LA BIORREMEDIACIÓN UNA ALTERNATIVA PARA EL TRATAMIENTO DE LA CONTAMINACIÓN POR PETRÓLEO.

Lic., Damaris González Rodríguez [1], MSc., Arley Pérez Rojas [1]

1 Centro de Estudios de Medio Ambiente de Matanzas (CEMAM)

Facultad de Ingenierías Química Mecánica.

Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos.

Resumen

Se brinda información sobre las técnicas para el tratamiento de la contaminación por hidrocarburos con énfasis en la biorremediación, donde se plantea que es la más eficaz y económica.Se analizan las ventajas que brinda a partir de la acción de los microorganismos yse hace alusión al alcance que ha llegado la provincia de Matanzas con un gran desarrollo de las inversiones del petróleo, tanto en la extracción como comercialización. Se abordan también los resultados de investigación de la autora en este tema donde, se obtienen cepas bacterianas a partir de una fuente contaminada por hidrocarburos, con una elevada capacidad para emulsionar y degradar compuestos derivados del petróleo de las que el 60 % fueron identificadas como Pseudomonas (6), 20% de Bacillus (2), 10% Staphylococcus (1) y 10% de Citrobacter (1).

Palabras claves: *Biorremediación, Hidrocarburos, Degradación.*

Introducción

El hombre comenzó a producir un impacto sobre el ambiente natural desde el momento en que comenzó a utilizar los componentes de su entorno. Aunque el efecto de este impacto puede considerarse pequeño durante gran parte del desarrollo de la civilización humana, el advenimiento de la revolución industrial, a fines del siglo XIX, marca un punto de inflexión, ya que a partir de ese momento el hombre afecta y modifica su entorno a una velocidad superior a la capacidad de recuperación de los ecosistemas naturales.

La contaminación se define como la condición del medio ambiente, en la cual determinadas sustancias están presentes en concentraciones tales que afectan su calidad y composición; provocando efectos perjudiciales en los diferentes ecosistemas. Todo proceso que expulse o libere un contaminante al medio, constituye una fuente de contaminación ambiental. (López y col, 2002)

De las múltiples causas de contaminación ambiental, pocas han tenido y tienen la magnitud de la producida por el derrame de petróleo y sus derivados. Como los países productores de petróleo no son generalmente los principales consumidores, se produce un gran desplazamiento de estos productos desde las zonas de extracción a las de consumo. Se ha estimado que aproximadamente el 0,5 % del crudo que se transporta termina su camino en el mar, ya sea debido a derrames accidentales o a la descarga deliberada de las aguas de lavado y compensación de los grandes buques tanques. (Walter P Mac Cormack, Lucas A M Ruberto, 2003)

(c) 2008, Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos"

El Petróleo. Su impacto en el paisaje.

El petróleo es la energía primaria más importante a nivel mundial, desde el último tercio del siglo XIX prácticamente todas las actividades económicas se sustentan en el petróleo, de manera que alrededor del 40% de las necesidades energéticas mundiales son cubiertas con esta fuente de energía no renovable.

Para lograr comprender la afectación provocada por derrames de hidrocarburos en especial el petróleo, es necesario conocer su origen, composición y los impactos que pueden ocasionar.

Según la literatura consultada puede referirse que, el petróleo, está compuesto por una mezcla de hidrocarburos que pueden agruparse en cuatro clases: saturados, aromáticos, asfaltenos y resinas, como plantea Viñas en el año 2005 (Tabla 1).

Tabla 1 Composición de las fracciones químicas contenidas en un crudo de petróleo.

Fracción	Composición
Saturados	*n*-alcanos, alcanos de cadena ramificados e isoprenoides, y cicloparafinas o cicloalcanos, hopanos.
Aromáticos	Hidrocarburos monoaromáticos, diaromáticos, aromáticos policíclicos (HAP)
Resinas	Agregados de piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos y amidas
Asfaltenos	Agregados de HAP, ácidos nafténicos, sulfuros, ácidos grasos, metaloporfirinas, fenoles polihidratados.

Se conoce que el origen del petróleo está asociado al desarrollo de rocas sedimentarias, depositadas en ambientes marinos o próximos al mar, y que es el resultado de procesos

(c) 2008, Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos"

de descomposición de organismos de origen vegetal y animal que en tiempos remotos quedaron incorporados en esos depósitos.

La composición concreta de cada clase de petróleo depende de su antigüedad. El petróleo *moderno*, formado hace menos de veinte millones de años, está constituido por una mayor proporción de fracciones pesadas, que un petróleo *antiguo* de 100 millones de años de edad, ya que estos poseen un alto contenido de gasolinas y compuestos más volátiles. En consecuencia, el petróleo más antiguo, será el más volátil (Kern, 2002).

Según Howe-Grant, 1996 el petróleo se puede clasificar en dependencia de la clase de hidrocarburos que presenta en:

- *Petróleo de base parafínicas***:** Predominan los hidrocarburos saturados o parafínicos. Son muy fluidos de colores claros y bajo peso específico (aproximadamente 0,85 kg./L. Por destilación producen abundante parafina y poco asfalto, son los que proporcionan mayores porcentajes de nafta y aceite lubricante.

- *Petróleo de base asfáltica o nafténica***:** Predominan los hidrocarburos etilénicos y dietilínicos, cíclicos ciclánicos (llamados nafténicos), y bencénicos o aromáticos. Son muy viscosos, de coloración oscura y mayor peso específico (aproximadamente 0,950 kg/L). Por destilación producen un abundante residuo de asfalto.

- *Petróleo de base mixta***:** De composición de bases intermedias, formados por toda clase de hidrocarburos: Saturados, no saturados (etilénicos y acetilénicos) y cíclicos (ciclánicos o nafténicos y bencénicos o aromáticos). La mayoría de los yacimientos mundiales son de esto tipo.

*Impacto ecológico que ocasionan los derrames de petróleo***.**

El impacto ecológico de un vertido accidental de petróleo incluye efectos tanto a corto como a medio y largo plazo, debido a que pueden alterar el equilibrio ecológico y ser carcinogénicos para el hombre (Atlas y Bertha, 2002). Existen evidencias de cómo estos derrames afectan profundamente la flora y la fauna, razón por la cual la industria petrolera debe cumplir cuidadosamente con la legislación vigente, procedimientos y normas estrictas en materia de proteger el ambiente.

