

Biorremediación: una herramienta para el saneamiento de ecosistemas marinos contaminados con petróleo

Yaima Barrios San Martín

Laboratorio de Química y Biotecnología, Centro de Investigación del Petróleo, CEINPET
Washington #63, esq. Churruca, Cerro, CP 12 600, La Habana, Cuba
E-mail: yy@ceinpet.cupet.cu

RESUMEN

En las últimas décadas, paralela al desarrollo de la industria petrolera, ha aumentado la contaminación en los ecosistemas marinos. El vertimiento de petróleo crudo y sus derivados provocan efectos negativos a corto, mediano y largo plazo. La eliminación natural de los contaminantes puede tardar años, e incluso no ocurrir. Para acelerar este proceso y garantizar la reparación del ecosistema dañado, se emplean técnicas de biorremediación. Esta variante emergente de la biotecnología ambiental, se basa en el empleo de la actividad metabólica microbiana (bacterias, hongos, levaduras, algas y tapetes microbianos) para degradar los hidrocarburos del petróleo. Su aplicación tiene dos propósitos esenciales: la bioestimulación de la población autóctona viable, y la bioaumentación (introducción de poblaciones microbianas viables). Su selección requiere el análisis de factores abióticos y bióticos, que influyen en el proceso de biodegradación. Los primeros incluyen los relacionados con el contaminante y las condiciones medioambientales; y los bióticos, lo referente a la población microbiana. En el desarrollo de esta tecnología, se han formulado varios productos comercializables para la limpieza de desastres: fertilizantes contruidos por nutrientes con funciones bioestimuladoras; bioproductos conformados por microorganismos; y productos químicos con la función de aumentar o estimular la población microbiana que interviene en el proceso de biodegradación.

Palabras clave: biorremediación, ecosistemas marinos, biodegradación de hidrocarburos, bioproductos

Biotechnología Aplicada 2011;28:60-68

ABSTRACT

Bioremediation: a tool for the reparation of marine ecosystems polluted with petroleum. During the last decades the course of the anthropogenic contamination of marine ecosystems has paralleled that of the oil industry. Spills of crude oil and its derivatives can have short, medium and long-term negative consequences, and the elimination of pollutants by natural means may take years or even longer. Bioremediation is an emergent branch of environmental biotechnology that is often used to accelerate this process and guarantees the reparation of damaged ecosystems, based on harnessing the metabolic capabilities of bacteria, fungi, yeast, algae and microbial mats to degrade oil hydrocarbons. Bioremediation follows two main strategies: the stimulation of indigenous microbial populations, known as biostimulation, and bioaugmentation, the introduction of viable microbial populations. Choosing one or another depends on the analysis of abiotic and biotic factors influencing the biodegradation process; the former refers to factors related with the pollutant and environmental conditions, while the latter encompasses all factors that have to do with microbial populations. The development of bioremediation has led to the appearance of commercially available products for spill cleanup: fertilizers containing bio-stimulating nutrients, bioproducts based on microorganisms, and chemical products to stimulate the growth of the microbial populations involved in the process of biodegradation.

Keywords: bioremediation, marine ecosystem, biodegradation of hydrocarbons, bioproducts

Introducción

Hoy día trasiegan por los mares cerca de 2 mil millones de toneladas de petróleo crudo. Su descarga accidental y a gran escala constituye una importante causa de contaminación de las aguas marinas. La mayor responsabilidad de la contaminación por crudos suele ser de los barcos superpetroleros que lo transportan (responsables del 22% del total); aunque el vertimiento de otros barcos y la explotación de las plataformas petrolíferas marinas, también son una importante aportación de vertidos. Se estima que de cada millón de toneladas de crudo embarcadas, se vierte una tonelada. De ellas, solo el 10% del petróleo que va al mar proviene de accidentes marinos. La atmósfera, la filtración natural, los ríos, las escorrentías urbanas, las refinerías de petróleo situadas en la costa, las descargas operativas de los petroleros, son fuentes de contaminación. Otra de las causas fue el vertido en el Golfo Pérsico durante la Guerra en 1991, que se

estima en unas 460 mil toneladas [1]. Las descargas operativas se deben al lavado de los depósitos en el mar y al vertido de lastre en forma de agua contaminada antes de la carga.

Los accidentes que implican vertimiento de miles de toneladas de petróleo originan mareas negras, que causan problemas económicos: interrumpen la pesca y la navegación, y alteran gravemente el ecosistema, al ocasionar un alto índice de mortalidad de aves acuáticas, peces, mamíferos acuáticos y otros organismos del océano.

La efusión provocada por la colisión del buque petrolero *Exxon Valdez* con los arrecifes de Prince William Sound en 1989, se consideró, hasta el año 2010, la más dañina al medio ambiente. En este accidente se derramaron entre 40 y 50 mil toneladas de petróleo crudo. Parte de la estrategia propuesta para este derrame de petróleo fue el uso de un fertilizante

1. Borrás G. Mareas Negras: catástrofes y accidentes [cited 2010 july 17]. Available from: http://www.cetmar.org/documentacion/mareas_negras_catstrofes.htm

oliófilo (Inipol EAP22), para estimular la biodegradación del crudo. A las dos semanas, una parte considerable del petróleo derramado en las playas había sido removido. Entre las mayores mareas negras registradas hasta el momento está la provocada por el buque petrolero *Amoco Cádiz* frente a las costas francesas en 1978 (227 mil toneladas de crudo). La afectación de 1900 km de costas francesas y españolas, causada por 63 mil toneladas de petróleo crudo tras el hundimiento del buque petrolero *Prestige*, está considerada también entre los desastres ecológicos más grandes debidos a derrames de petróleo. El vertimiento de más de 37 mil toneladas de combustible pesado por el petrolero *Erika* en las costas de la región francesa de Bretaña, causaron la mayor tragedia ornitológica del Atlántico europeo [1]. Para mejorar estas consecuencias, se valoró la aplicación de la biorremediación y el empleo de bioproductos.

El incontrolado derrame de petróleo por más de 60 días en el Golfo de México, tras la explosión y hundimiento de la Plataforma *Deepwater Horizon* en abril de 2010, se considera el mayor desastre ecológico de su tipo. Según Richard Harris [2], hasta el 15 de mayo de 2010 se habían vertido casi 300 mil toneladas de petróleo crudo, lo que constituye una fuerte amenaza para cientos de especies marinas y aves. Una vez sellado el pozo y concluidas las labores de recolección mecánica, la aplicación del bioproducto Oilzapper por el Instituto de Energía y Recursos (TERI) de la India (consorcio de cinco cepas bacterianas degradadoras de hidrocarburos saturados y aromáticos, compuestos bencénicos nitrogenados y sulfurados, y asfaltenos o alquitrán), parece ser una buena opción desde el punto de vista ecológico.

La plataforma insular de Cuba es muy vulnerable a los impactos en las áreas acuáticas, por sus características geográficas (estrecha y alargada); sin embargo, solo cinco accidentes relacionados con la actividad petrolera han afectado los ecosistemas marinos en los últimos 20 años: tres por roturas en oleoductos: Playa Jibacoa (2001), Ensenada de Arroyo Blanco (2002), Ensenada de Bacunayagua (2008), uno en la Bahía de Matanzas (1998) por la colisión entre el buque *Sharadar* y el *Bravo*, y otro en la Bahía de Cienfuegos (1992) por la rotura del casco del barco petrolero *Aida*, al estrellarse contra una roca.

El impacto de un vertido accidental de petróleo provoca efectos negativos a corto, mediano y largo plazo. Este se puede dispersar y degradar de manera natural durante varios años. Diversas investigaciones han evidenciado que la eliminación natural de petróleo es muy lenta, y sus depósitos permanecen durante mucho tiempo; de modo que la recuperación de los ecosistemas afectados puede demorar mucho [3]. Estudios recientes en la zona de Alaska [4], donde ocurrió el derrame del *Exxon Valdez*, muestran concentraciones medias anuales de 62258 mg/g de hidrocarburos totales (base húmeda) en sedimentos del área. Otra prueba de la persistencia de estos contaminantes es el empleo de los perfiles de concentración obtenidos en columnas de sedimentos como naturales para la reconstrucción de descargas históricas antropogénicas [5], lo cual resulta importante para evaluar el éxito de medidas recientes de control de la contaminación por hidrocarburos. Ello ha determinado que se hayan

desarrollado 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. En esta revisión se examinan los conceptos de biorremediación como biotecnología ambiental y sus clasificaciones. Se analizan los factores que contribuyen a la biodegradación de petróleo en ecosistemas marinos; y se enuncian los microorganismos degradadores de hidrocarburos, así como diferentes bioproductos para la biorremediación de este ecosistema.

