ya citados que puedan contribuir a la desaparición de los hidrocarburos. Es aquí cuando entra el uso de los biomarcadores, en concreto de aquellos que no son biodegradables, como forma de evaluar qué parte desaparece por biodegradación y cuál por otros procesos diferentes. A continuación se expondrán los diversos biomarcadores que se emplean en los estudios de degradación del petróleo.

Ratio de *n*-alcanos normales respecto a *n*-alcanos ramificados

Este ratio se determina calculando la relación del peso entre un hidrocarburo de biodegradación fácil, principalmente los *n*-alcanos de 17 y 18 átomos de carbono (*n*-C17 y *n*-C18), y un hidrocarburo que se biodegrada más lentamente, generalmente hidrocarburos ramificados como el pristano (Pr) y fitano (Ph). Estos dos últimos compuestos son isoprenoides que derivan de la degradación de la clorofila-*a* (Figura 1), generalmente mediante oxidación y reducción, respectivamente.

Se seleccionan el pristano y el fitano para realizar las comparaciones debido a que son los isoprenoides más abundantes en el petróleo. Se emplean, por tanto, las relaciones *n*-C17/pristano o *n*-C18/fitano, aunque es preferible emplear la última, ya que, en ocasiones, el agua del mar presenta pristano de forma natural. La base del estudio se basa en que, por un lado, la mayor parte de los procesos (meteorización física, lixiviación, etc) no producen pérdidas acusadas de hidrocarburos ramificados y alifáticos y, por otro, los alcanos ramificados se biodegradan a distinta velocidad que los alcanos lineales, que en general es más rápida en los primeros

et al., 1992). Por lo tanto, estudiando la evolución en el tiempo del ratio *n*-C18/fitano, se puede estimar el grado de biorrecuperación de una zona afectada por un vertido de petróleo (figura 2).

Su utilización solamente es válida al comienzo del tratamiento; si se analizan cuando el proceso ha avanzado mucho, pueden subestimar la biodegradación. Concretamente, durante la remediación del vertido del **Exxon Valdez**, el pristano y el fitano se degradaron rápidamente y sólo pudieron utilizarse como biomarcadores adecuados en las primeras semanas (Bragg *et al.*, 1994).

Biodegradación del Fitano

En la utilización de los biomarcadores influyen también las condiciones locales de cada zona. De hecho, en ciertas costas, como en la de Prince William Sound de Alaska, se desarrollan bacterias con gran capacidad de degradar alcanos ramificados como el fitano, por lo que el estudio de la evolución del ratio *n*-C18/fitano no es útil como indicador de biorremediación. Es más, en el vertido del Exxon Valdez se observó en algunas zonas de Alaska una degradación similar de fitano y de *n*-C18 (Pritchard, 1997). En estos casos, el contenido total de fitano por sí solo se puede emplear como marcador biológico

interno al igual que el del *n*-C18 (figura 3).

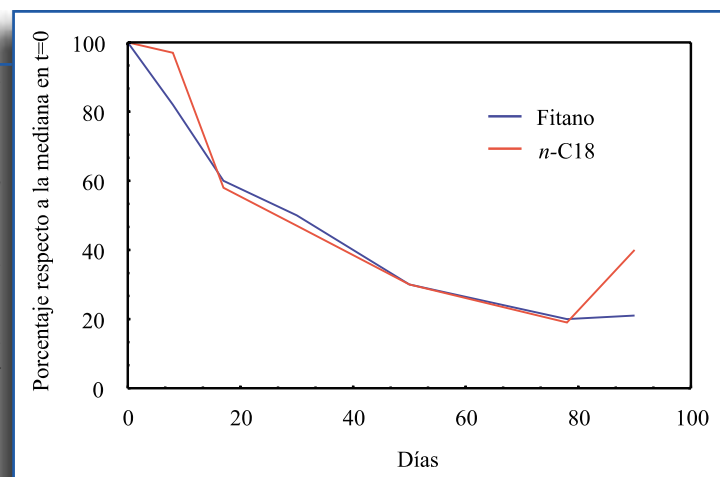
Cambios en la composición de hidrocarburos aromáticos