(c) 2008, Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos"

La contaminación por petróleo es ocasionada accidentalmente desde diferentes fuentes, una gran parte de la contaminación del mar se debe a los desechos generados por millones de barcos que recorren diariamente los mares. Se calcula que alrededor de 1500 millones de toneladas al año son transportadas a través de los mares y que durante el proceso de carga y descarga se pierde el 0.1 % de ese petróleo. Además los tanques cisterna utilizan como lastre, agua de mar y la regresan contaminadas con petróleo. Otros buque-tanques bombean el petróleo de desecho al mar en forma de desperdicio. Se calcula que por estas dos formas se arrojan al mar 3.5 millones de toneladas de petróleo. Se menciona que otra forma de contaminación, proviene de la perforación de pozos de gas y petróleo en las aguas costeras y de las fugas de las tuberías subacuáticas (Atlas y Bartha, 2002).

Cuando se produce un derrame de petróleo se mueren gran cantidad de aves, peces y otras especies de pequeña dimensión. Hay especialistas que opinan que la relación entre estos accidentes y la contaminación del mar está un poco exagerada, ya que casi el 50 % del petróleo que llega a los mares y los océanos proviene de la tierra, del que se arroja al suelo por el hombre en las ciudades y en zonas industriales que más tarde son arrastrados por corrientes fluviales hasta terminar en los océanos (Restrepo R, 2005).

La contaminación de las playas por petróleo causa graves problemas económicos a los habitantes de las costas ya que pierden ingresos por la actividad pesquera y la actividad turística. Estas playas requieren de al menos un año para su recuperación, cuando tienen corrientes y olas fuertes, pero las que no tienen estas características, tardan varios años en recuperarse. Los estuarios y marismas experimentan el mayor daño y no pueden limpiarse eficazmente.

Cuando tiene lugar un vertido de petróleo, éste puede ser dispersado y degradado de manera natural al cabo de varios años. Diversas investigaciones realizadas tras accidentes de estas características han puesto de manifiesto que la eliminación natural es muy lenta y los depósitos de petróleo permanecen durante muchos años; de manera que, la recuperación de los ecosistemas afectados puede llevar mucho tiempo. Este hecho ha determinado que, a lo largo del tiempo, se hayan ido desarrollando numerosas estrategias con el objetivo de paliar los efectos de una contaminación por vertidos de petróleo y acelerar el proceso de recuperación de los ambientes dañados (Viñas, 2005).

(c) 2008, Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos"

Una posibilidad de minimizar estos impactos es realizando una combinación de métodos físicos y químicos los cuales son especialmente útiles en situaciones graves; aunque, pueden ser procesos caros cuando la zona afectada es muy extensa. Otra alternativa como bien plantea Viñas en 2005, es la utilización de métodos biológicos que implican la acción de microorganismos; el término que se utiliza para definir este tipo de métodos es la biorremediación.

La autora plantea que en Cuba se ha visto incrementada la contaminación por derrames de petróleo, no solamente por vertido accidental, que son los de mayor influencia a nivel internacional por lo complejo que se hace su eliminación, sino también, aquellos que por falta de conciencia, ocasionan daño paulatinamente y que, en un período de tiempo determinado, causan grandes afectaciones en diversas zonas, hasta que el daño se hace irreversible como se puede evidenciar en el fregado de vehículos en ríos o lugares no destinados a ese fin, en el inadecuado mantenimiento de equipos en las industrias, averías en conductoras de combustibles, mal manejo de residuos, entre otros.

*Tratamientos de la contaminación por hidrocarburos***.**

Diversas técnicas se han desarrollado con vista a minimizar los impactos ocasionados por derrames accidentales de hidrocarburos, tanto en suelos como en aguas naturales y residuales. En el caso de las técnicas empleadas para suelos se pueden clasificar en dos grupos como se muestra en la tabla 2.

(c) 2008, Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos"

Tabla. 2. Técnicas para el tratamiento de la contaminación por hidrocarburos en suelos.

Técnicas tradicionales	**Técnicas innovadoras**
Incineración	Extracción de vapores del suelo
Mezclar, enterrar y cubrir	Aspersión de aire
Dispersión sobre el terreno	Desorción térmica
Solidificación	Deshalogenación química
Contención y Recogida	Dispersantes.
Reuso y Reciclado	Enjuague del suelo in situ
	Extracción con solvente
	Lavado del suelo
	Medidas Fitocorrectivas
	Biorremediación

Fuente: (Manacorday Cuadros, 2005).

En el caso de las técnicas empleadas para el tratamiento de aguas naturales y residuales se pueden mencionar:

- Limpieza de Costas.
- Contención y Recogida.
- Incineración in situ.
- Dispersantes.
- Biorremediación

A pesar de la gran cantidad de técnicas existentes para el tratamiento de dicha contaminación, la autora realiza la observación que en los últimos años se muestra una tendencia al uso de la biorremediación.

*Biorremediación***.**

El término biorremediación fue acuñado a principios de la década de los años 80. Los científicos después de un gran estudio determinaron que era posible aplicar estrategias de remediación que fuesen biológicas, basadas en la capacidad que presentan los

(c) 2008, Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos"

microorganismos de realizar procesos degradativos, por lo que puede definirse como el uso de organismos vivos, componentes celulares y enzimas libres, con el fin de realizar una mineralización (compuesto blanco → $CO_{2\ (g)}$+ H_2O (1)), una transformación parcial, la humificación de los residuos o de agentes contaminantes y una alteración del estado redox de metales, en otras palabras puede definirse como: método de saneamiento ambiental mediante microorganismos que degradan desechos orgánicos peligrosos y los transforman en compuestos menos dañinos (Maler et al, 2000; Cardona, 2003; Díaz *et al.*, 2003).

Las primeras observaciones de biorremediación fueron con el petróleo, después de algunos organoclorados y organofosforados; *se advirtió que los microorganismos no sólo eran patógenos, sino que además eran capaces de absorber compuestos orgánicos, algunos naturales, otros sintéticos, y degradarlos, lo que constituye el objetivo de la biorremediación..*

A raíz del daño provocado en Alaska por el vertido del Exxon Valdez se asumía que el petróleo provocaría un daño ambiental irreparable, pero como se ha ido observando durante décadas, el crudo después de un largo tiempo es diluido y asimilado por el medio ambiente (Domenico *et al.*, 2004).

