

# Biorremediación

El artículo introduce los conceptos básicos para entender qué es la biorremediación y sus posibilidades de aplicación (atenuación natural, bioestimulación y bioaugmentación). También se presenta una descripción del papel fundamental de los microorganismos en todo el proceso, así como conceptos clave como biosurfactante y cometabolismo.

This article presents basic concepts useful understanding bioremediation and its possibilities of application (natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation). In addition, a description of the most important aspects of microbial activity is showed with special attention focused in concepts such as biosurfactant and cometabolism.

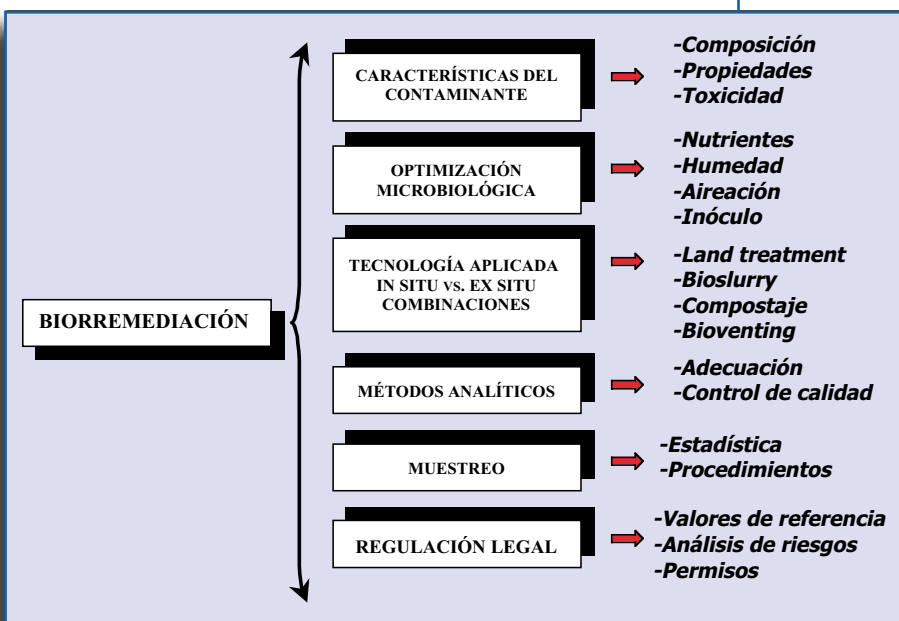
## Definición, limitaciones y campo de aplicación

La biorremediación es una tecnología que utiliza el potencial metabólico de los microorganismos (fundamentalmente bacterias, pero también hongos y levaduras) para transformar contaminantes orgánicos en compuestos más simples poco o nada contaminantes, y, por tanto, se puede utilizar para

limpiar terrenos o aguas contaminadas (Glazer y Nikaido, 1995). Su ámbito de aplicabilidad es muy amplio, pudiendo considerarse como objeto cada uno de los estados de la materia (Atlas y Unterman, 1999):

- Sólido: con aplicaciones sobre medios contaminados como suelos o sedimentos, o bien directamente en lodos, residuos, etc.

Figura 1. Parámetros implicados en la biorremediación (modificada de Walter y Crawford, 1997).



Jesús Sánchez Martín  
Microbiólogo  
Profesor Titular

José Luis Rodríguez Gallego  
Ingeniero de Minas  
Profesor Asociado

Universidad de Oviedo

- Líquido: aguas superficiales y subterráneas, aguas residuales.
- Gases: emisiones industriales, así como productos derivados del tratamiento de aguas o suelos.

También se puede realizar una clasificación en función de los contaminantes con los que se puede trabajar (Alexander, 1999; Eweis et al., 1999):

- Hidrocarburos de todo tipo (alifáticos, aromáticos, BTEX, PAHs,...).
- Hidrocarburos clorados (PCBs, TCE, PCE, pesticidas, herbicidas,...).
- Compuestos nitroaromáticos (TNT y otros).
- Metales pesados: Estos no se metabolizan por los microorganismos de manera apreciable, pero pueden ser inmovilizados o precipitados.
- Otros contaminantes: Compuestos organofosforados, cianuros, fenoles, etc.