Para poder determinar de forma absoluta la efectividad de la biorrecuperación, no es suficiente únicamente con el estudio de la biodegradación de la fracción alifática. Se debe también estudiar el comportamiento y evolución de la fracción aromática, ya que es la más complicada de degradar (Kennicutt, 1988; Rowland *et al.*, 1986) debido a que presenta una baja solubilidad. Esto es importante no sólo porque permite evaluar la capacidad de recuperación de una zona, sino porque algunos hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) son altamente tóxicos y potencialmente cancerígenos bajo ciertas condiciones.

Para evaluar la capacidad de degradación, se suelen emplear compuestos de forma individual y familias de PAHs (naftalenos, fenantrenos, crisenos, etc). Asimismo, se puede determinar la eficiencia de los microorganismos en una zona sometida a biodegradación del petróleo, mediante el estudio de la evolución de la abundancia de la suma total de PAHs con el tiempo (Figura 4).

Generalmente, el estudio se realiza comparando la proporción de los diferentes hidrocar-

Figura 3. Cambios en la concentración de fitano y *n*-C18 (expresado como cambio porcentual en relación a la concentración media a $t=0$) en las muestras de petróleo en arena y grava de las playas tratadas en Sung Harbour (Alaska). Modificado de Pritchard (1997).



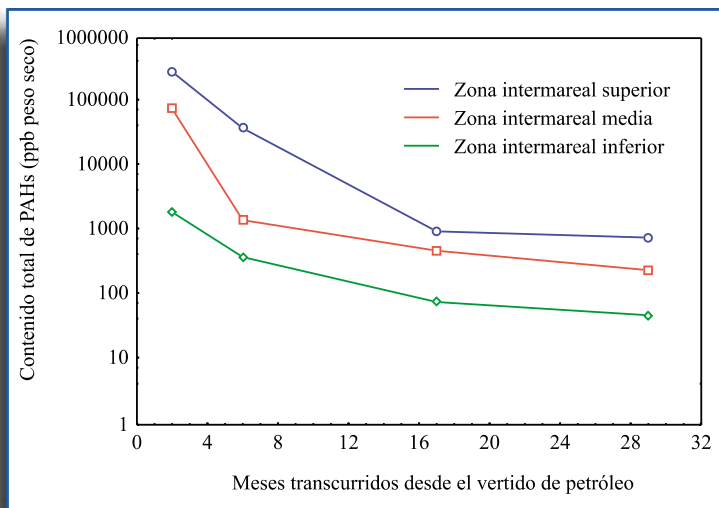


Figura 4. Contenido total de PAHs en distintas áreas sometidas a la acción de las mareas en Prince William Sound (Alaska) después de haber sido sometidas a degradación biológica. Modificado de Boehm et al. (1995).

buros aromáticos con el contenido del hopano C₃₀-17a(H), 21b(H), ya que es sumamente resistente al ataque biológico y, por consiguiente, proporciona un estándar constante para normalizar el contenido en hidrocarburos aromáticos. Más adelante se realiza una descripción más detallada de los hopanos y de su empleo en la biorremediación.

Cambio de composición y cambio en el peso residual

En principio se podría pensar que la rápida reducción en la relación n-C18/fitano no va acompañada de un cambio importante en el peso residual del petróleo. Sin embargo, diversos estudios han confirmado que cuando comienza la degradación de la fracción alifática, se inicia también la descomposición de otras fracciones del petróleo, aunque a velocidades diferentes. Existe, por lo general, una correlación entre las variaciones del ratio n-C18/fitano y del peso residual, con el tiempo de actuación de los organismos.