La biorremediación se puede clasificar en:
*Biorremediación intrínseca***.** Se deja que el propio ambiente natural resuelva el problema si se determina que en el propio ambiente hay las poblaciones y condiciones óptimas. La figura 1 ilustra esta clasificación.

(c) 2008, Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos"

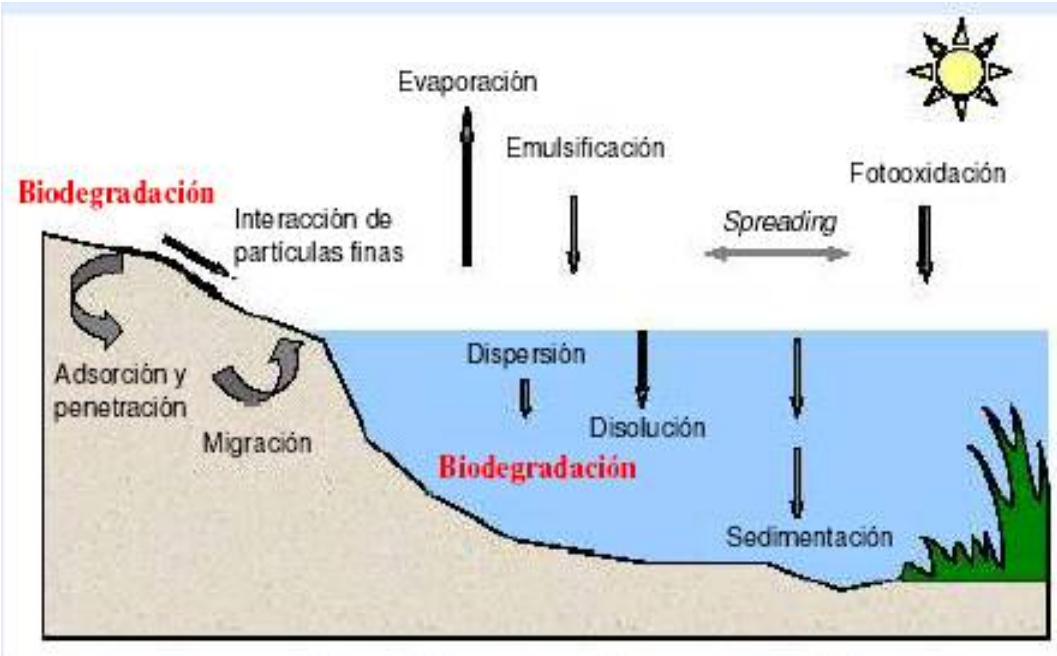

Figura 1: Biorremediación intrínseca de agua y suelo.

Fuente: Mancorda y Cuadros, 2005

*Biorremediación in-situ***.** Se intenta acelerar el proceso en el mismo ambiente modificando las condiciones ambientales o por inoculación microbiana como muestra la figura 2.

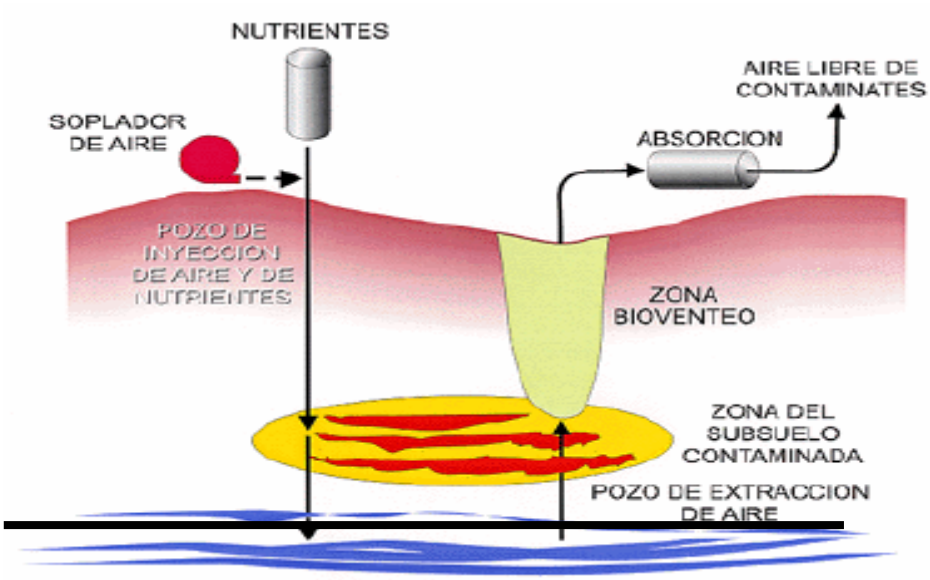

Figura 2: Biorremediación in situ de agua y suelo.

Fuente: Mancorda y Cuadros, 2005

Biorremediación ex-situ. Consiste en extraer el contaminante y degradarlo en otro sitio en condiciones controladas de laboratorio. Evidentemente la mayoría de las veces no se puede hacer, además de ser un proceso más caro. Se ilustra a través de la figura 3

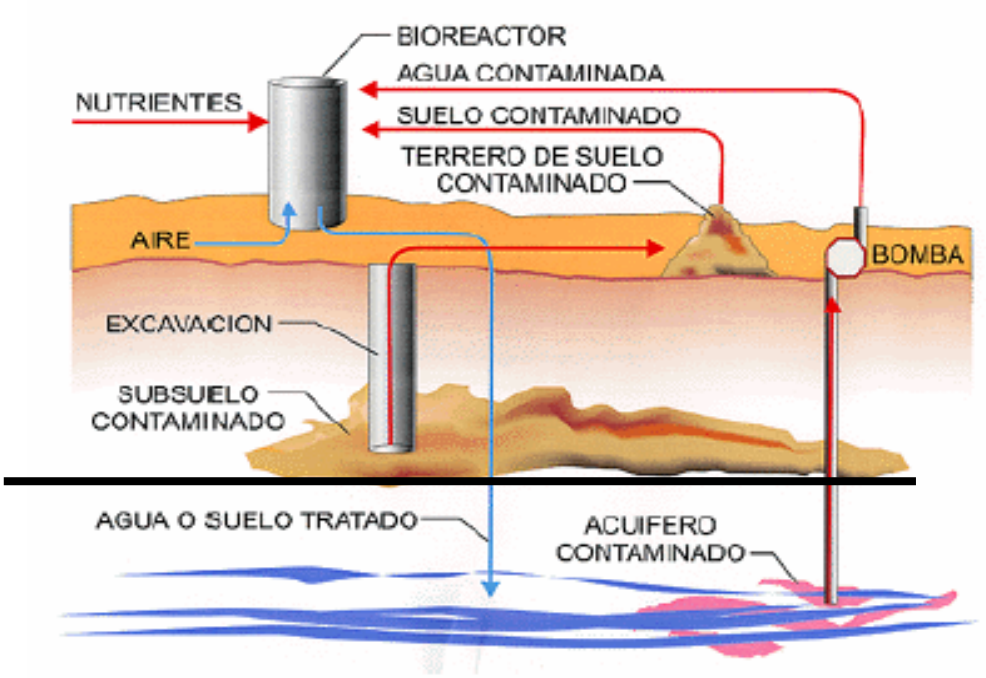

Figura 3: Biorremediación ex situ de agua y suelo.