¿Cuáles son las ventajas técnicas de la biorremediación? A su amplio ámbito de aplicabilidad en cuanto a compuestos orgánicos, como ya se ha mencionado arriba, pueden sumarse las siguientes:

- Mientras que los tratamientos físicos y buena parte de los químicos están basados en transferir la contaminación entre medios gaseoso, líquido y sólido, en la biorremediación se transfiere poca contaminación de un medio a otro.
- Es una tecnología poco intrusiva en el medio y generalmente no requiere componentes estructurales o mecánicos dignos de destacar.

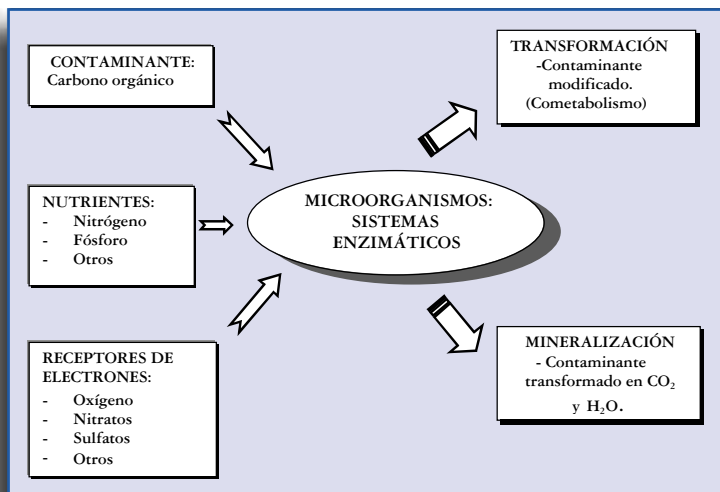


Figura 2. Actividades microbianas en el proceso de biorremediación.

- Comparativamente, es económica y, al tratarse de un proceso natural, suele tener aceptación por parte de la opinión pública.

La biorremediación tiene también inconvenientes y limitaciones. Por ejemplo, la biodegradación incompleta puede generar intermediarios metabólicos inaceptables, con un poder contaminante similar o incluso superior al producto de partida. Por otra parte, algunos compuestos, como veremos, son resistentes o inhiben la biorremediación. El tiempo requerido para un tratamiento adecuado puede ser difícil de predecir y el seguimiento y control de la velocidad y/o extensión del proceso es laborioso.

La aplicabilidad de esta técnica depende de varios factores:

- Propiedades del contaminante (biodegradabilidad). En general, los hidrocarburos alifáticos se degradan rápidamente. Las estructuras más ramificadas son más difíciles de degradar que las cadenas lineales, al producir impedimentos estéricos. Las cadenas ramificadas de sulfonatos de alquilo o arilo a menudo se degradan muy lentamente. Los dobles enlaces hacen la molécula más resistente, así como un incremento del número de anillos bencénicos. Las sustituciones químicas (ácidos dicarboxílicos, nitrilos, metila-

ciones, halogenaciones) también hacen la molécula más resistente. Por otra parte, la biodegradación de compuestos que contienen N ó S está ligada frecuentemente a su utilización como nutrientes.

- Presencia de comunidades microbianas adecuadas, con capacidad enzimática para metabolizar el compuesto(-s). Los microorganismos pueden ser autóctonos (*biorremediación intrínseca o atenuación*) o añadidos al sistema para mejorar la degradación (*bioaumento*). Sobre estos conceptos volveremos más adelante.
- Disponibilidad del contaminante. Es un factor crítico, más importante que la propia presencia de comunidades microbianas. Para que la degradación de un contaminante pueda producirse, es necesario que interactúe con la célula en medio acuoso. Inicialmente lo hará con la parte exterior de su pared para posteriormente ser transportado al interior de la misma. La forma más común de transporte es la complejación con enzimas extracelulares producidas por los microorganismos. Muchos contaminantes orgánicos, como los derivados del petróleo, PCBs, hidrocarburos aromáticos policíclicos (naftaleno, pireno, fluoreno), solventes halogenados, etc., son hidrofóbicos y tienden a adsorberse en el suelo, concretamente a la fracción orgánica (ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y húmicos). Esta es una de las causas, por ejemplo, de la persistencia de muchos pesticidas. La producción de surfactantes por los microorganismos es un factor determinante, como veremos, que atenúa este problema y facilita la degradación.

- Condiciones del medio contaminado: Propiedades que permiten o limitan el crecimiento microbiano y el metabolismo del compuesto. A veces es necesario modificar las condiciones, por ejemplo, añadiendo nutrientes o aireando (*bioestimulación*).