Con este estudio comparativo y a partir de la ecuación de la recta resultante, se puede determinar la vida media de permanencia del petróleo en la costa, es decir, la tasa de descomposición del mismo y los días que tardará en desaparecer.

En el caso del vertido del Exxon Valdez, se observó un aumento de más del doble en la velocidad de desaparición del petróleo residual sobre los cantos al añadir un fertilizante (tabla I).

Hopanos

Derivan del acoplamiento de seis unidades de isopreno. Son abundantes en sedimentos y en el petróleo, si los comparamos con otros biomarcadores. Proceden de precursores con grupos funcionales (biohopanoides) presentes en las bacterias. Los hopanoides (bacteriohopanotetroles) están presentes en las membranas de numerosos organismos procariontas, tanto aerobios como anaerobios, y su función parece ser la de mejorar la estabilidad de las paredes celulares. En este sentido, no sólo su función, sino su estructura está muy relacionada con la de los esteroides (el más conocido de estos es el colesterol) en organismos eucariotas (Madigan et al., 2000). Los grupos funcionales se pierden durante la diagénesis aunque, en general son resistentes a la degradación. Además de a los ho-

Tabla I. Análisis de las tasas de descomposición en playas de Snug Harbor (Alaska). Modificado de Pritchard (1997).

Playa	Pendiente	Vida media del residuo	Tiempo para eliminar el 90% T (días)
Tratada	-0.016	44	146
No tratada	-0.006	124	411

panos, los productos diagenéticos de los biohopanoides incluyen a los hopanoles, ácidos hopanoicos y hopenos.

Entre todos los hopanos, el C₃₀-17α(H), 21β(H)-hopano es un buen biomarcador, porque tiene baja solubilidad y muy baja volatilidad, con lo que no sólo la biodegradación, sino también la disolución o la evaporación son prácticamente descartables.

Para calcular la eficiencia de la biodegradación del petróleo a partir de los hopanos se puede utilizar la siguiente ecuación (Douglas et al., 1994):

$$\% \text{ petróleo degradado} = (1 - H_o/H_s) \times 100$$

Donde H_o es la concentración del hopano C₃₀-17α(H), 21β(H) en el petróleo originalmente y H_s es la concentración del hopano C₃₀-17α(H), 21β(H) en la muestra después de haber sido sometida a biodegradación.

Pese a todo, algunos autores (Sasaki et al., 1998; Pollard et al., 1999) ponen en duda su utilización por varios motivos:

- En algunos crudos pesados su presencia es muy limitada, con lo que el error analítico podría ser muy grande.
- Parece que existe alguna evidencia de su degradación en arenas asfálticas.

Las alternativas existentes no son muchas, ya que los mismos problemas se pueden aducir si se usa algún otro compuesto del petróleo, o bien metales pesados seleccionados de entre los más abundantes (vanadio o níquel).

Otros biomarcadores

Como alternativa a los compuestos ya señalados, se podría elaborar una lista de otros posibles biomarcadores que se podrían utilizar para cuantificar la biodegradación del petróleo:

- Esteranos: Son compuestos con una estructura similar a la de los hopanos (cuatro anillos frente a cinco). El más conocido entre ellos es el colestano cuyo precursor es el colesterol de los organismos eucariotas.
- Esteroides: También con estructura similar a los hopanos, pero con anillos bencénicos en ella. Son, por tanto, hidrocarburos aromáticos.
- Porphirinas: Son un grupo extremadamente complejo de compuestos tetrapirrólicos. Se originan en el mismo proceso diagenético (precursor: clorofila) en el que se formaban pristano y fitano.
- Metales: Por diversos motivos (Sasaki et al., 1998) se ha propuesto el vanadio como marcador interno de la biodegradación.

Existen otros biomarcadores, entre los cuales se encuentran: compuestos con NSO, tales como porfirinas, carbazoles, fenoles, ácidos carboxílicos y compuestos del azufre.