Biotecnología ambiental: biorremediación

La biotecnología ambiental surge entre los siglos XIX y XX para el tratamiento de aguas residuales urbanas. En la segunda mitad del siglo XX, se extendió a la remediación de suelos, la purificación de gases, el saneamiento de aguas superficiales y subterráneas, la purificación de aguas residuales industriales, las técnicas de deposición de residuales en vertederos sanitarios y compostaje de residuos biorgánicos [6].

La biotecnología ambiental emplea los procesos biológicos modernos en la protección y restauración de la calidad del ambiente. Esta surgió como una solución a muchos de los problemas de contaminación actual: se puede evaluar el estado de los ecosistemas, transformar los contaminantes en sustancias no tóxicas, generar materiales biodegradables a partir de recursos renovables y desarrollar procesos de manufactura y manejo de desechos ambientalmente seguros [7]. Esta disciplina científica-aplicada abarca cualquier aplicación destinada a reducir la contaminación, con la utilización de microorganismos para la generación de combustibles y de plantas modificadas genéticamente para la absorción de sustancias tóxicas.

Cada vez son más las compañías industriales que están desarrollando procesos biotecnológicos en el área de prevención, con el fin de reducir el impacto ambiental como respuesta a la tendencia internacional al desarrollo de una sociedad sostenible. Esta es una opción para producir nuevos productos con menos impacto ambiental [7].

Actualmente, la principal aplicación de la biotecnología ambiental es la biorremediación, considerada como una tecnología emergente. El término inglés *bioremediation*, que en español se traduce como biorrestauración, se refiere a los tratamientos con sistemas biológicos para la restauración o limpieza de suelos, aguas subterráneas y aire contaminados con xenobióticos. Técnicamente el anglicismo biorremediación es aceptado y más utilizado. Puede definirse entonces como biorremediación: una tecnología de biorrestauración de ambientes naturales previamente contaminados con xenobióticos por eliminación, atenuación o transformación de estos compuestos [8, 9], con el empleo de la capacidad metabólica de los microorganismos (bacterias, hongos, levaduras y algas) [8, 10] y algunas plantas, oxígeno y nutrientes, para acelerar los procesos de biodegradación natural. La transformación puede ser parcial, por obtención de un compuesto menos tóxico que el parental, mientras que la mineralización o transformación total es la degradación hasta dióxido de carbono y agua (procesos aerobios), agua y metano (condiciones anaerobias). Es

2. Harris R. Gulf spill may far exceed official estimates. National Public Radio. 2010 May 14. Available from <http://www.npr.org/templates/story/story.php?storyId=126809525>

3. Martínez-Alonso M, Gaju N. El papel de los tapetes microbianos en la biorrecuperación de zonas litorales sometidas a la contaminación por vertidos de petróleo. *Ecosistemas*. 2005;14(2):79-91.

4. Carls MG, Rice SD, Hose JE. Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval pacific herring (*Clupea pallasii*). *Environ Toxicol Chem*. 2001;18:481-93.

5. Santschi PH, Presley BJ, Wade TL, Garcia-Romero B, Baskaran M. Historical contamination of PAHs, PCBs, DDTs, and heavy metals in Mississippi River Delta, Galveston Bay and Tampa Bay sediment cores. *Mar Environ Res*. 2001;52(1):51-79.

6. Hartmann L. Historical development of wastewater treatment processes. In: J Winter, editor. *Biotechnology-Environmental processes I*. Weinheim:Wiley-VCH; 1999.

7. Zylstra GJ, Kukor JJ. What is environmental biotechnology? *Curr Opin Biotech*. 2005;16(3):243-5.

8. Maier R. Microorganisms and organic pollutants. In: Maier R, Pepper IL and CP Gerba, editors. *Environmental Microbiology*. San Diego, CA: Academic Press; 2000. p. 363-400.

9. Prasad KS, Kumar NS, Sharma S. *Bioremediation: Developments, current practices and perspectives*. *Genet Eng Biotechnol J*. 2010;1-20.

10. Strong PJ, Burgess JE. Treatment methods for wine-related distillery wastewaters: a review. *Bioremediat J*. 2008;12:70-87.

importante destacar que la biorremediación es efectiva solo si el contaminante es biodegradable [8].

En 1974 se registró la primera patente de agente biológico de remediación: una cepa de *Pseudomonas putida* degradadora de petróleo [11]. En 1991, se habían reportado aproximadamente 70 géneros microbianos degradadores de compuestos del petróleo, en las dos décadas sucesivas ese número casi se ha duplicado. Estos microorganismos pertenecen al menos a 11 divisiones procariotas diferentes [12].

El interés de la aplicación de microorganismos en ecosistemas acuáticos contaminados con residuos petrolíferos, se refleja en las publicaciones y patentes de los últimos años sobre el estudio y desarrollo de procesos de biodegradación de diferentes contaminantes. La biodescontaminación debe ser factible de aplicar en condiciones de campo, respetuosa con el entorno natural en el que tiene que desarrollarse; y competitiva desde el punto de vista económico. En estos últimos aspectos, los microorganismos frecuentemente asociados a los espacios contaminados, reúnen características ecológicas y metabólicas muy valiosas, ya que son degradadores naturales de compuestos xenobióticos. Su capacidad de desarrollarse sobre sustratos de bajo costo [13] y que sus inóculos se puedan producir masivamente mediante técnicas convencionales de uso industrial habitual, los hace candidatos singulares para su utilización en procesos de biorremediación.

La gran diversidad estructural de contaminantes ambientales que son degradados por microorganismos (fundamentalmente bacterias y hongos), los convierte en potencialmente usables para la biorremediación. Contaminantes recalcitrantes como los bifenilos policlorados, componentes de los destilados de la refinación del crudo, los hidrocarburos aromáticos policíclicos, las resinas y los asfaltenos [14], se mineralizan a dióxido de carbono por varias especies de hongos del tipo ligninolíticos y bacterias, incluyendo mezclas complejas de estas sustancias.

Teniendo en cuenta el movimiento o no de la matriz contaminada, las técnicas de biorremediación pueden dividirse en dos: *in situ* y *ex situ* [15]. En las primeras, los suelos y las aguas contaminadas son tratados en el propio lugar de la contaminación sin transformación. En las segundas, implica la excavación o traslado de los suelos contaminados; y en el caso de las aguas, significa el bombeo-tratamiento-recarga o traslado a reactores.

La selección de la técnica depende de tres principios básicos: la bioquímica, que es la posibilidad de que el contaminante sea transformado biológicamente; la biodisponibilidad, que es la accesibilidad del microorganismo al contaminante; y la bioactividad, que es la oportunidad de optimizar la actividad biológica [15].

La biorremediación de aguas subterráneas se efectúa mediante el bombeo-tratamiento-recarga que consiste en extraer el agua subterránea, promover la biodegradación de los contaminantes en reactores instalados en la superficie y posteriormente devolverla al acuífero, o bien, inyectar nutrientes y bacterias. De manera que se establece una recirculación y el sitio mismo se convierte en un biorreactor [16].

La versatilidad de la biorremediación se basa en que puede adaptarse a las necesidades de cada sitio.

Se clasifican en tres tipos fundamentales: la bioestimulación, que es la adición de nutrientes para potenciar la actividad metabólica de la microbiota degradadora autóctona; la bioaumentación, que es la adición de microorganismos degradadores exógenos cuando la proporción de la microbiota degradadora autóctona es muy reducida [9]; y la bioaumentación con microorganismos modificados genéticamente, tecnología prácticamente exclusiva de países desarrollados. La obtención de productos mediante técnicas de ADN recombinante para potenciar vías degradativas específicas para fines de biorremediación es cara, aunque muy eficiente.