Es evidente que no podemos llevar a cabo un análisis de los estudios de biodegradación existentes sobre todos los compuestos potencialmente contaminantes. Por ello, el texto lo centraremos principalmente en los hidrocarburos, ya que estos compuestos son los implicados en la problemática del *Prestige*.

### **Biodegradación de hidrocarburos y enfoques metodológicos**

Las enumeraciones precedentes dejan claro que la complejidad implicada en esta tecnología hace inexcusable una aproximación multidisciplinar, en la que la microbiología, la química y la ingeniería tienen un papel importante. La amplitud de los aspectos incluidos en la aplicación de las técnicas de biorremediación se refleja en la figura 1.

Los microorganismos dotados genéticamente para la degradación pueden utilizar su potencial enzimático para mineralizar (biodegradar completamente hasta  $\text{CO}_2$ ) algunas familias de hidrocarburos, o bien, simplemente, degradarlos hasta productos intermedios, ya sea en un ambiente aerobio o anaerobio (figura 2). El recorrido, catalizado por las enzimas microbianas a través de los diversos subproductos, se conoce como ruta de degradación o "*pathway*" (figura 3). En cual-

quier caso, los procesos suelen tener lugar mediante una gran variedad de interacciones biogeoquímicas entre los componentes del suelo, el agua, los microorganismos y los contaminantes.

Desde un punto de vista metodológico, los tres conceptos, ya mencionados anteriormente, que determinan a su vez otras tantas aproximaciones principales a la biorremediación son los siguientes:

#### Atenuación natural

Se denomina biorremediación intrínseca o atenuación natural, a la que sobre muchos compuestos orgánicos se lleva a cabo por los microorganismos autóctonos, principalmente bacterias, del medio afectado (Rosenberg y Ron, 1996).

La capacidad intrínseca de asimilación de un medio depende, como ya se ha apuntado, de las "habilidades metabólicas" de los microorganismos nativos, del tipo de contaminante y, lógicamente, de la geoquímica y la hidrogeología en la zona. En relación con el oxígeno, y en un modelo muy simplificado, el proceso se definiría de la siguiente forma:

- En presencia de oxígeno (condiciones aerobias) los microorganismos convertirían en última instancia los contaminantes en dióxido de carbono, agua y masa celular microbiana (mineralización). Este proceso de biodegradación aeróbica ya está teniendo lugar en muchos de los

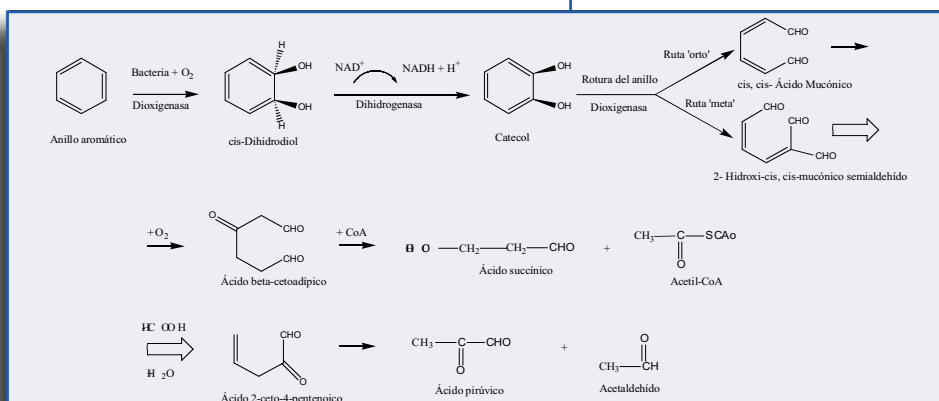
lugares afectados por el vertido del Prestige.