Fuente: Mancorda y Cuadros, 2005

La biorremediación *in-situ* se ha convertido en una alternativa más popular porque es más barata que otros métodos de limpieza**.** Se trata de acelerar los procesos degradadores naturales de biodegradación mediante el suministro de oxígeno y nutrientes a la pluma contaminante durante un período prolongado. Y es que algunas de las limitaciones ambientales para la biorremediación de residuos químicos peligrosos son la excesiva concentración de residuo, la falta de oxígeno, el pH desfavorable, la falta de nutrientes, la falta de humedad y la temperatura desfavorable. Hay algunas limitaciones que no se pueden arreglar in situ como son la temperatura y el pH. Pero una vez que se corrigen algunas de estas limitaciones, se observa que la distribución ubicua de los microorganismos permite en la mayoría de los casos un enriquecimiento espontáneo de los agentes microbianos apropiados. Normalmente la inoculación de microorganismos específicos (conocido como bioaumento) no es ni necesaria ni útil en la gran mayoría de las situaciones, excepto cuando los microorganismos biodegradantes

(c) 2008, Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos"

no son buenos competidores y no consiguen mantenerse en el medio, o cuando el residuo químico sólo se cometaboliza y no proporciona ninguna ventaja selectiva a los organismos catabólicos. En estos casos se amplía la capacidad metabólica de las poblaciones microbianas autóctonas. Sin embargo, dicha inoculación debería ir siempre acompañada de unas condiciones de crecimiento razonablemente buenas en el medio contaminado. Como mínimo, debe asegurarse que la temperatura de crecimiento, el potencial hídrico, el pH, el equilibrio de nutrientes y el suministro de oxígeno son los adecuados. Si el contaminante no permite el crecimiento microbiano, será necesario añadir un sustrato de crecimiento adecuado y/o inocular el microorganismo repetidamente y en gran cantidad. (Dott, W., D et al, 2005)

Basamento bioquímico de la biodegradación de hidrocarburos.

El fundamento bioquímico de la biodegradación son las reacciones de oxidación reducción de la cadena respiratoria, cuyo fin es la obtención de energía. La cadena la inicia el sustrato orgánico (hidrocarburos) que es externo a la célula y que actúa como donor de electrones. Los aceptores de electrones comúnmente utilizados por los microorganismos son oxígeno, el ión nitrato, el hierro (III), sulfato y el dióxido de carbono. Cuando el oxígeno es utilizado como aceptor final de electrones los procesos de biodegradación son de tipo aerobio.

$$\text{Sustrato} + O_{2(g)} = \text{biomasa} + CO_{2(g)} + H_2O_{(l)} \qquad (2)$$

Si se utiliza otro aceptor diferente del oxígeno los procesos de biodegradación son de tipo anaerobio.

$$\text{Sustrato} + (NO_3^-{}_{(ac)},\ SO_4^{2-}{}_{(ac)},\ Fe^{3+}{}_{(ac)},\ Mn^{4+}{}_{(ac)}, CO_{2(g)}) = \text{biomasa} + CO_{2-(g)} + (N_{2(g)},\ S^{2+}{}_{(ac)},\ Fe^{2+}{}_{(ac)},\ Mn^{2+}{}_{(ac)},\ CH_{4(g)}) \qquad (3)$$

Degradación de hidrocarburos alifáticos.

Los hidrocarburos alifáticos son los hidrocarburos que se degradan con mayor rapidez. Existen tres vías metabólicas principales: la oxidación terminal, la oxidación subterminal y la w – oxidación (que deriva en parte de la oxidación terminal). El paso clave radica en oxidar la molécula para incrementar la solubilidad. La mayoría de los microorganismos convierten el n-alcano al correspondiente alcohol terminal, por medio de la monooxigenasa, la cual hidroliza el carbono del carbono terminal mayoritariamente (ruta de la oxidación terminal) mediante el átomo de una molécula de oxígeno. La formación de alcoholes subterminales (secundarios) es un

(c) 2008, Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos"

proceso poco frecuente y está descrito en hongos del género *Aspergillus* y *Fusarium* y en géneros bacterianos como Bacillus sp. (Viñas, 1999). Los pasos posteriores, en la oxidación terminal, convierten el n-alcohol en aldehído (alcohol-deshidrogenasa) y finalmente se forma un ácido graso (aldehído-deshidrogenasa). El ácido graso entonces puede entrar en la ruta de la ß-oxidación. También puede producirse una oxidación terminal del ácido graso produciéndose un diácido (w-oxidación) que también entraría en la ß-oxidación, mediante una descarboxilación previa.

*Degradación de isoprenoides***.**

Su estructura química ramificada condiciona su resistencia a los ataques microbianos. La degradación ocurre principalmente por la vía de la oxidación terminal. Los más estudiados son el pristano (C17) y el fitano (C18) (Smith, 2000). Fue en el accidente del Exxon Valdez, el mayor desastre ecológico en la era de los 90 donde se demostró que la microbiota autóctona existente era capaz de degradar isoprenoides, considerados marcadores internos hasta entonces. También se ha observado que en presencia de n-alcanos la degradación de isoprenoides está reprimida por los hidrocarburos lineales (Olivera, 2000)