Como todo proceso tecnológico, la biorremediación tiene ventajas y desventajas. Una ventaja importante es su bajo costo en relación con otros tratamientos. Es difícil hacer una comparación de costos, porque es necesario conocer las características de cada sitio en particular, pero en términos generales se puede decir que la biorremediación es por lo menos diez veces más económica que la incineración, y tres veces más económica que algunas tecnologías fisicoquímicas de inmovilización. Ello está dado por varios factores, como un menor gasto de energía, bajo costo de los nutrientes y la operación bajo condiciones ambientales, que hace que su uso sea muy práctico para los países en vías de desarrollo [15]. Por otra parte, es una tecnología limpia, ya que los contaminantes pueden ser transformados hasta compuestos inocuos como el dióxido de carbono.

Las desventajas de la biorremediación consisten principalmente en que no se puede aplicar en el campo cuando hay compuestos radioactivos, cuando los compuestos orgánicos contaminantes son altamente halogenados, cuando existen metales pesados que inhiben la actividad microbiana o cuando las condiciones microambientales son desfavorables. Debido a que cada microorganismo tiene sus características, la tolerancia que presentan ante cada situación es muy particular. También pueden ocurrir fenómenos de inhibición de la actividad microbiana a concentraciones muy altas de contaminantes orgánicos [16].

Biodegradación de hidrocarburos

La biodegradación del petróleo es un proceso natural [17-19] que demora meses o años según las condiciones [20], la complejidad molecular de sus componentes y la acumulación. La biodegradación de contaminantes depende de factores abióticos o fisicoquímicos que agrupan a los que se relacionan con el contaminante (estructura química, concentración y biodisponibilidad) y las condiciones medioambientales (disponibilidad de oxígeno y nutrientes, pH, temperaturas, presión, salinidad, presencia de metales pesados); mientras que los bióticos dependen de los microorganismos (población microbiana: concentración e interacciones).

Procesos físico-químicos

Cuando el petróleo crudo y sus productos de destilación se arrojan al ambiente marino, inmediatamente suceden cambios físicos y químicos. Los procesos abiológicos que ocurren a la intemperie son la evaporación, la disolución, la dispersión, la oxidación fotoquímica, la emulsificación de agua-petróleo, la

11. Prescott LM, Harley JP, Klein DA. Microbiology. Fundamentals of applied microbiology 2002;2:1012-4.

12. Glazer AN, Nikaido H. Microbial biotechnology: Fundamentals of applied microbiology 2007;8:510-28.

13. Rodríguez S, Fernández M, Bermúdez RC, Morris H. Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus* sp. Rev Iberoamer Micol. 2003;20(4):164-8.

14. Field JA, E Jong, G Feijoo-Costa, de Bont JAM. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. Trends Biotechnol. 1993;11:44-9.

15. Dua M, Singh A, Sethunathan N, Johri AK. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. Appl Microbiol Biotechnol. 2002;59(2-3):143-52.

16. Saval S. La biorremediación como alternativa para la limpieza de suelos y acuíferos. Ing Cienc Ambient. 1998;34:6-9.

17. Santiesteban, A. Qué es el petróleo. La Habana: Instituto del Libro; 1969.

18. Atlas RM, Bartha R. Stimulated biodegradation of oil slicks using oleophilic fertilizers. Environ Sci Technol. 1973;7:538-41.

19. Blackburn JW, Hafker WR. The impact of biochemistry, bioavailability and bioactivity on the selection of bioremediation techniques. Trends Biotechnol. 1993;11:328-33.

20. Atlas RM. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. Microbiol Rev. 1981;45:180-209.

adsorción de partículas suspendidas, el hundimiento y la sedimentación. Estos procesos suceden simultáneamente y causan cambios importantes en la composición química y las propiedades físicas del contaminante original, que puede afectar la tasa o la efectividad de la biodegradación. El proceso de intemperie más importante durante las primeras 48 horas de un derrame generalmente es la evaporación, mediante la cual los compuestos de bajo y mediano peso con puntos de ebullición más bajos se volatilizan y van a la atmósfera: una a dos terceras partes de la masa del derrame se pierde en ese periodo. A medida que transcurre el tiempo disminuye la tasa de evaporación. Por ejemplo, cuando el accidente de buque *Amoco Cadiz*, un tercio del derrame se evaporó en tres días. La evaporación es controlada por la composición del petróleo, el área superficial y las propiedades físicas, la velocidad del viento, la temperatura del aire y del mar, el estado del mar y la intensidad de la radiación solar. El material remanente es más rico en metales (principalmente níquel y vanadio), ceras y asfaltos, más que el petróleo original. Con la evaporación, el peso específico y la viscosidad del petróleo original también aumentan. La disolución del petróleo en la columna de agua es mucho menos importante que la evaporación, desde la perspectiva de la pérdida de masa del petróleo derramado, pues la disolución de parte del combustible es improbable. Sin embargo, esta última cobra importancia porque algunas fracciones solubles en agua (compuestos aromáticos ligeros) son tóxicos para varios organismos marinos (incluyendo los microorganismos degradadores), y su impacto sobre el ambiente marino es más significativo que las consideraciones de balance masivas que podrían implicar [21].

Características del hidrocarburo contaminante

Las características del contaminante es uno de los factores que definen el tipo de tratamiento que se requiere para la descontaminación. Los hidrocarburos se componen por elementos hidrofóbicos, poco solubles en agua. A medida que aumenta el número de átomos de carbono en la estructura y la conjugación en los compuestos aromáticos, disminuye la solubilidad. Los hidrocarburos sustituidos por grupos polares (alcoholes, ácidos, etc.) son más solubles [22]. La solubilidad del hidrocarburo afecta su biodisponibilidad. Esta puede estar limitada además si el contaminante tiene alguna barrera física o química que impide el paso de la molécula al interior celular para ser metabolizada [23]. La viscosidad también dificulta la interacción contaminante-nutriente-bacteria-aceptores de electrones [24]. La presencia de componentes tóxicos o inhibidores del crecimiento microbiano también afecta la interacción del contaminante, y la volatilidad no impide la biodegradación.

Fuente de carbono

Existe una especificidad biodegradadora por parte de los microorganismos para los diferentes componentes del petróleo. Si el 'sitio de ataque o acción' de la enzima degradadora se encuentra bloqueado (isoprenoides o moléculas sustituidas con grupos voluminosos COOH , CH_3), la reacción no tendrá lugar, disminuyendo la actividad biodegradativa [25]. En general los

hidrocarburos saturados suelen ser más susceptibles a la degradación que los aromáticos [26-28] y estos que resinas y asfaltos [26, 28]. Los n-alcenos son los más propensos a la oxidación [27, 29]. Le siguen los isoalcenos, aunque los muy ramificados y los que contienen carbonos cuaternarios son poco biodegradados. Las olefinas son menos utilizadas como fuente de carbono que sus correspondientes alcanos y le siguen los hidrocarburos aromáticos, los que son de bajo peso molecular pueden ser metabolizados cuando están presentes en bajas concentraciones. Los cicloalcenos son altamente tóxicos, por lo que se emplean como sustratos excepcionales [29]. Las parafinas son componentes fácilmente degradables. Los isómeros, hidrocarburos cíclicos y de larga cadena carbonada tienen una lenta biodegradación por lo que necesitan una microbiota específica. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos también pueden ser usados como fuente de carbono por diferentes especies de microorganismos [27, 30].

Una alta concentración del hidrocarburo contaminante puede inhibir la actividad microbiana por toxicidad de la fuente de carbono [23, 31, 32]. Se han reportado procesos biológicos en ensayos de campo a concentraciones de contaminantes de hasta 30%, por encima de este valor la degradación es muy baja aunque no nula [25]. La composición de los compuestos xenobióticos se transforma en el tiempo por acción de agentes ambientales, la actividad microbiana y los procesos físico-químicos; como consecuencia de esto el contaminante se enriquece en compuestos pesados, más difíciles de degradar, disminuyendo la velocidad de degradación con el envejecimiento del contaminante [23, 32-34].