- En el caso de escasez de oxígeno (condiciones anaeróbicas), los microorganismos dependen de otros aceptores de electrones disponibles (nitrato, sulfato, formas oxidadas de Fe o Mn,...). Se trata de una biodegradación anaerobia, cuyos mecanismos y significado se están comenzando a comprender en los últimos años (Heider et al., 1999)

En condiciones ideales, los contaminantes se transformarían en compuestos químicos más simples, no peligrosos para los posibles receptores ni para el medio. Desgraciadamente, además de la propia recalcitrancia intrínseca de la molécula, hay bastantes factores que pueden limitar o impedir la atenuación natural en un medio contaminado; algunos de ellos ya los hemos apuntado (King et al., 1997):

- Carencia de nutrientes esenciales para los microorganismos (por ejemplo, nitrógeno y/o fósforo).
- Ausencia de aceptores adecuados de electrones (generalmente oxígeno).
- Inexistencia de condiciones medioambientales apropiadas (pH, potencial redox, humedad, temperatura).
- Ausencia de poblaciones microbianas con el potencial enzimático adecuado necesario para degradar los contaminantes.
- Presencia de componentes tóxicos en la mezcla contaminante.

Figura 3. Ruta habitual de degradación de los hidrocarburos aromáticos (Riser-Roberts, 1998; Atlas & Bartha, 2001).



Si aportamos al medio alguno de los elementos de los que carece o bien potenciamos los existentes, favoreceremos la eliminación del posible contaminante. En muchos casos este tipo de intervención será necesario para reforzar el proceso natural o bien para implantar unas condiciones que reduzcan el riesgo. En esto se basan las siguientes aproximaciones biotecnológicas:

#### Bioestimulación

La bioestimulación consiste en la introducción de modificaciones en el medio, mediante el aporte de nutrientes, aireación y otros procesos ("biostimulation" o "enhanced bioremediation"). En ocasiones será suficiente añadir oxígeno mediante aireación, aunque en otros se podría requerir la adición de nutrientes o ajustes de pH. En todo caso, estas aproximaciones son válidas siempre y cuando los microorganismos autóctonos sean capaces de degradar el contaminante tras un proceso más o menos largo de aclimatación previa.

En lo que se refiere a la adición de nutrientes, la biorremediación requiere que estos entren en contacto con el área impregnada por el contaminante y que su concentración sea suficiente para soportar el crecimiento máximo previsto de la población degradadora en el transcurso de las operaciones de remediación. Estos dos factores van a resultar claves en los intentos de biorremediación en las costas afectadas por el vertido del Prestige.

#### Bioaumentación

Otras líneas de investigación han llevado a la introducción de microorganismos aclimatados o incluso modificados genéticamente en el medio, con el fin de mejorar la biodegradación (Walter, 1997; Atlas y Unterman, 1999). Esta técnica funciona en condiciones de laboratorio o biorreactor, pero en ambientes externos

(suelo, agua) su implantación depende de una serie de factores (Alexander, 1999).

- El tamaño de la población de microorganismos degradadores crece rápidamente como respuesta a la contaminación del medio y es muy difícil, si no imposible, incrementar la población microbiana más allá de esos valores.
- La capacidad de carga de muchos ambientes viene determinada por factores tales como la presencia de toxinas, nutrientes y condiciones ambientales, movilidad y/o distribución de los microorganismos y la presencia de abundante materia orgánica.
- Los microorganismos añadidos deben sobrevivir a los depredadores y competir con éxito con la población autóctona antes de ocupar los nichos potenciales.
- En general, los ambientes más selectivos y la utilización de consorcios microbianos (ver abajo) favorecen la bioaugmentación.

Existen en el mercado productos comerciales, ensayados en el laboratorio, que reúnen microorganismos con gran potencial biodegradador (Korda et al., 1997). Sin embargo, la reintroducción de microorganismos indígenas, aislados del sitio contaminado y cultivados posteriormente, es más efectiva, especialmente cuando se acompañan de un suplemento nutricional y oxígeno. Por otro lado, es probable que el desarrollo de microorganismos manipulados genéticamente (MMG) (Timmis y Pieper, 1999; De Lorenzo, 2001) pueda en el futuro permitir abordar con éxito la degradación a escala real de compuestos que por sus características químicas son resistentes. Esta aproximación incluye también la ampliación de la capacidad degradativa de una bacteria frente a distintos compuestos, así como el



Figura 4:  
Degradación por parte de un consorcio microbiano de una mezcla de hidrocarburos similar a la vertida por el Prestige. De abajo arriba: (1) Medio acuoso con algunas bacterias libres; (2) emulsión agua-hidrocarburos alifáticos y aromáticos con bacterias en su interior; (3) "Fibras complejas" (posibles estructuras micelares de asfaltenos y resinas) en el inicio de su degradación. (Foto tomada por los autores).

incremento de las tasas de degradación. No obstante, los problemas de persistencia de cepas modificadas en el ambiente y los aspectos legales relacionados con la liberación de MMG, hacen esta solución no factible a corto plazo.