*Degradación de hidrocarburos aromáticos***.**

La metabolización oxidativa completa de los hidrocarburos aromáticos y sus derivados conducen a compuestos que pertenecen o se incorporan fácilmente al ciclo Krebs. A excepción del naftaleno, fenantreno y antraceno, se sabe muy poco del metabolismo de degradación microbiana de los hidrocarburos poliaromáticos. La mayor información sobre la respiración bacteriana de compuestos aromáticos se ha derivado del estudio de especies del género *Pseudomonas*, pero también puede ser llevada a cabo por microorganismos corineformes, actinomicetos y posiblemente, por miembros del género *Spirillum* y bacilos esporogenos facultativos. De forma general, la degradación aerobia de un compuesto aromático implica la acción de enzimas monoxigenasas y dioxigenasas que oxidan al anillo a un fenol dihidrídico. El número de este tipo de moléculas es relativamente pequeño en comparación con la amplia variedad de sustratos susceptibles de ser degradados. Se trata, por tanto, de vías catabólicas convergentes. Entre los intermediarios a los que convergen tales vías, hay que considerar tres como los más frecuentes: el catecol (o-hidroxifenol), el protocatecuato (ácido 3,4 dihidroxibenzoico) y

(c) 2008, Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos"

el gentisato (ácido 2,5 dihidroxibenzoico) (Parés y Juárez, 1997). La figura 4 ilustra lo descrito.

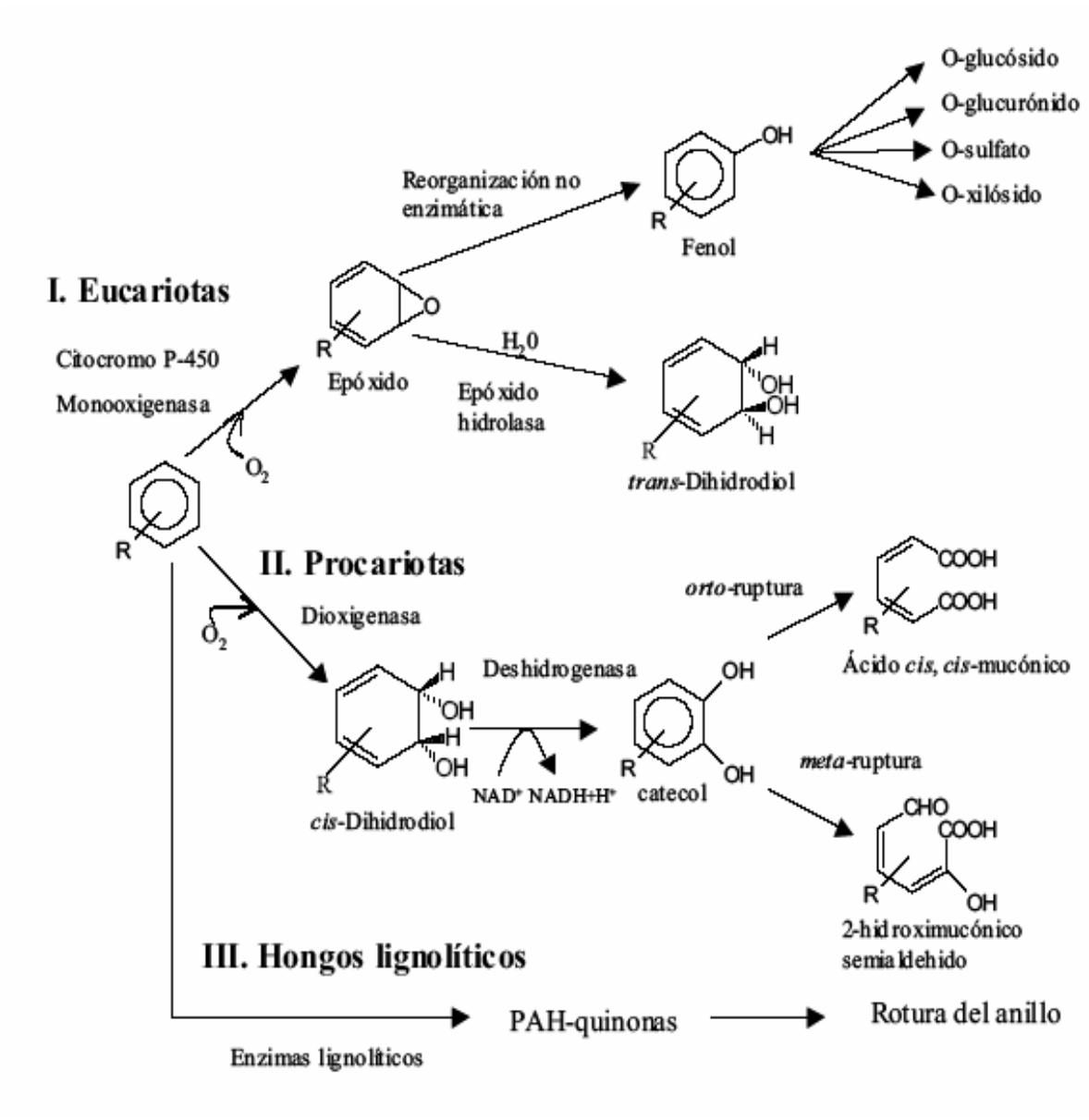

Figura 4. Reacciones iniciales del metabolismo aeróbico de los hidrocarburos poliaromáticos (HAPs).

A diferencia de la degradación aerobia, en ambientes anaerobios la degradación de compuestos aromáticos implica la reducción de los dobles enlaces del núcleo aromático. Anaeróbicamente los compuestos aromáticos pueden ser oxidados a dióxido de carbono (CO_2) por cultivos puros de bacterias que realicen respiración anaerobia (como los

iones nitrato y sulfato) o por bacterias fototróficas. En cambio, las bacterias metanogénicas degradan los compuestos aromáticos en cultivos mixtos (Parés y Juárez, 1997).

Los microorganismos como agentes de biorremediación.

Existe un gran número de microorganismos heterotróficos capaces de utilizar los hidrocarburos del petróleo como fuente de carbono y energía para su crecimiento, produciendo dióxido de carbono, agua, biomasa y otros productos parcialmente oxidados menos tóxicos. (Davis, 1997). Estos microorganismos presentan una especificidad biodegradadora hacia los diferentes componentes del petróleo.

Los hidrocarburos saturados son los más propensos a la oxidación y le siguen los hidrocarburos aromáticos. (Whyte, Bourbonniére y Greer, 2005). Las resinas y asfaltenos se consideran como compuestos resistentes a la biodegradación. Esto se debe a que su estructura es muy compleja y deben intervenir diferentes tipos de enzimas que sean capaces de oxidar tanto alcanos lineales como cíclicos, hidrocarburos aromáticos, poliaromáticos y heteropoliaromáticos. (Pineda y Mesta, 2001, Nápoles, 2005).