Disponibilidad de nutrientes para el crecimiento de los microorganismos

Cuando hay un vertido de petróleo en ambientes que presentan bajas concentraciones de nutrientes inorgánicos se suelen producir elevados cocientes carbono/nitrógeno y/o carbono/fósforo, los cuales son desfavorables para el crecimiento microbiano [3].

La fuente de nitrógeno interviene en la síntesis de aminoácidos y enzimas. Los microorganismos la obtienen en forma natural como amonios, nitratos, nitratos, compuestos orgánicos que contienen nitrógeno molecular, además de estar presentes en la materia orgánica como grupos aminos [35]. Prácticamente todos los microorganismos emplean el amonio como fuente nitrógeno porque entra directamente al metabolismo [36]; aún así las formas reducidas (amónicas) son preferibles en términos energéticos, se sabe que el oxígeno de las formas oxidadas (nitráticas) sí contribuye a las necesidades implicadas en la degradación de compuestos xenobióticos aunque formas oxidadas no puedan sustituir al oxígeno molecular en la respiración. Existe además (en el campo de la producción de proteína unicelular a partir de hidrocarburos) una amplia documentación que demuestra la importancia fundamental del aporte de oxígeno en la degradación de estos compuestos, muy reducidos y creadores de un ambiente hidrofóbico refractario a la transferencia de este gas [37].

Estas consideraciones sugieren, pese a la frecuencia de los suplementos amónicos en los ensayos de

21. Otremba Z, Toczek H. Degradation of crude oil film on the surface of seawater: the role of luminous, biological and aquatorial factors. *Polish J Environ Stud.* 2002; 11(5):555-9.

22. Proskuriakoz VA, Drabkin AE. Química del petróleo y del gas. Moscú: Mir; 1984.

23. Nápoles J, Ávalos A. Biorremediación de ecosistemas contaminados con xenobióticos [Internet]. Monografías de la Universidad de Oriente, 2008 [cited 13 Jun 2010]. Available from: <http://monografias.uo.edu.cu/index.php/monografias/article/view/4/6>

24. Gruiz K, Kriston E. In situ bioremediation of hydrocarbon in soil. *J Soil Contam.* 1995;4:163-73.

25. Ercoli G, Gálvez J, Di Paola P, Cantero J, Videla S, Medaura M, et al. Análisis y evaluación de parámetros críticos en la biodegradación de hidrocarburos en suelo. Apuntes. Estudio realizado en laboratorio de Bioprocesos, Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina.

26. Song HG, Wang X, Bartha R. Bioremediation potential of terrestrial fuel spill. *Appl Environ Microbiol.* 1990;56:652-6.

27. Whyte LG, Bourbonniere L, Greer CW. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic *Pseudomonas* strains possessing both alkane (alk) and naphthalene (nah) catabolic pathways. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63:3719-23.

28. León N, Infante C, Arias M, Marquez M, Gorrián A. Biodegradability of Venezuela crude oils. SPE International conference on health, safety, and environment in oil and gas exploration and production, 1998 June 7-10, Caracas, Venezuela.

29. Joseph IN, Capo MC, Bellota M, Ramos Y, Ramos I, Fuentes M. Aislamiento y selección de microorganismos degradadores de hidrocarburos en la plataforma cubana. *Ciencias Biológicas.* 1994;27:137-48.

30. Grifoll M, Selifonov SA, Gatlin CV, Chapman PJ. Actions of a versatile fluorene-degrading bacterial isolate on polycyclic aromatic compounds. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61:3711-23.

31. Sabater J, Viñas M, Vázquez A, Solanas AM, Gandarillas C, Vázquez V, et al. Ensayos de tratabilidad en la recuperación de suelos contaminados por la tecnología de la biorremediación. *Residuos. Revista técnica.* 2001;59:78-82.

32. Nápoles J. Ensayos de tratabilidad en suelos contaminados con petróleo. Tesis en opción al título de Máster en Biotecnología. Mención Ambiental. Universidad de Oriente, Cuba; 2005.

33. Young L, Cerniglia C, editors. *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals.* 1st ed. New York: John Wiley & Sons; 1995. p. 629.

34. Fonseca F. Biotecnología para combatir derrames de petróleo en el mar. Tesis en opción al título de Máster. Universidad de la Habana, Cuba; 1995.

35. Núñez R. Obtención, caracterización y aplicación de un bioproducto bacteriano para la biorremediación de derrames de hidrocarburos. Tesis Doctoral. Universidad de La Habana, Cuba, 2003.

36. Moat AG, Foster JW. *Microbial Physiology.* 3rd ed. New York: John Wiley; 1995.

biorremediación, la conveniencia de las fuentes oxidadas de nitrógeno. Incluso en la opción de potenciar la microbiota natural, tendría menos interés favorecer especies consumidoras preferentes de formas reducidas de nitrógeno, con más dificultades previsibles para prosperar en un ambiente con importantes restricciones a la transferencia de oxígeno [37].

La fuente de fósforo actúa en la formación de los compuestos enzimáticos celulares que se utilizan en los procesos de síntesis y degradación. Las fuentes de fósforo más utilizadas en cultivos de bacterias son K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 o mezclas de éstos [38].

Se considera que por lo general la adición de nitrógeno y fósforo, tiene un efecto positivo incrementando las poblaciones microbianas y las tasas de biodegradación del contaminante [23]. Las concentraciones de nitrógeno y fósforo están en función de la concentración de carbono, con una relación: C:N:P 100:10:1 [31, 39].

Bridé y Bos [40] describieron que la concentración de fósforo puede ser más decisiva que la de nitrógeno, lo que no implica que las necesidades de fósforo excedan en términos absolutos a las de nitrógeno. Aunque se asume a veces que parte de las necesidades de nitrógeno pueden cubrirse con los compuestos nitrogenados de los crudos petroleros, se sabe que un amplio grupo de microorganismos accede lentamente a muchas fuentes orgánicas de nitrógeno, y no parece que las presentes en los crudos petroleros constituyan casos favorables [37]. Otras veces se asumen las necesidades en función de evaluaciones en sustratos naturales, donde el nutriente limitante puede ser precisamente el fósforo. Las conclusiones procedentes de este tipo de enfoque, aún siendo fieles a las condiciones de trabajo de laboratorio, pueden no resultar categóricas.

pH

La mineralización de hidrocarburos se ve favorecida a pH próximos a la neutralidad [3]. Existe un pH óptimo para el desarrollo de cada especie microbiana, el cual normalmente se encuentra también cercano a la neutralidad [41]. La variación del pH afecta a la actividad microbiana y también la solubilización y adsorción/absorción del contaminante e iones. Las formas catiónicas (NH_4^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) son más solubles a pH ácidos, mientras que las formas aniónicas (NO_3^- , NO_2^- , PO_4^{3-} , Cl^-) son más solubles a pH alcalino [23, 25]. Para la mayoría de las bacterias este valor se mueve entre 6 y 8, para las levaduras entre 4 y 6, y para hongos filamentosos entre 3 y 7.

Temperatura

La temperatura es un factor importante en la actividad degradativa si tenemos en cuenta que cada microorganismo tiene un rango de temperatura que garantiza su actividad metabólica. A bajas temperaturas se detiene la actividad microbiana porque se para el transporte de nutrientes y sustancias de desecho a través de la membrana [42], con un umbral para la degradación significativa de 0 °C [43]. Se han caracterizado diversos microorganismos adaptados a las bajas temperaturas, capaces de degradar hidrocarburos [41, 43-47]. Aún cuando por encima de los 40 °C ocurre una disminu-

ción de la actividad microbiana por desnaturalización de las enzimas [48], en las zonas litorales de regiones semiáridas se han encontrado microorganismos termófilos, que poseen un determinado potencial para la transformación de hidrocarburos [3, 49]. Las temperaturas también afectan la viscosidad y solubilidad de los hidrocarburos e intervienen en la volatilización de los compuestos de bajo peso molecular. Comúnmente las temperaturas más adecuadas se encuentran entre 15 y 45 °C (rango de temperatura de crecimiento de los microorganismos mesófilos) [50]; sin embargo, se ha llegado al consenso de que la temperatura óptima en los procesos biodegradativos está en el rango de 30-40 °C. Claro está que existen factores ambientales desfavorables para mantener este rango, teniendo en cuenta las fluctuaciones entre el día y la noche y las estaciones anuales, por lo que existen métodos que permiten controlar estas fluctuaciones [51]. Esto significa que la biorremediación es más eficaz en los meses de primavera y verano. En comparación con los ecosistemas mesofílicos, hay pocos ejemplos de biorremediación en lugares contaminados sometidos a bajas temperaturas [52].