Conclusiones

En este artículo se pone de manifiesto la utilidad de los biomarcadores en el estudio de la evolución de la degradación del petróleo cuando se emplean microorganismos. Generalmente, en función de la resistencia a la degrada-

ción, existen biomarcadores que sirven para evaluar mejor la eficacia de la biorremediación en las primeras etapas, como es el caso de los hidrocarburos alifáticos, mientras que hay otros, como los hidrocarburos aromáticos o los hopanos, que permiten determinar la degradación a más largo plazo y la recuperación de las zonas contaminadas.

Referencias

- Boehm, P.D.; Page, D.S.; Gilfillan, E.S.; Stubblefield, W.A. y Harner, E.J.** (1995). Shoreline ecology program for Prince William sound, Alaska, following the Exxon Valdez oil spill: Parts 2-Chemistry and toxicology. En: Exxon Valdez Oil Spill; Fate and Effects in Alaskan Waters (Wells, P.G., Butler, J.N., Hughes, J.S., Eds.). American Society of Testing and Materials Special publication, pp 347-397.
- Bragg, J.R.; Prince, R.C.; Harner, E.J. y Atlas, R.M.** (1994). Effectiveness of bioremediation from the Exxon Valdez oil spill. *Nature* 368: 413-418.
- Douglas, G.S.; Prince, R.C.; Butler, E.L. y Steinhauer, W.G.** (1994). The use of internal chemical indicators in petroleum and refined products to evaluate the extent of biodegradation. In: Hydrocarbon Bioremediation (Hinchee, R.E., Alleman, B.C., Hoepfel, R.E., Miller, R.N.). Lewis Publishers, Boca Raton, pp: 219-236.
- Jobson, A.M.; Cook, F.D. y Westlake, D.W.S.** (1972). Microbial utilization of crude oil. *Applied Microbiology* 23: 1082-1089.
- Kennicutt, M.V.** (1988). The effect of biodegradation on crude oil bulk and molecular composition. *Chemical Pollutans* 4: 89-112.
- Madigan, M.T.; Martinko J.M. y Parker, J.** (2000). Brock, *Biología de los Microorganismos*. Prentice Hall, Madrid.
- Mueller, J.G.; Resnick, S.M.; Shelton, M.E. y Pritchard, P.H.** (1992). Effect of inoculation on the biodegradation of weathered Prudhoe Bay crude oil. *Journal of Industrial Microbiology*.
- Pollard, S.J.T.; Whittaker, M. y Ridsen, G.C.** (1999). The fate of heavy oil wastes in soil microcosms I: a performance assessment of biotransformation indices. *The Science of the Total Environment* 226: 1-22.
- Prinik, M.P.; Atlas, R.M. y Bartha, R.** (1977). Hydrocarbon metabolism by *Brevibacterium erythrogenes*: normal and branched alkanes. *Journal of Bacteriology* 119: 868-878.
- Pritchard, P.H.** (1997). Cuestiones reglamentarias y de eficacia en la biorrecuperación de los derrames de petróleo: experiencias con el derrame del Exxon Valdez en Alaska. En: Biotratamiento de residuos sólidos y peligrosos (Levin M.; Gealt, M.A. Eds.). McGraw Hill. Madrid. cap. 12, pp 273-311.
- Riser-Roberts, E.** (1998). Remediation of petroleum contaminated soils. CRC Press. Lewis publishers.
- Rowland, S.J.; Alexander, R.; Kazi, R.I.; Jones, D.M. y Douglas, A.G.** (1986). Microbial degradation of aromatic components of crude oils: a comparison of laboratory and field observations. *Organic Geochemistry* 9: 153-161.
- Sasaki, T.; Maki, H.; Ishihara, M. y Harayama, S.** (1998). Vanadium as an internal marker to evaluate microbial degradation of crude oil. *Environmental Science and Technology* 32, 3618-3621.

Figura 5. Representación habitual del hopano C30-17a(H), 21b(H) y su verdadera estructura tridimensional.