Desde los primeros estudios de ZoBell en 1946 en ambientes marinos, se han aislado numerosas cepas bacterianas de ambientes litorales y oceánicos capaces de degradar diferentes hidrocarburos. Muchas de estas bacterias, tales como *Alcalinivorax,* o *Planococcus,* usan un número limitado de fuentes de carbono, preferentemente utilizan hidrocarburos de petróleo, y podrían considerarse como especialistas (Dyksterhouse et al., 1995; Engelhardt et al., 2001; Golyshin et al., 2002). No obstante, también se han aislado bacterias que no presentan esta marcada especialización, como *Marinobacter, Staphylococcus, Micrococcus, Sphingomonas* o *Geobacillus* (Gauthier et al., 1992; Gilewicz et al., 1997; Maugeri et al., 2002). Otra especie que se ha trabajado en los últimos años fundamentalmente en suelos y aguas contaminadas, y que se caracteriza por resistencia a ambientes agresivos y capacidad nutricional para mineralizar gran variedad de hidrocarburos del petróleo es la *Pseudomonas aeruginosa,* capaz de degradar tanto compuestos alifáticos como aromáticos y poliaromáticos en condiciones aeróbicas, microaerófilas y desnitrificantes. (Chayabatra y Ju, 2000).

En Lima se obtuvieron 262 cepas bacterianas a partir de muestras de suelo y agua de la refinería *La Pampilla*, de las que se seleccionaron cincuenta y cinco cepas bacterianas, las de mayor actividad emulsificante. En su totalidad crecieron sobre el petróleo y

(c) 2008, Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos"

mostraron crecimientos comparables a las escalas dos, tres cuatro y cinco de Mc. Farland. Los microorganismos que se aislaron fueron: *Pseudomonas aeuruginosa*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas aureofasciens, Listonella damsela, Bacillus brevis, Enterobacter cloacae, Acinetobacter calcoaceticus var* (Mckew *et al.*, 2007) .

En la Universidad de Matanzas, Cuba se aislaron y seleccionaron por la autora cepas capaces de degradar hidrocarburos de los géneros: *Pseudomonas sp*. 60 %, *Bacillus sp.* 20%, *Citrobacter sp.* 10%, *Staphylococcus sp.* 10%, donde 39 cepas muestran una actividad emulsificante frente a hidrocarburos derivados del petróleo y 34 de ellas actividad degradadora.

De las 34 cepas que presentaron una actividad degradadora 24 de ellas muestran un valor de 2+ equivalente a $3*10^8$ UFC/mL en la escala de Mac Farland, lo que corresponde a un 72,72% del total. Cinco cepas bacterianas mostraron una actividad degradadora de 3+ equivalente a $9*10^8$ UFC/mL que corresponde a un 15,15% catalogado como bueno, cuatro cepas presentaron una actividad degradadora de 4+ para un 12,12% considerado como muy bueno y equivalente a $1.5*10^9$ UFC/mL y una mostró una actividad de 5+ catalogada como excelente representando 3.03% del total, como muestra la figura 5.

(c) 2008, Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos"

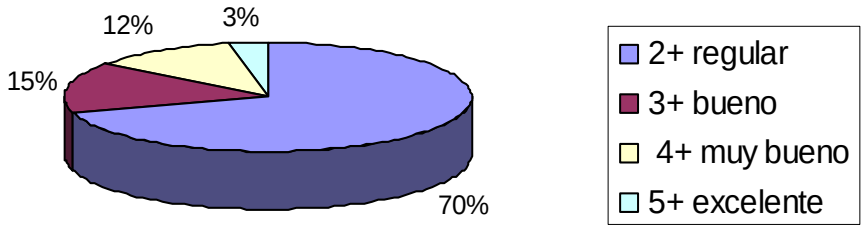

Figura 5. Porcentaje de cepas degradadoras de hidocarburos según Escala de Mc Farland.

Resultados similares a estos fueron obtenidos por Nápoles, 2005 cuando determinaron que la población degradadora de hidrocarburos obtenidas osciló entre 10^6 UFC/mL y 10^9 UFC/mL, al igual que los resultados publicados por Guzmán, 2003.

Biorremediación de aguas naturales contaminadas por hidrocarburos.

Los hidrocarburos varían en su habilidad de ser degradados, los derrames de estos en el agua tienden a formar láminas en la superficie donde el viento y el oleaje crean emulsiones microscópicas; lo que permite que los microorganismos tengan una mayor superficie de contacto con la partícula, y facilitan el acceso a la misma que posibilitan su degradación. Pero la biorremediación en el agua se ve afectada por la disponibilidad de nutrientes debido a que estos generalmente se encuentran a bajas concentraciones, por lo que generalmente tras un derrame se adiciona fósforo y nitrógeno como forma de estimular el crecimiento de los microorganismos que potencialmente degradarán el hidrocarburo. En el caso de que el derrame sea en el suelo el proceso es diferente, la oxidación es llevada a cabo por hongos y bacterias y el movimiento del hidrocarburo es más vertical, además el proceso de humificación tiende a atrapar el residuo haciéndolo más persistente. En este caso el factor limitante no está en la disponibilidad de nutrientes sino que la disponibilidad de oxígeno es baja, por lo que se debe airear el suelo o agregar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para mejorar el proceso. (Abbondanzi. F., 2004)

En los derrames, la fracción de hidrocarburo más volátil es evaporada con facilidad dejando a los componentes alifáticos y aromáticos para ser oxidado por diversos grupos de microorganismos. En experimentos llevados a cabo tras los derrames de petróleo se demuestra que el número de bacterias oxidantes aumenta de 10^3 a 10^6 veces poco después del mismo y en condiciones favorables más del 80 % de los componentes no volátiles son oxidados entre 6 meses y un año del derrame. Algunas fracciones, como los hidrocarburos de cadena ramificada y los policíclicos, permanecen mucho más tiempo en el ambiente principalmente si llegan a zonas anaerobias ocasionando perjuicios a largo plazo (Chaineau, C. H., 2007)

Efecto de los factores ambientales sobre la biodegradación de hidrocarburos.