#### **Interacciones microbianas con los contaminantes**

La capacidad de obtener en el laboratorio, mediante manipulación genética, microorganismos con mejores propiedades degradativas de compuestos contaminantes no debe oscurecer el hecho de que, en los ambientes naturales, los microorganismos poseen una notable capacidad de adaptación, lo que se favorece por su integración en poblaciones dentro de una comunidad. La base de este fenómeno se encuentra, por una parte, en la adquisición de nuevas capacidades metabólicas, mediante mecanismos de variación genética convencionales (mutación, conversión génica, duplicación, transposición) o intercambio de genes y, por otra, en la posibilidad de complementación de las actividades metabólicas de los distintos grupos. La capacidad de intercambio genético entre las poblaciones, mediante conjugación, transformación y transducción se ha comenzado a analizar a nivel de laboratorio (Jaenecke et al., 1996) y constituye una fuerza directora notable en la evolución que conduce a la adaptación a nuevos ambientes, incluyendo los contaminados (Paul, 1999).

La complementación de las actividades metabólicas se lleva a cabo mediante relaciones de cometabolismo y/o simbiosis. El cometabolismo es una actividad importante desde el punto de vista medioambiental, con matices complejos, que no podemos desarrollar en este espacio. Implica, esencialmente, el metabolismo "gratuito" (es decir, no útil para el crecimiento u obtención de energía) de un sustrato secundario (compuesto contaminante) por enzimas que requieren otro sustrato primario diferente, el cual proporciona la energía y/o los cofactores reductores necesarios. Ambas actividades enzimáticas pueden ser diferentes y el resultado es, en teoría, la acumulación de productos de reacción a partir del contaminante. En la práctica, la existencia de otros microorganismos hace factible la degradación posterior de esos productos mediante reacciones simbióticas y, en última instancia, su mineralización (descartando la posibilidad, a tener en cuenta, de que dichos productos sean tóxicos, y/o persistentes) (Alexander, 1999; Wackett y Hershberger, 2001). El término de simbiosis, por tanto, implica la acción concertada de diferentes microorganismos sobre un sustrato(-s), mediante la combinación de sus actividades metabólicas, lo que permite su degradación. Esta no sería posible en presencia de los microorganismos aislados. Se comprende entonces la importancia de las poblaciones mixtas (que a veces se denominan consorcios) para la degradación más efectiva de los contaminantes orgánicos (figura 4). Todo esto se refleja en el creciente aumento de datos experimentales, en los que la bioaugmentación con consorcios microbianos, tanto a nivel de laboratorio como en el campo, está produciendo resultados esperanzadores (ejemplos aplicados al petróleo o sus derivados se encuentran en Mishra et al., 2001; Vasudevan et al., 2001; Potter y Duval, 2001; Rahman et al., 2002; Vinas et al., 2002).



Por último, y no menos importante en cuanto a facilitar la degradación de los compuestos orgánicos por las poblaciones microbianas, está la capacidad de producir biosurfactantes y bioemulsionantes (Ron y Rosenberg, 2001; Lang, 2002; Christofi e Ivshina, 2002). Los primeros se manifiestan como agentes que disminuyen la tensión superficial del agua (tensioactivos) y los segundos estabilizan las emulsiones entre el agua y otro líquido (figura 5). La presencia o utilización de microorganismos con esa capacidad en un medio contaminado es un factor a considerar, por facilitar la disponibilidad de los compuestos hidrofóbicos (aspecto ya mencionado atrás) y por la propia biodegradabilidad de los biosurfactantes, que descarta los efectos potencialmente nocivos de estas moléculas.

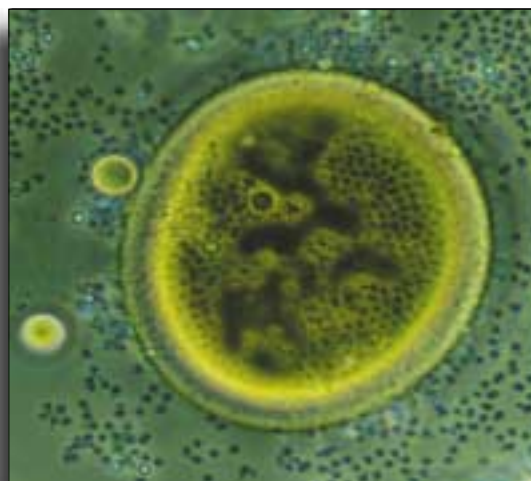


Figura 5. Observación al microscopio de contraste de fases (1000x) de bacterias de la cepa AC rodeando y degradando una gotícula de hidrocarburo (gasoil). Nótese la importancia de la interfase y el cambio de color que denota la producción de biosurfactante. (Foto tomada por los autores).