Aceptores de electrones. Disponibilidad de oxígeno

Las reacciones de óxido-reducción de la cadena respiratoria constituyen el principio bioquímico de la biorremediación [53]. Los aceptores de electrones generalmente utilizados por los microorganismos son oxígeno (biodegradación aerobia), nitrato, hierro (III), sulfato y dióxido de carbono (biodegradación anaerobia).

En la degradación aerobia lo más común es la oxidación a través de oxigenasas o intermediarios que incorporan fácilmente al ciclo de Krebs, tal es el caso de catecol, el protocatecuato y el gentisato (anillos aromáticos) y ácidos grasos en el caso de las cadenas lineales. El proceso de degradación anaerobia ocurre en tres etapas: activación del sustrato (carboxilaciones, hidroxilaciones anaerobias o formación de tioésteres del correspondiente ácido aromático con el acetil-CoA); ataque enzimático (mediante reductasas) de los intermediarios activados, y conversión de los compuestos no cíclicos (como resultado de la ruptura del anillo) en metabolitos centrales [23].

La eficiencia de los procesos de biodegradación aeróbicos depende del grado de solubilidad del oxígeno. Los pasos iniciales del catabolismo de hidrocarburos alifáticos, cíclicos y aromáticos por parte de bacterias y hongos implican la oxidación del sustrato mediante oxigenasas, que requieren oxígeno molecular. Estequiométricamente, deben requerirse aproximadamente 3 libras de oxígeno para convertir una libra de hidrocarburo a dióxido de carbono y agua, por lo que las primeras aproximaciones de requerimientos de oxígeno están típicamente basadas en la relación 3:1. Normalmente, no existen condiciones 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. La disponibilidad de oxígeno generalmente es un factor limitante en la degradación de los hidrocarburos del petróleo [54, 55], ya que el funcionamiento de los microorganismos es menos eficiente bajo

37. Murado MA, Mirón J, González MP. Tratamiento microbiológico de la contaminación por petróleo en ambientes marinos. Estudio de su posible optimización. En: Seguimiento de la contaminación producida por el accidente del buque Aegean Sea. Centro de Publicaciones, Ministerio de Medio Ambiente. Madrid. 1996. p. 168-85.

38. Robert M, Mercadé E, Andrés C, Espuny MJ, Manresa MA, Guinea J. Optimización de la producción de biotensioactivos por *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. Grasas aceites. 1991;42:1-7.

39. Juteau P, Bisailon JG, Lépine F, Ratheau V, Beaudet R, Villemur R. Improving the biotreatment of hydrocarbons-contaminated soils by addition of activated sludge taken from the wastewater treatment facilities of an oil refinery. Biodegradation. 2003;14:31-40.

40. Bridie A, Bos J. Biological degradation of mineral oil in sea water. J Inst Petrol. 1971;57:270-7.

41. Hunkeler D, Höhener P, Zeyer J. Engineered and subsequent intrinsic in situ bioremediation of a diesel fuel contaminated aquifer. J Contam Hydrol. 2002;59(3-4):231-45.

42. Whyte LG, Hawari J, Zhou E, Bourbonniere L, Inniss WE, Greer CW. Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by a psychrotrophic *Rhodococcus* sp. Appl Environ Microbiol. 1998;64(7):2578-84.

43. Siron R, Pelletier E, Brochu C. Environmental factors influencing the biodegradation of petroleum hydrocarbons in cold sea water. Arch Environ Contam Toxicol. 1995;28:406-16.

44. MacCormack WP, Fraile ER. Characterization of a hydrocarbon degrading psychrophilic Antarctic bacterium. Antarct Sci. 1997;9:150-5.

45. Margesin R, Schinner F. Biological decontamination of oil spills in cold environments. J Chem Technol Biotechnol. 1999;74:381-9.

46. Bordenave S, Goni-Urriza MS, Caumette P, Duran R. Effects of heavy fuel oil on the bacterial community structure of a pristine microbial mat. Appl Environ Microbiol. 2007;73:6089-97.

47. Kim JS, Crowley DE. Microbial diversity in natural asphalts of the Rancho La Brea Tar Pits. Appl Environ Microbiol. 2007;73:4579-91.

48. Semple KT, Reid BJ, Fermor TR. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. Environ Pollut. 2001;112:269-83.

49. Chen CI, Taylor RT. Batch and fed-batch bioreactor cultivations of a *Thermus* species with thermophilic BTEX-degrading activity. Appl Microbiol Biotechnol. 1997;47:726-33.

50. Feitkenhauer H, Müller R, Märkl H. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and long chain alkanes at 60-70 degrees C by *Thermus* and *Bacillus* spp. Biodegradation. 2003;14:367-72.

51. Pollard SJT, Heneday SE, Fedorak PM. Bioremediation of petroleum- and creosote-contaminated soils: a review of constraints. Waste Manage Res. 1994;12:173-94.

condiciones anaeróbicas [55, 56]. Tradicionalmente se ha considerado que la biodegradación anaeróbica de hidrocarburos tiene lugar a tasas despreciables, y que, por lo tanto, la importancia ecológica es limitada. No obstante, investigaciones posteriores han puesto de manifiesto la trascendencia de las rutas catabólicas anaeróbicas en la biorremediación [3, 57, 58].

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. Por ejemplo, la tasa de biodegradación de un consorcio aislado del fondo marino era unas diez veces inferior bajo condiciones de océano profundo que a presión ambiental [3].

Salinidad

Existe una relación inversa entre la salinidad y la biodegradación de hidrocarburos del petróleo. Se ha visto que a concentraciones salinas de cloruro de sodio superiores al 2.4% (p/v), el efecto inhibitor es mayor para la degradación de fracciones aromáticas y polares que para la fracción saturada [59, 60]. No obstante, se conocen microorganismos capaces de oxidar hidrocarburos a una concentración salina del 30% (p/v) de cloruro de sodio [3].

Metales pesados

Altas concentraciones de metales pesados pueden inhabilitar completamente una población microbiana al inhibir parte de la actividad metabólica y de la división celular, provocando desnaturalización de proteínas y alteraciones en la membrana celular. Los microorganismos también pueden desarrollar resistencia o tolerancia a elevados niveles de metales [9]. Los metales pesados son difícilmente removibles de los ambientes contaminados, ya que por lo general no pueden ser degradados biológicamente. El zinc, cobre, níquel y cromo son metales esenciales o micronutrientes beneficiosos para microorganismos, plantas y animales [60], mientras que otros como el cadmio, mercurio y plomo no tienen funciones fisiológicas y/o biológicas conocidas [61].

Población microbiana: interacciones y concentración

El factor determinante en el proceso de biodegradación es la población microbiana, que debe estar adaptada a utilizar el compuesto contaminante y poseer las enzimas necesarias para catalizar las reacciones de degradación [23, 34, 62]. Al estar el petróleo constituido por numerosos compuestos químicos, ningún microorganismo puede degradar por sí solo todos sus constituyentes, sino que necesita agruparse con otros formando poblaciones mixtas o consorcios microbianos. Los consorcios microbianos tienen mayor poder biodegradativo porque la información genética que codifica al sistema enzimático del consorcio es más completa y por tanto es más probable la degradación de las mezclas complejas de hidrocarburos presentes en un área dañada [32, 62]. Además, se establece una compleja interacción entre las especies microbianas:

algunas atacan a un compuesto y otras culminan su degradación, por lo que generalmente se consideran más eficientes que los cultivos puros [24, 29]. Los consumidores primarios inician el proceso degradativo y los consumidores secundarios se encargan de degradar completamente los productos generados por éstos. También pueden facilitar el crecimiento de los primarios, suministrándoles productos metabólicos (factores de crecimiento), eliminando tóxicos mediante co-metabolismo y produciendo intercambio de material genético [23, 63, 64]. La adaptación de una comunidad microbiana a un contaminante determinado puede ocurrir por tres mecanismos: inducción o represión de niveles de enzimas específicas, cambios genéticos que deriven en nuevas potencialidades metabólicas y/o enriquecimiento selectivo de microorganismos capaces de transformar un compuesto de interés [23].