Muchos de los ambientes susceptibles de ser contaminados como consecuencia de los vertidos de petróleo se encuentran sometidos a condiciones características en los que pueden influenciar factores como: temperatura, pH, concentraciones salinas elevadas y elevadas presiones. Por lo tanto, los microorganismos deben crecer bajo estas condiciones.

Temperatura

La temperatura es un parámetro fundamental a considerar en la biorremediación *in situ*, ya que tanto la biodisponibilidad como la solubilidad de los compuestos más hidrofóbicos dependen de este parámetro. Un incremento de temperatura provoca un descenso de la viscosidad, por tanto, afecta el grado de dispersión y el aumento de las tasas de difusión de los compuestos orgánicos. Además, las bajas temperaturas impiden la volatilización de alcanos de cadena corta (< C10), por lo que aumenta su solubilidad en la fase acuosa y su toxicidad, lo cual puede hacer más lento el proceso de degradación.

En comparación con los ecosistemas mesofílicos, hay pocos ejemplos de biorremediación de lugares contaminados sometidos a bajas temperaturas. El umbral para una degradación significativa es de 0ºC. Se han caracterizado diversos microorganismos adaptados a las bajas temperaturas, capaces de degradar hidrocarburos (Margesin y Schinner, 1999; Foght et al., 1999). De la misma manera, a temperaturas elevadas, como se presenta en las zonas litorales de regiones semiáridas, también se han encontrado microorganismos termófilos, que poseen un determinado potencial para la conversión de hidrocarburos (Müller et al., 1998).

(c) 2008, Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos"

Analizando lo planteado por dichos autores, este parámetro en Cuba no ejerce una influencia severa, puesto que las temperaturas cálidas más bien favorecen el empleo del método de biorremediación y propician el buen crecimiento de los microorganismos degradadores de hidrocarburos, que en su mayoría son mesófilos.

pH

La mineralización de hidrocarburos se ve favorecida a valores de pH próximos a la neutralidad. En algunas bacterias heterótrofas acidófilas se ha demostrado la adquisición y expresión de genes que codifican enzimas implicadas en la degradación de hidrocarburos aromáticos. Respecto a los microorganismos alcalófilos, se sabe que producen una serie de enzimas extracelulares interesantes desde el punto de vista industrial, pero la información sobre su capacidad de degradar hidrocarburos es limitada (Kanekar, 1999).

Salinidad

Hay una relación inversa entre salinidad y biodegradación de hidrocarburos de petróleo. Se ha visto, que a concentraciones salinas superiores al 2,4% (p/v) de NaCl, el efecto inhibidor es mayor para la degradación de fracciones aromáticas y polares que para la fracción saturada (Mille et al., 1991). No obstante, se conocen microorganismos capaces de oxidar a hicrocarburos a una concentración salina del 30% (p/v) de NaCl (Kuznetsov et al, 1992; Kulichevskaya et al., 1992).

Presión

Contaminantes con densidades mayores a la del agua de mar pueden hundirse hasta llegar al fondo marino, donde la presión hidrostática es elevada. La combinación de presión elevada y baja temperatura en el océano profundo provoca una baja actividad microbiana (Alexander, 1999). La tasa de biodegradación de un consorcio aislado del fondo marino es unas 10 veces inferior bajo condiciones de océano profundo que a presión ambiental.

Oxígeno

En la eficiencia de los procesos de biodegradación aeróbicos tiene gran incidencia la temperatura, ya que la solubilidad del oxígeno depende de la misma. Los pasos iniciales del catabolismo de hidrocarburos alifáticos, cíclicos y aromáticos por parte de bacterias u hongos implican la oxidación del sustrato mediante la enzima oxigenasa, que requiere

(c) 2008, Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos"

oxígeno molecular. En condiciones normales, no existen limitantes en la superficie de la columna de agua o en las capas superficiales de los ecosistemas bentónicos marinos. Sin embargo, con la profundidad, el sistema se vuelve anóxico. Tradicionalmente, se ha considerado que la biodegradación anaeróbica de hidrocarburos tiene lugar a tasas despreciables, y por lo tanto, la importancia ecológica es limitada. No obstante, posteriores han puesto de manifiesto la transcendencia de las rutas catabólicas anaeróbicas en la biorremediación (Harayama et al., 2004).

Nutrientes

Cuando hay un vertido de petróleo en ambientes que presentan una baja concentración de nutrientes inorgánicos se suelen producir cocientes C:N y/o C:P elevados, los cuales son desfavorables para el crecimiento microbiano. Es bien conocido que la disponibilidad de N y P limita la degradación microbiana de hidrocarburos. De esta manera, el ajuste de estas proporciones mediante la adición de los nutrientes en forma de fertilizantes oleofílicos estimulará la biodegradación. (Radwan et al., 2000)

Es importante el estudio exhaustivo de cada uno de los parámetros anteriormente descritos, pues de ello dependerá que sea factible o no el empleo de métodos de degradación biológica en determinado ambiente.

Conclusiones.

De las técnicas más empleadas a nivel mundial para el tratamiento de la contaminación por hidrocarburos se encuentra la biorremediación, siendo la misma una alternativa más eficaz y económica. En la universidad de Matanzas, Cuba se aislaron y seleccionaron cepas capaces de degradar hidrocarburos de los géneros: *Pseudomonas sp*., *Bacillus sp., Citrobacter sp., Staphylococcus sp,* donde 39 cepas mostraron una actividad emulsificante frente a hidrocarburos derivados del petróleo y 34 de ellas mostraron actividad degradadora.

Referencias Bibliográficas.

- Alexander, M. 1999 Biodegradation and bioremediation. 2nd Ed. Academic Press, London..