#### Bibliografía

**Alexander, M.** (1999). Biodegradation and Bioremediation 2nd ed. Academic Press, London.

**Atlas R.M. y Bartha, R.** (2001). Ecología Microbiana & Microbiología Ambiental. Pearson Educación, Madrid.

**Atlas R.M. y Unterman, R.** (1999). Bioremediation. In: Demain AL & Davies JE (Eds) Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology 2nd ed (pp 666-681), ASM Press, Washington D.C.

**Christofi, N. e Ivshina, I.B.** (2002). Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation, Journal of Applied Microbiology 93, 915-929.

**De Lorenzo, V.** (2001). Cleaning up behind us. EMBO reports 2, 357-359.

**Eweis, J.B.; Ergas, S.J.; Chang, D.P.V. y Schroeder, E.D.** (1999). Principios de biorrecuperación. McGrawHill, Madrid.

**Glazer, A.N. y Nikaido, H.** (1995). Microbial Biotech-

nology: Fundamentals of Applied Microbiology. W. H. Freeman and Company, New York.

**Heider, J.; Spormann, A.M.; Beller, H.R. y Widdel, F.** (1999). Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. FEMS Microbiology Reviews 22, 459-473.

**Jaenecke, S.; de Lorenzo, V.; Timmis, K.N. y Diaz, E.** (1996). A stringently controlled expression system for analysing lateral gene transfer between bacteria. Mol. Microbiol. 21: 293-300.

**King R.B.; Long, G.M. y Sheldon, J.K.** (1997). Practical environmental bioremediation, the field guide. Lewis publishers, NY.

**Korda, A.; Santas, P.; Tenente, A. y Santas, R.** (1997). Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used. Appl. Microbiol. Biotechnol. 48: 677-686.

**Lang, S.** (2002). Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). Current Opinion in Colloid & Interface Science 7, 12-20.

**Mishra, S.; Jyot, J.; Kuhad, R.C. y Banwari, L.** (2001). Evaluation of Inoculum Addition To Stimulate In Situ Bioremediation of Oily-Sludge-Contaminated Soil. Appl. Microbiol. Biotechnol. 67: 1675-1681.

**Paul, J.H.** (1999). Microbial gene transfer: an ecological perspective. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 1: 45-50.

**Potter, T.L. y Duval, B.** (2001). Cerro Negro bitumen degradation by a consortium of marine benthic microorganisms. Environ. Sci. Technol. 35: 76-83.

**Rahman, K.S.; Thahira-Rahman, J.; Lakshmanaperumalsam, P. y Banat, I.M.** (2002). Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. Bioresour. Technol. 85: 257-261.

**Ron, E.Z. y Rosenberg, E.** (2001). Natural roles of biosurfactants. Environmental Microbiology 3(4), 229-236.

**Rosenberg, E. y Ron, E.Z.** (1996). Bioremediation of petroleum contamination. In: Crawford RL & Crawford DL (Eds) Bioremediation. Principles and Applications (pp 100-124). Biotechnology Research Series 6. University Press, Cambridge.

**Timmis, K.N. y Pieper, D.H.** (1999). Bacteria designed for bioremediation. Trends in Biotechnology 17, 201-204.

**Vasudevan, N. y Rajaram, P.** (2001). Bioremediation of oil sludge-contaminated soil. Environ. Int. 26: 409-411.

**Vinas, M.; Grifoll, M.; Sabate, J. y Solanas, A.M.** (2002). Biodegradation of a crude oil by three microbial consortia of different origins and metabolic capabilities. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 28: 252-260.

**Wackett, L.P. y Hershberger, C.D.** (2001). Biocatalysis and biodegradation: Microbial transformation of organic compounds. ASM Press, Washington, D.C.

**Walter, M.V.** (1997). Bioaugmentation. In: Hurst, CJ (Ed) Manual of Environmental Microbiology (pp 753-765). ASM Press, Washington, D.C.