Dependiendo de la concentración de los microorganismos y del tipo de hidrocarburo contaminante, así como de la velocidad de degradación propia por el microorganismo, se estiman las concentraciones óptimas del microorganismo para alcanzar la mayor velocidad de degradación posible [24].

Microorganismos competentes

Un extenso rango de microorganismos utiliza diferentes hidrocarburos como única fuente de carbono y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Sin embargo, se localizan en bajas concentraciones en áreas no contaminadas y su población aumenta en ambientes sometidos a impactos crónicos del contaminante [65]. De todos los organismos vivos que se utilizan en las tecnologías de biorremediación, las bacterias heterótrofas aerobias conforman el grupo mejor estudiado. Los microorganismos anaerobios por su parte son menos flexibles a adaptarse a la disponibilidad de sustratos y son menos tolerantes a la presencia de metales pesados, por lo que su papel en la biodegradación se encuentra limitado [51]. Las bacterias constituyen un grupo microbiano de gran importancia debido a la extensa variedad de géneros y especies, y a la versatilidad metabólica que poseen. Un gran número de bacterias metabolizan compuestos xenobióticos como fuente de carbono en cultivos puros [66].

Desde los estudios pioneros de ZoBell [67] en ambientes marinos, se han aislado numerosas cepas bacterianas de ambientes litorales y oceánicos capaces de degradar diferentes hidrocarburos [20, 57, 68, 69]. 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 [70-74]. No obstante, también se han aislado bacterias que no presentan esta marcada especialización, como *Marinobacter*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Sphingomonas* o *Geobacillus* [75-78]. La tabla 1 lista microorganismos descritos como degradadores de diferentes compuestos de hidrocarburos del petróleo.

Se ha enfatizado en la importancia de emplear para la biorremediación de ecosistemas marinos a poblaciones microbianas autóctonas de las zonas contaminadas, puesto que presentan una mayor resistencia al

52. Schultz, H. Using bioremediation to help clean-up the Exxon Valdez oil spill. 1996 Dec 2 [cited 2009 Apr 14]. Available from: gwyn.tux.org/pub/tux/hschultz/paper.doc.

53. Häggblom M, Valo R. Biorremediation of chlorophenol wastes. In: Young L, Cerniglia C, editors. Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals. New York: John Wiley & Sons; 1995. p. 389-434.

54. Davis JB. Petroleum Microbiology. 1st ed. Amsterdam: Elsevier; 1967. p. 34-536.

55. Sarubbi AJ. Biorremediación. Aspectos de importancia [cited 2004 Nov 23]. Available from: <http://www.aidisar.org/index.html>.

56. OLIZYM. Productos de biotecnología de última generación para la biorremediación acelerada de los derivados del petróleo. 2004 Sep [cited 2010 Sep 7]. Available from: <http://ecobiotech.com/Spainintro.html>.

57. Van Hamme JD, Singh A, Ward OP. Recent advances in petroleum microbiology. Microbiol Mol Biol Rev. 2003;67(4):503-49.

58. Harayama S, Kasai Y, Hara A. Microbial communities in oil-contaminated seawater. Curr Opin Biotechnol. 2004;15(3):205-14.

59. Mille G, Almallah M, Bianchi M, van Wambeke F, Bertrand JC. Effect of salinity on petroleum biodegradation. Fresenius J Anal Chem. 1991;339:788-91.

60. Olson JW, Mehta NS, Maier RJ. Requirement of nickel metabolism protein HypA and HypB for full activity of both hydrogenase and urease in *Helicobacter pylori*. Mol Microbiol. 2001;39:176-82.

61. Gadd GM. Metals and microorganisms: a problem of definition. FEMS Microbiol Lett. 1992;100:197-204.

62. Viñas M, Sabaté J, Espuny MJ, Solanas AM. Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil. Appl Environ Microbiol. 2005;71:7008-18.

63. Alexander M. Biodegradation and bioremediation. 2nd ed. New York: Academic Press; 1999.

64. LaGrega MD, Buckingham PL, Evans JC, Environmental Resources Management group. Hazardous waste management. 2nd ed. Boston: McGraw-Hill; 2001. p. 7-23.

65. Madigan M, Martinko J, Parker J Brock. Biología de los microorganismos. 10 ed. Madrid: Prentice Hall Iberia (Madrid); 2004. p. 986.

66. Abalos A, Viñas M, Sabaté J, Manresa MA, Solanas AM. Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of a rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. Biodegradation. 2004;15(4):249-60.

67. ZoBell CE. Action of microorganisms on hydrocarbons. Bacteriol Rev. 1946;10:1-49.

68. Leahy JG, Colwell RR. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiol Rev. 1990;54(3):305-15.

69. Watanabe K. Microorganisms relevant to bioremediation. Curr Opin Biotechnol. 2001;12(3):237-41.

Tabla 1. Géneros de microorganismos con potencialidades de degradar hidrocarburos

Grupo	Género	
Bacterias		<i>Lucilia sp.</i>
	<i>Acinetobacter sp.</i>	<i>Marinobacter sp.</i>
	<i>Alcaligenes sp.</i>	<i>Metylophaga sp.</i>
	<i>Alcanivorax sp.</i>	<i>Micrococcus sp.</i>
	<i>Alcanivorax sp.</i>	<i>Microscilla sp.</i>
	<i>Aquaspirillum sp.</i>	<i>Mycobacterium sp.</i>
	<i>Arthrobacter sp.</i>	<i>Neisseria sp.</i>
	<i>Azospirillum sp.</i>	<i>Nocardia sp.</i>
	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Novospingobium sp.</i>
	<i>Beggiatoa sp.</i>	<i>Oleiphilus sp.</i>
	<i>Cycloclasticus sp.</i>	<i>Planococcus sp.</i>
	<i>Corynebacterium sp.</i>	<i>Porphyrobacter</i>
	<i>Desulfotalea sp.</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>
	<i>Desulfovibrio sp.</i>	<i>Rhodoplanes sp.</i>
	<i>Erythrobacter sp.</i>	<i>Rubrivivax sp.</i>
	<i>Flavobacterium sp.</i>	<i>Sphingomonas sp.</i>
	<i>Geobacillus sp.</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>
	<i>Geobacter sp.</i>	<i>Sulfitobacter sp.</i>
	<i>Halochromatium sp.</i>	<i>Thioalcalovibrio sp.</i>
	<i>Halomonas sp.</i>	<i>Xanthomonas sp.</i>
Hongos	<i>Alternaria sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>
	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Phanaerocheate sp.</i>
	<i>Chaetomium sp.</i>	<i>Pleurotus sp.</i>
	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Rhizopus sp.</i>
	<i>Fusarium sp.</i>	
Levaduras	<i>Candida sp.</i>	<i>Saccharomyces sp.</i>
Algas	<i>Chlamydomonas sp.</i>	<i>Dunaliella sp.</i>
	<i>Chorella sp.</i>	

lavado de las superficies que producen los ciclos de mareas [57].

La literatura disponible sobre bacterias ha sido documentada desde 1946, y excede a la literatura disponible para hongos [79]. Esto parece sugerir que la asimilación directa de hidrocarburos es poco frecuente en hongos. No obstante, diversos trabajos han demostrado que los hongos son capaces de utilizar a los hidrocarburos como única fuente de carbono y energía [79, 80].

Sistemas bentónicos estratificados

Los tapetes microbianos son ecosistemas naturales donde microorganismos pertenecientes a diferentes grupos fisiológicos se agrupan en unos pocos milímetros de espesor. En ellos pueden establecerse complejas comunidades microbianas que se estratifican en profundidad, dependiendo de los abruptos gradientes de luz, oxígeno, sulfuro de hidrógeno y potencial REDOX que se generan, y de su propia fisiología; de manera que a nivel macroscópico, pueden observarse una serie de laminaciones de diferentes colores en función de la composición taxonómica que presentan [81-83]. Las capas superficiales consisten principalmente en poblaciones fototróficas oxigénicas de cianobacterias y algas eucariotas. En dichas laminaciones las bacterias heterotróficas consumen materia orgánica y oxígeno, y por debajo de ellas se sitúan las capas anaeróbicas dominadas por bacterias anaeróbicas fototróficas y heterotróficas si las condiciones son adecuadas [3].