- Atlas, R y Bartha, R. 2002. Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. 4taEdición. Editorial Pearson Educación. S.A, Madrid,
- Cardona, S. Y. I., R.,. 2003. Biodegradación de diesel mexicano por un consorcio de bacterias de un suelo agrícola. Dyna, año 70, 138: 13-26.
- Chaineau, C. H.; C. Yepremian, J. F. Vidalie, J. Ducreux y D. Ballerini. 2007. Bioremediationof a Crude Oil-Polluted Soil: Biodegradation, Leaching and Toxicity Assessments.Water,Air, and Soil Pollution. 144:419-440.
- Chayabatra, Ch. and Ju L. K. 2000. " Degradation of n- hexadecane and its metabolites by Pseudomonas aeruginosa under microaerobic and anaerobic denitrifying conditions" Appl. Env. Microb, Vol. 66, No.2, p. 493- 498.
- Davis, J.B. 1997. "Petroleum microbiology". Ed. Elsevier. Inglaterra.,
- Díaz, R. I. J.; Ramírez, S. H.; Gutiérrezm, R. M. y Favela, T. E. 2003. Biodegradation of Maya crude oil fractions by bacterial strains and a defined mixed culture isolated from Cyperus laxus rhizosphere soil in a contaminated site. Can. J. Microbiol., 49: 755-761.
- Domenico, M.; Giudice, A. L.; Michaud, L.; Saitta, M. y Bruni, V. 2004. Diesel oil and PCB-degrading psychrotrophic bacteria isolated from Antarctic seawaters (Terra Nova Bay, Ross Sea) Polar Research, 23(2): 141-146.
- Dyksterhouse, S.E., Gray, J.P., Herwig, R.P., Lara, J.C. y Staley, J.T. 2005. Cycloclasticus pugetii gen. Nov., sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments. Int J Syst Bacteriol, 45: 116-123.
- Engelhardt, M.A., Daly, k., Swannell, R.P. y Head, I.M. 2001. Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading, Gram-positive bacterium, isolated from intertidal beach sediment, and description of Planococcus alkanoclasticus sp. nov. J Appl Microbiol, 237-247.
- Foght, J., Semple, K., Gauthier, C., Westlake, D.K.S., Blenkinsopp, S., Sergy, G., Wang, Z y Fingas, M. 1999. Effect of nitrogen source on biodegradation of crude oil by a defined bacterial consortium incubated under cold, marine conditions. Environ Technol, 20: 839-849.
- Gauthier, M.J., Lafay, B., Christen, R., Fernández, L., Acquaviva, M., Bonin, P. y Bertrand, J.C. 1992. Marinobacter hydrocarbonoclasticus gen. Nov., sp. nov., a new extremely halotolerant , hydrocarbon-degrading marine bacterium. Int J Syst Bacteriol, 42: 568-576.

(c) 2008, Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos"

- Gilewicz, M., Ni'matuzahroh, T., Nadalig, H., Budzinski, P., Doumenq, V., Michotey, J.C. y Bertrand, J.C. 1997. Isolation and characterization of a marine bacterium capable of utilizing 2-methylphenanthrene. Appl Microbiol Biotechnol, 48: 528-533.
- Golyshin, P.N., Chernikova, T.N., Abraham, W.R., Lunsdorf, H., Timmis, K.N. y Yakimov, M.M. 2002. Oleiphilaceae fam. nov., to include Oleiphilus messinensis gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligatory utilizes hydrocarbons. Int J Syst Evol Microbiol, 52: 901-911.
- Harayama, S., Kasai, Y. y Hara, A. 2004. Microbial communities in oil-contaminated seawater. Curr Opin Biotechnol. 15: 205-214.
- Howe-Grant, M. 1996. Petroleum. Encyclopedia of chemical technology 4th ed. Wiley Inerscience Publication. New York. pp. 342-480.
- Kern, M. 2002. Food, Feed, Fibre, Fuel and Industrial Products of the Future: Challenges and Opportunities. Understanding the Strategic Potential of Plant Genetic Engineering Journal of Agronomy and Crop Science, 188(5): 291-305.
- Kulichevskaya, I.S., Milekhina, E.I., Borzenkov, I.A., Zvyagintseva, I.S. y Belyaev SS. 1992. Oxidation of petroleum hydrocarbons by extremely halophilic archaebacteria. Microbiology, 60: 596-601.
- Kuznetsov, V.D., Zaitseva, T.A., Vakulenko, L.V. y Filippova, S.N. 1992. Streptomyces albiaxialis sp. nov.: a new petroleum hydrocarbon-degrading species of thermo- and halotolerant Streptomyces. Microbiology, 61: 62-67.
- Maler, R., Pepper, I., Gerba, C. 2000. Microorganisms and organic pollutants. Enviromental Microbiology. Academic Press, Ed. Canada, 363-368.
- Manacorda, A, M, Cuadros, D. 2005. Técnicas de Remediación Biológicas. Microbiología Ambiental. .
- Margesin, R. y Schinner, F. 1997. Efficiency of indigenous and inoculated cold-adapted soil microorganisms for biodegradation of diesel oil in alpine soils. Appl Environ Microbiol,.63: 2660-2664.
- Maugeri, T.L., Gugliandolo, C., Caccamo, D. y Stackebrandt, E. 2002. Three novel halotolerant and thermophilic Geobacillus strains from shallow marine vents. Syst Appl Microbiol, 25: 450-455.
- Müller, R., Antranikian, G., Maloney, S. y Sharp, R. 1998. Thermophilic degradation of environmental pollutants. En Advances in Biochemical

(c) 2008, Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos"

Engineering/Bio-technology. vol 61 (ed. Antranikian, G.), pp.155-169, Springer, Berlin Heidelberg New York.

- Nápoles, A. J. 2005. Ensayos de tratabilidad en suelos contaminados con petróleo. CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL, FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, UNIVERSIDAD DE ORIENTE.
- Olivera, N., Commendatore, M., Morán, A., y Esteves, J., 2000. Biosurfactant-enhaced degradation of residual hydrocarbons from ship bilge wastes. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 25: 70-73.
- Parés, R. Y Juárez, A. 1997. Bioquímica de los microorganismos. Compuestos aromáticos. Edición en Español. Editorial Reverté, S.A. Cap. 17:229-231.
- Pineda-Flores, G.; Mesta-Howard, A.M. 2001. "Petroleum asphaltenes: generated problematic and posible biodegradation mechanisms" Rev. Latinoamericana de Microbiología. Vol. 43. No. 3, p. 143-150,
- Radwan, S.S., Al.Mailem, D., El-Nemr, I. y Salamah, S. 2000. Enhanced remediation of hydrocarbon contaminated desert soil fertilized with organic carbons. Int Biodeterior Biodegrad, 46: 129-132.
- Restrepo R. 2005. Derrame de hidrocarburos. Impacto en los ecosistemas tropicales. ECOPETROL Instituto Colombiano de Petróleo.
- Smith, M. 2000. The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. Biodegratation 1:191-206.
- Viñas, M. 2005. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona
- Walter P Mac Cormack, Lucas A M Ruberto, 2003. Revista Ciencia Hoy, Volumen 13 - Nº 77 Octubre-Noviembre