Este tipo de comunidades, debido a su estructura física, son capaces de soportar perturbaciones tales como un episodio de contaminación ocasionado por un derrame de petróleo. Tanto es así que numerosos

estudios han puesto de manifiesto que los tapetes microbianos no solo se desarrollan en ambientes marinos no contaminados; sino que también se encuentran en lugares sujetos a una contaminación crónica.

La idea de utilizar los tapetes microbianos para la biorrecuperación de las zonas litorales contaminadas surgió a raíz de diversas observaciones realizadas durante la guerra del Golfo en 1991. Dichos ecosistemas rápidamente cubrieron extensas áreas severamente contaminadas con petróleo y en pocos meses se observó la degradación de hidrocarburos, tanto aeróbica como anaeróticamente. Diferentes investigaciones aportan evidencias sobre la degradación de hidrocarburos por cianobacterias [84]. Además, se ha visto que tapetes microbianos localizados en zonas litorales contaminadas tienen la capacidad de degradar petróleo, aunque no se han identificado las poblaciones responsables de la metabolización de los compuestos [85, 86]. No hay duda de que las cianobacterias tienen un papel crucial en los tapetes, ya que son los responsables del establecimiento de los gradientes de oxígeno y de la síntesis de materia orgánica que utilizan las bacterias heterotróficas. A pesar de ello, no está claro si son las cianobacterias o las bacterias heterotróficas las responsables directas de la biodegradación de los componentes del petróleo. Diversas investigaciones postulan que las cianobacterias tienen la capacidad de oxidar hidrocarburos. Al-Hasan y cols. [87] mostraron que cultivos no axénicos de *Microcoleus chthonoplastes* y *Phormidium corium* aislados a partir de sedimentos contaminados del Golfo de Arabia eran capaces de degradar *n*-alcanos. Estudios en *Oscillatoria sp.* y *Agmenellum quadruplicatum* demostraron su capacidad de oxidar naftaleno [88, 89]. Además, hay otros trabajos que muestran la capacidad de muchas otras cepas de degradar diversos componentes del petróleo [84, 90-92]. Sin embargo, en la mayor parte de los estudios realizados con cianobacterias no se precisa si los cultivos utilizados son axénicos. En este sentido, se han realizado diversas investigaciones donde las bacterias heterotróficas asociadas a las cianobacterias son las responsables de la biodegradación [3]. Estos autores postulan que las cianobacterias por sí mismas no serían las responsables directas de la degradación de los componentes del petróleo, pero pudieran jugar un papel esencial indirecto soportando el crecimiento y la actividad de los verdaderos degradadores [93].

Bioproductos y fertilizantes

Con el propósito de ser empleados en procesos de biorremediación de ecosistemas marinos se han formulado diversos bioproductos y fertilizantes de origen y composición variadas. Los fertilizantes, cuyas fórmulas contienen nutrientes (nitrógenos y fósforo esencialmente) son empleados como bioestimuladores de la microbiota autóctona; el empleo de estos se recomienda luego de confirmar que la población microbiana autóctona posee toda la batería enzimática para degradar al hidrocarburo. La composición de los bioproductos se basa en microorganismos y nutrientes, y se emplean en ecosistemas donde la población endógena no tiene la posibilidad de degradar todos los hidrocarburos, considerándose un biorrefuerzo. Estos productos rara vez no cuentan con nutrientes, dada la necesidad de potenciar el crecimiento tanto de la

70. Dyksterhouse SE, Gray JP, Herwig RP, Lara JC, Staley JT. *Cycloclasticus pugetii* gen. nov., sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments. *Int J Syst Bacteriol.* 1995;45(1):116-23.

71. Engelhardt MA, Daly K, Swannell RP, Head IM. 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.* 2001;90(2):237-47.

72. Golyshin PN, Chernikova TN, Abraham WR, Lünsdorf H, Timmis KN, Yakimov MM. *Oleiphilaceae* fam. nov., to include *Oleiphilus messinensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002;52(Pt 3):901-11.

73. Yakimov MM, Giuliano L, Gentile G, Crisafi E, Chernikova TN, Abraham WR, et al. *Oleispira antarctica* gen. nov., sp. nov., a novel hydrocarbonoclastic marine bacterium isolated from Antarctic coastal sea water. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003; 53(Pt 3):779-85.

74. Yakimov MM, Golyshin PN, Lang S, Moore ER, Abraham WR, Lünsdorf H, et al. *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *Int J Syst Bacteriol.* 1998;48 Pt 2:339-48.

75. Gauthier MJ, Lafay B, Christen R, Fernandez L, Acquaviva M, Bonin P, et al. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. *Int J Syst Bacteriol.* 1992; 42(4):568-76.

76. Gilewicz M, Ni'matuzahroh, Nadalig T, Budzinski H, Doumenq P, Michotey V, et al. Isolation and characterization of a marine bacterium capable of utilizing 2-methylphenanthrene. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1997;48(4):528-33.

77. Maugeri TL, Gugliandolo C, Caccamo D, Stackebrandt E. Three novel halotolerant and thermophilic *Geobacillus* strains from shallow marine vents. *Syst Appl Microbiol.* 2002;25(3):450-5.

78. Zhuang WQ, Tay JH, Maszenan AM, Tay ST. Isolation of naphthalene-degrading bacteria from tropical marine sediments. *Water Sci Technol.* 2003;47(1):303-8.

79. Viguera JG. Estudio de la respuesta fisiológica de hongos filamentosos al crecer con sustratos gaseosos de diferentes grados de hidrofobicidad. Tesis para la obtención del grado de Master en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. México, 2007.

80. Prenafeta-Boldú FX, Summerbell R, Sybren de Hoog G. Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard? *FEMS Microbiol Rev.* 2006;30(1):109-30.

81. Cohen Y, Rosenberg E, editors. *Microbial mats: Physiological ecology of benthic microbial communities*. Washington DC: American Society for Microbiology; 1989.

82. Cohen Y, Castenholz RW, Halvorson HO, editors. *Microbial mats: stromatolites*. New York: Alan R Liss Inc.; 1984.

83. Stal LJ, Caumette P, editors. *Microbial mats: structure, development and environmental significance (NATO ASI Series/ Ecological Sciences)*. Berlin: Springer-Verlag; 1994.

población endógena como exógena que se introduce; otros poseen en su formulación un surfactante producido por un microorganismo, necesario para la disminución de la tensión interfacial agua-petróleo y por ende aumentar la biodisponibilidad del contaminante. Estos productos tienen funciones bioaumentadoras y/o bioestimuladoras. Las tablas 2 y 3 muestran una selección de bioproductos y fertilizantes con su variabilidad de origen y la versatilidad en la composición.

La aplicación de estos productos no constituye una contaminación adicional, pues los microorganismos los consumen por completo (incluyendo la fuente de carbono contaminante) y posteriormente mueren.

En Cuba, el pionero de la formulación de bioproductos es un grupo del Instituto de Oceanología del CITMA, que a partir del 2004 formó el Centro de Bioproductos Marinos (CEBIMAR). En 1994 patentaron un producto denominado BIOIL [94] (Tabla 2). El BIOIL se empleó por primera vez en 1992 en la bahía de Cienfuegos, con una remoción del petróleo del 80%. Con posterioridad se aplicó a un derrame en la bahía de Matanzas en 1998, con una efectividad del 92% [35], y en el 2001 y 2002 lo utilizaron en vertimientos en Playa Jibacoa (al norte de la provincia Mayabeque), y en la Ensenada de Arroyo Blanco (Holguín), con una efectividad del 99% [95]. El BIOIL-FC se empleó en el 2008 en la Ensenada de Bacunayagua (costa norte del límite Mayabeque-Matanzas) con una efectividad del 98%.

Conclusiones

Las diferentes técnicas para remover el petróleo de los ecosistemas marinos dañados no son cien por ciento eficaces. La biorremediación es una tecnología factible, pero solo debe utilizarse después de los procesos de remoción física para que resulte más efectiva. Exceptuando unos pocos factores, esta tecnología posibilita la recuperación de ecosistemas contaminados. La aplicación de procesos *in situ* presenta ventajas ecológicas y económicas sobre la *ex situ*, debido a que los tratamientos *ex situ* requieren del traslado de la contaminación al área de tratamiento.

La biodegradación de los contaminantes depende de factores abióticos que agrupan los relacionados con el contaminante (solubilidad, viscosidad, toxicidad, volatilidad y biodisponibilidad) y las condiciones medio ambientales (pH, temperatura, salinidad, presión, presencia de metales pesados, disponibilidad de oxígeno y nutrientes); mientras que los bióticos depende de los microorganismos (población microbiana: concentración e interacciones). Aunque en un proceso de biorremediación debe analizarse y tenerse en cuenta todos los factores antes mencionados, especial atención merecen la disponibilidad de nitrógeno y fósforo, y la composición enzimática de la población microbiana.

Se han reportado más de 100 géneros y el doble de especies de microorganismos degradadores de hidrocarburos del petróleo pertenecientes a 11 divisiones

84. Raghukumar C, Vipparthy V, David JJ, Chandramohan D. Degradation of crude oil by marine cyanobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2001;57(3):433-6.

85. Abed RM, Safi NM, Köster J, de Beer D, El-Nahhal Y, Rullkötter J, et al. Microbial diversity of near alkylbenzene sulfonate from different cultures with *Anabaena* sp. HB 1017. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1998;60(2):329-34.

86. Grötzschel S, Köster J, Abed RM, de Beer D. Degradation of petroleum model compounds immobilized on clay by a hypersaline microbial mat. *Biodegradation*. 2002;13(4):273-83.

87. Al-Hasan RH, Al-Bader DA, Sorkhoh NA, Radwan SS. Evidence for n-alkane consumption and oxidation by filamentous cyanobacteria from oil-contaminated coasts of the Arabian Gulf. *Mar Biol*. 1998;130:521-7.

88. Cerniglia CE, Gibson DT, Van Baalen C. Algal oxidation of aromatic hydrocarbons: formation of 1-naphthol from naphthalene by *Agmenellum quadruplicatum*, strain PR-6. *Biochem Biophys Res Commun*. 1979;88(1):50-8.

89. Cerniglia CE, Gibson DT, van Baalen C. Oxidation of naphthalene by cyanobacteria and microalgae. *J Gen Microbiol*. 1980;116:495-500.

Tabla 2. Bioproductos comercializables (selección) empleados en los procesos de limpieza de los ecosistemas marinos contaminados con petróleo crudo y sus derivados

Bioproducto	Fabricante	Características
B 350	Bio-System Co., EE.UU.	Bacterias aerobias y anaerobias facultativas degradadoras de hidrocarburos y micronutrientes
BIOIL	Cebimar, Cuba	Cultivo mixto A-5 inmovilizado en gel de pectina cítrica
BIOIL-FC	Cebimar, Cuba	Cinco cepas con una alta velocidad de degradación de las diferentes fracciones del petróleo y un biotensioactivo emulgente obtenido a partir de una de las cepas del consorcio: <i>Bacillus licheniformis</i> CBM-60
Biotemposcreem	Rusia	Producto liofilizado que contiene en su composición 14 especies de microorganismos hidrocarbonoclastas, nutrientes y un catalizador biológico biodegradable
JE 1058BS	Bio Research Centre, Japan Energy Corporation	Contiene un biosurfactante obtenido a partir del cultivo en caldo de <i>Gordonia</i> sp. cepa JE-1058, el producto se esteriliza
L 1800	Bio-System Co., EE.UU.	Bacterias aerobias y anaerobias facultativas degradadoras de hidrocarburos, micronutrientes y surfactante biodegradable
Micro-Blaze ® Spill Control	México	Fórmula de surfactantes, nutrientes y bacterias (no patógenos) Contiene bacterias naturales en forma de esporas (facultativas), no son vegetativas y no fueron modificadas genéticamente, se encuentran naturalmente en el medio ambiente (ríos, presas, tierra, aire, etc.)
Oilzapper	The Energy and Resources Institute (TERI), India	Consorcio de cinco cepas de bacterias diferentes. Trabaja en un rango de 8 a 40 °C; la vida media del producto una vez empleado es de tres meses
Oppenheimer	Oppenheimer Biotechnology, Rusia	A base de arqueobacterias
Terra WR 100, Terra WR 300, Terra WR 500, Terra WR 600	Nimasco, Grupo multinacional	Combinación de fertilizante y microorganismos autóctonos, suplementado con tensoactivos
Putidoil	Rusia	Producto liofilizado formado por al menos tres cepas de <i>Pseudomonas putida</i> y residuos de los nutrientes del medio de cultivo y crioprotectores convencionales

Tabla 3. Algunos fertilizantes comercializables empleados como bioestimuladores en los procesos de saneamiento de ecosistemas marinos contaminados con petróleo crudo y sus derivados

Fertilizante	Fabricante	Características
Customblen	Elf, Francia	Fertilizante inorgánico encapsulado de lenta liberación compuesto por nitrato de amonio, fosfato de calcio y fosfato de amonio
Inipol EAP 22	Elf, Francia	Fertilizante orgánico oleofílico, Microemulsión que contiene nitrógeno en forma de urea, y tri- (Laureth-4) fosfato como fuente de fósforo, encapsulado en ácido oleico
Nitrophoska ® Suprem	Compo, Alemania	Fertilizante: 20% de nitrógeno (9.5% de N-NO ₃ y 10.5% de N-NH ₄), 5% de P ₂ O ₅ y 10% de potasio. Contiene microelementos como magnesio, boro, azufre y zinc. NPK + Mg + SO ₃ + B + Zn (20-5-10 + 3 + 15 + 0.02 + 0.01)
S 200	International Environmental Products, EE.UU.	Fertilizante oleofílico que contiene nitrógeno y fósforo

procariotas diferentes, demostrándose la versatilidad y variabilidad genética y por tanto enzimática de los microorganismos. El uso de los tapetes microbianos en la biorremediación es aún una opción sin estudiar en toda su extensión, esto pudiera estar dado por la complejidad de las comunidades microbianas que los conforman.

La comercialización de más de medio centenar de bioproductos y fertilizantes por compañías y centros

de investigaciones de diversas regiones del mundo, es una variante tentadora y efectiva para combatir los efectos negativos en los ecosistemas por los derrames de petróleo. No obstante a sus ventajas, no debe emplearse indiscriminadamente. Se requiere del análisis previo de la factibilidad ecológica y económica, debiéndose tener en cuenta las condiciones del ecosistema dañado y la necesidad del empleo de bioaumentadores, bioestimuladores o ambos.

90. Yan GA, Jiang JW, Wu G, Yan X. Disappearance of linear alkylbenzene sulfonate from different cultures with *Anabaena* sp. HB 1017. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1998;60(2):329-34.

91. Radwan SS, Al-Hasan RH. Oil pollution and cyanobacteria. In: Whitton BA, Potts M, editors. *The ecology of cyanobacteria*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2000. p 307-19.

92. Mansy AE, El-Bestawy E. Toxicity and biodegradation of fluometuron by selected cyanobacterial species. *World J Microbiol Biotechnol*. 2002;18:125-31.

93. Abed RMM, Köster J. The direct role of aerobic heterotrophic bacteria associated with cyanobacteria in the degradation of oil compounds. *Int Biodeterior Biodegr*. 2005;55:29-37

94. Martínez J, Fonseca EL, Villaverde MJ, Ramos IF, Fuentes M, Joseph IN, *et al.*, inventors; Instituto de Oceanología, assignee. Bioproducto para combatir la contaminación por hidrocarburos del petróleo y sus derivados. Cuba patent CU 22323 A1. 1995 Jan 31.

95. Rodríguez F. Demuestra producto cubano efectividad para combatir derrames de petróleo. *Periódico Trabajadores*, 7 julio 2004. Disponible en <http://www.trabajadores.co.cu>

Recibido en octubre de 2010. Aprobado en abril de 2011.